



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

LETÍCIA MARTINS LAMARÃO

**PESQUISA EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL HUMANO (VRSH) EM AMOSTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS
COM PNEUMONIA, NA CIDADE DE BELÉM.**

BELÉM

2011

LETÍCIA MARTINS LAMARÃO

**PESQUISA EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL HUMANO (VRSH) EM AMOSTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS
COM PNEUMONIA, NA CIDADE DE BELÉM.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, área de concentração Biologia Celular, como requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Professor-orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Linhares

BELÉM

2011

Lamarão, Letícia Martins.

Pesquisa Epidemiológica e Molecular do Vírus Respiratório Sincicial Humano (VRSH) em amostras de pacientes hospitalizados com pneumonia, na cidade de Belém / Letícia Martins Lamarão – Belém, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Costa Linhares

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular. Linha de Pesquisa: – Infecção pelo Vírus Respiratório Sincicial

LETÍCIA MARTINS LAMARÃO

**PESQUISA EPIDEMIOLÓGICA E MOLECULAR DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL HUMANO (VRSH) EM AMOSTRAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS
COM PNEUMONIA, NA CIDADE DE BELÉM.**

Banca Examinadora:

**Dr. Wyller Alencar de Mello
Instituto Evandro Chagas - IEC**

**André Salim Khayat
Universidade Federal do Pará - UFPA**

**Francisco Acácio Alves
Universidade Federal do Pará - UFPA**

Suplentes:

**Rommel Rodriguez Burbano
Universidade Federal do Pará – UFPA**

**Anderson Herculano Oliveira da Silva
Universidade Federal do Pará - UFPA**

BELÉM

2011

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES

Universidade Federal do Pará (UFPA) – Programa de pós-graduação em neurociências e biologia celular.

Instituto Evandro Chagas (IEC) – Laboratório de Vírus Respiratório, Secção de Virologia, Ananindeua, Pará, Brasil.

FONTES FINANCIADORAS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA)

Instituto Evandro Chagas - Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Belém, Pará, Brasil.

DEDICATÓRIA

Para as minhas filhas Júlia e Beatriz.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Alexandre da Costa Linhares, chefe da Seção de Virologia Geral do Instituto Evandro Chagas, pela orientação do trabalho.

Ao Dr. Wyller Mello, chefe do laboratório de Vírus Respiratório, pela disponibilização do laboratório para a realização da pesquisa e pelas correções do trabalho.

À Empresa GlaxoSmithKline, por autorizar a utilização das amostras e dos dados do projeto Epi-Strep.

Ao Dr. Lúzio Ramos, coordenador do projeto Epi-Strep, por ceder amostras de aspirado da nasofarínge.

Aos Profs. Drs. Maria Elena Crespo López e Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva, coordenadores do programa de pós-graduação em neurociências e biologia celular, da UFPA.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), pelo apoio financeiro.

À Mirleide Santos, Luana Barbagelata e James Ferreira pelas contribuições fundamentais nos testes laboratoriais.

Aos Profs. Drs. Wyller Mello, André Khayat e Francisco Alves pelas correções deste trabalho.

Ao meu marido Rommel Burbano pelo incentivo e apoio na execução do meu doutorado.

**“No princípio, a corda bamba
e as pernas.
A seguir, nada oscila
Além dos olhos e da corda,
elevada a efêmero chão”**

Lisbeth Lima

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	xii
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xviii
RESUMO	01
ABSTRACT	02
1. Introdução	03
2. Revisão da Literatura	06
2.1 – Histórico	07
2.2 – Classificação	08
2.3 – Morfologia	10
2.4 – Estrutura genômica	11
2.5 – Proteínas	13
2.5.1 – Proteína N	15
2.5.2 – Proteína P	16
2.5.3 – Proteína L	17
2.5.4 – Proteína NS1 e NS2	17
2.5.5 – Proteína M	17
2.5.6 – Proteína M2-1 e M2-2	18
2.5.7 – Proteína SH	18
2.5.8 – Proteína F	19
2.5.9 – Proteína G	21
2.6 – Caracterização antigênica e molecular	24
2.7 – Ciclo replicativo do vírus	27

SUMÁRIO

2.8 – Patogênese	31
2.9 – Aspectos Clínicos	33
2.9.1 – Pneumonia adquirida na comunidade (PAC)	35
2.9.2 – Pneumonia viral	37
2.9.3 – População de risco para infecção pelo VRSH	38
2.10 – Epidemiologia	39
2.10.1 – Na América Latina	40
2.10.2 – No Brasil	41
2.10.3 – Dos subtipos virais	44
2.11 – Diagnóstico	46
2.11.1 – Isolamento viral	46
2.11.2 – Imunofluorescência	48
2.11.3 – RT-PCR.....	49
2.11.4 – PCR em tempo real	51
2.11.5 – Testes sorológicos	53
2.12 – Imunidade	53
2.13 – Respostas celular e humoral do hospedeiro	55
2.14 – Tratamento e profilaxia	56
2.15 – Desenvolvimento de vacina	60
3. Justificativa	63
4. Objetivos	65
4.1 – Objetivo geral	66
4.2 – Objetivos específicos	66
5. Material e métodos	67
5.1 – Casuística	68

SUMÁRIO

5.2 – Critérios de elegibilidade	68
5.2.1 – Critérios de inclusão	68
5.2.2 – Critérios de exclusão	69
5.3 – Aspectos éticos	69
5.4 – Coleta de dados clínicos	69
5.5 – Variáveis do estudo	69
5.6 – Coleta das amostras clínicas	70
5.7 – Processamento das amostras	71
5.8 – Reação de Imunofluorescência	72
5.8.1 – Preparo das lâminas	72
5.8.2 – Triagem das amostras por imunofluorescência	72
5.9 – Extração do RNA viral	73
5.10 – RT-PCR para o gene F	73
5.11 – Eletroforese em gel de agarose	74
5.12 – Análise estatística	75
6. Resultados	76
6.1 – Artigo científico	84
7. Discussão	85
8. Conclusão	92
9. Referências Bibliográficas	94
10. Anexos	115
10.1 – Anexo I - Termo de consentimento	116
10.2 – Anexo II - Ficha de investigação clínico-laboratorial	122
10.3 – Anexo III - Artigo científico submetido	123

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

aa	aminoácido
BET	Brometo de etídio
CCCC	Quatro resíduos de cisteína
CCA	“Chimpanzee coryza agent” (Agente de Coriza de Chimpanzé)
cDNA	DNA complementar
Cito	Domínio interno à membrana citoplasmática
cm	Centímetro
CS	Sítio de clivagem
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos
ECP	Efeito citopatogênico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Ensaio imunoenzimático)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	“Food and Drug Administration”
FP	Peptídeo de fusão
FRET	Tecnologia que transfere energia de ressonância fluorescente
GTP	Guanosina trifosfato
GTPase	Enzimas que hidrolizam o GTP
HR-C	Região C-terminal
HR-N	Região N-terminal
IEC	Instituto Evandro Chagas
IF	Ensaio de imunofluorescência
Igs	Imunoglobulinas
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

IgM	Imunoglobulina da classe M
IL	Interleucina
INF	Interferon
ITRB	Infecção do trato respiratório baixo
IRAs	Infecções respiratórias agudas
KDa	Kilodalton (10^3 daltons)
M	Molar
Mab	Anticorpo monoclonal
MEM	Meio mínimo essencial
mL	Mililitro (10^{-3} litro)
ANF	Aspirado de nasofaringe
ng	Nanograma
NJ	“neighbor joining”
NK	células “Natural Killer”
nm	Nanômetro
nts	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	“Open Reading Frame” (fase de leitura aberta)
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PFP	Proteína F purificada
PFU	Unidade formadora de placa
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA_{se}	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa
SEVIR	Serviço de Virologia Geral
SP	Peptídeo sinal
SUS	Sistema Único de Saúde
ssRNA	RNA de fita simples
-ssRNA	RNA de fita simples com polaridade negativa
+ssRNA	RNA de fita simples com polaridade positiva
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TCID₅₀	50% de dose letal em cultura de tecido
TM	Segmento/domínio transmembrana
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – α
UNICEF	Fundo para as Nações Unidas para a Infância
UV	Luz ultravioleta
vs	<i>versus</i>
WHO	“World Health Organization” (Organização Mundial de Saúde)
WRAIR	“Walter Reed Army Institute of Research”
x	vezes
μL	Microlitro (10 ⁻⁶ l)
%	Porcentagem
°C	Graus Celcius

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Abreviação de linhagens celulares

Vero	Derivada de rim de macaco verde africano
HeLa	Derivada de carcinoma epitelial de cervix humano
HEp-2	Derivada de carcinoma de laringe humana

Abreviação dos vírus

VRSH	Vírus Respiratório Sincicial humano
MPV	Vírus da pneumonia do camundongo
MPVh	Metapneumovírus humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

Abreviação das proteínas virais do VRSH

F	Proteína de fusão
G	Proteína de adesão
L	Proteína polimerase
M	Proteína de matriz
N	Nucleoproteína
NS1	Proteína não-estrutural NS1
NS2	Proteína não-estrutural NS2
P	Fosfoproteína
SH	“Small hydrophobic protein”

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I: Classificação dos membros da família Paramyxoviridae	09
FIGURA II: Esquema representativo da partícula viral do VRSH	10
FIGURA III: Eletromicrografia do Vírus Respiratório Sincicial	11
FIGURA IV: Representação do genoma do VRSH	12
FIGURA V: Esquema representativo da distribuição das proteínas na partícula viral do VRSH	14
FIGURA VI: Estrutura tridimensional da nucleoproteína do VRSH	16
FIGURA VII: Representação esquemática da glicoproteína F do VRSH	20
FIGURA VIII: Representação esquemática da glicoproteína G	23
FIGURA IX: Esquema representativo da replicação da partícula viral	29
FIGURA X: Eletromicrografia da partícula viral do VRSH na membrana da célula hospedeira	31
FIGURA XI: Histologia do bronquíolo normal e da obstrução bronquiolar	35
FIGURA XII: Quadro clássico de PAC com infiltrado presente no lobo superior direito do paciente	36
FIGURA XIII: Dados de internação por pneumonia, de todas as etiologias, na cidade de Belém, segundo faixa etária	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA XIV: Cultivo de células HEp-2 infectado pelo VRSH	47
FIGURA XV: Teste de imunofluorescência positivo para VRSH	49
FIGURA XVI: Esquema representativo das etapas da RT-PCR	50
FIGURA XVII: Exemplo da detecção do VRSH pela RT-PCR com visualização em gel de agarose	51
FIGURA XVIII: Esquema demonstrativo da PCR em tempo real	52
FIGURA XIX: Coletor plástico de secreções de aspirado da nasofaringe utilizado na pesquisa de VRSH	70
FIGURA XX: Desenho ilustrativo da coleta da secreção da nasofaringe	71
FIGURA XXI: Fluxograma laboratorial aplicado para a pesquisa de VRSH e caracterização do subtipo viral	71
FIGURA XXII: Prevalência mensal de Vírus Respiratório Sincicial Humano (VRSH) em crianças de até 3 anos, hospitalizadas com pneumonia adquirida na comunidade, de novembro de 2006 a outubro de 2007.....	80
FIGURA XXIII: Distribuição das amostras utilizadas na pesquisa de VRSH recebidas das Unidades hospitalares pediátricas da cidade de Belém que participaram do estudo	84

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO I: Proteínas codificadas pelos genomas dos VRSH..... 15

QUADRO II: Mecanismos Fisiológicos envolvidos na população de risco para o VRSH..... 39

QUADRO III: Bairros de residência dos pacientes, com pneumonia adquirida na comunidade, incluídos no estudo e o número de amostras positivas para o Vírus Respiratório Sincicial Humano durante o período de novembro/2006 a outubro/2007 83

TABELA I: Características dos genes do VRSH e seus produtos..... 13

TABELA II: Estudos de prevalência do VRSH na América Latina..... 40

TABELA III: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação da RT-PCR para o gene F e do VRSH 74

TABELA IV: Dados epidemiológicos, clínicos, e resultados laboratoriais observados nos pacientes pediátricos VRSH-positivo e VRSH-negativo hospitalizados com pneumonia adquirida na comunidade em Belém 78

TABELA V: Sinais e sintomas identificados na hospitalização dos pacientes VRSH-positivo e VRSH-negativo com pneumonia adquirida na comunidade e os subtipos identificados 80

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA VI: Resultados das dosagens de proteína C-reativa nos pacientes com pneumonia adquirida na comunidade, positivos para VRSH e com diferentes resultados radiológicos e bacteriológicos 81

TABELA VII: Resultados das análises multivariadas para os fatores de risco na infecção do VRSH em pacientes com PAC 82

RESUMO

Introdução. A pneumonia e a bronquiolite na infância são as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo o Vírus Respiratório Sincicial Humano (VSRH) o principal agente viral. O VSRH está associado a surtos anuais de doenças respiratórias, onde a co-infecção bacteriana tem sido relatada. Este foi o primeiro estudo do VRSR em crianças hospitalizadas com Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC) em Belém, Pará (Norte do Brasil), que teve como objetivo determinar a prevalência da infecção pelo VSRH e avaliar as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes. **Métodos.** Foi realizado um estudo prospectivo em oito hospitais no período de novembro de 2006 a outubro de 2007. Foram testadas 1.050 amostras de aspirado nasofaríngeo para o VRSR, obtidas de crianças hospitalizadas com até três anos de idade com diagnóstico de PAC, pelo método da imunofluorescência direta e da reação em cadeia por polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) para identificação do subtipo viral. Foram obtidos resultados da dosagem de proteína C-reativa (PCR) e da cultura bacteriana. **Resultados.** A infecção pelo VSRH foi diagnosticada em 243 (23,1%) crianças. A idade média do grupo VRSR-positivo foi menor do que a do grupo VRSR-negativo (12,1 meses *versus* (vs) 15,5 meses, ambos com variância de 1-36 meses, $p < 0,001$), enquanto que a distribuição por gênero foi similar. O grupo VRSR-positivo apresentou menor dosagem (PCR) quando comparados ao grupo VRSR-negativo (15,3 vs 24,0 mg/dL, $p < 0,05$). Os achados radiológicos confirmaram que 54,2% do grupo VRSR-positivo e 50,3% do grupo VRSR-negativo apresentavam infiltrado intersticial. A infecção bacteriana foi identificada predominantemente no grupo VRSR-positivo (10% vs 4,5%, $p < 0,05$). Rinorréia e obstrução nasal foram predominantemente observadas no grupo VRSR-positivo. A co-circulação dos subtipos A e B foi observada, com predominância do subtipo B (209/227). A análise multivariada revelou que a idade de 1 ano ($p < 0,015$), os níveis de PCR inferior a 48 mg/dL ($p < 0,001$) e a co-infecção bacteriana ($p < 0,032$) foram independentemente associados com a presença do VRSR em oposição ao grupo VRSR-negativo, e na análise dos sintomas, a obstrução nasal foi independentemente associada com o grupo VRSR-positivo ($p < 0,001$). **Conclusão.** O presente estudo destaca a relevância da infecção por VSRH em casos hospitalizados de PAC em nossa região; nossos resultados justificam a realização de investigações adicionais que possam ajudar a elaborar estratégias para o controle da doença.

ABSTRACT

Background. Childhood pneumonia and bronchiolitis is a leading cause of illness and death in young children worldwide with Respiratory Syncytial Virus (RSV) as the main viral cause. RSV has been associated with annual respiratory disease outbreaks and bacterial co-infection has also been reported. This study is the first RSV study in young children hospitalized with community-acquired pneumonia (CAP) in Belém city, Pará (Northern Brazil). It had the objective of determining the prevalence of RSV infection and evaluating the patients' clinical and epidemiological features. **Methods.** We conducted a prospective study across eight hospitals from November 2006 to October 2007. In this study, 1,050 nasopharyngeal aspirate samples were obtained from hospitalized children up to the age of three years with CAP, and tested for RSV antigen by direct immunofluorescence assay and by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for RSV subtype identification. Levels of C-reactive protein (CRP) and results of bacterial infection were also obtained. **Results.** RSV infection was diagnosed in 243 (23.1%) children. The mean age of the RSV-positive group was lower than the RSV-negative group (12.1 months vs 15.5 months, both ranged 1-36 months, $p < 0.001$) whereas gender distribution was similar. The RSV-positive group showed lower CRP mean levels when compared to the RSV-negative group (15.3 vs 24.0 mg/dL, $p < 0.05$). Radiological findings showed that 54.2% of RSV-positive group and 50.3% of RSV-negative group had interstitial infiltrate. Bacterial infection was identified predominantly in the RSV-positive group (10% vs 4.5%, $p < 0.05$). Rhinorrhea and nasal obstruction were predominantly observed in the RSV-positive group. A co-circulation of subtypes A and B was noted, with a predominance of subtype B (209/227). Multivariate analysis revealed that age under 1 year ($p < 0.015$), CRP levels under 48 mg/dL ($p < 0.001$) and bacterial co-infection ($p < 0.032$) were independently associated with the presence of RSV as opposed to RSV-negative group, and in analyze of symptoms, nasal obstruction were independently associated with RSV-positive group ($p < 0.001$). **Conclusion.** The present study highlights the relevance of RSV infection in hospitalized cases of CAP in our region; our findings warrant the conduct of further investigations which can help design strategies for controlling the disease.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC) é uma causa frequente de internação hospitalar apresentando uma taxa de mortalidade notória (13,7%) em países em desenvolvimento. Não obstante, a doença é a principal causa infecciosa de óbito no mundo ocidental e sexta quando considerada entre todas as causas possíveis (de Miguel Díes & Álvarez-Sala, 2007).

O diagnóstico etiológico da PAC continua representando um grande desafio devido à diversidade de agentes etiológicos envolvidos e a dificuldade de obtenção de material das vias aéreas, representativo do foco pneumônico. Sinais clínicos específicos, culturas de vias aéreas superiores, índices laboratoriais de inflamação e sinais radiológicos peculiares permanecem com baixa correlação com o agente etiológico (Rodrigues *et al.*, 2002). Contudo, apesar da importância de seu impacto social, diversos aspectos permanecem indefinidos e são objetos de estudos intensivos.

Para o tratamento da PAC, a identificação precoce do agente etiológico é importante, inclusive para a seleção de antibióticos adequados no caso de etiologia bacteriana. Contudo, como o diagnóstico precoce de agentes etiológicos tem sido pouco satisfatório e algumas pneumonias podem evoluir para um desfecho fatal, os médicos têm usado antibióticos empíricos para os pacientes com pneumonia, especialmente naqueles com disfunção respiratória grave e/ou infiltração segmentar/lobular (Lee *et al.*, 2010).

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (VRS) é o principal agente etiológico de infecções respiratórias associado à bronquiolite e à pneumonia durante os primeiros anos de vida na infância (Mathisen *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2009).

Virtualmente, todas as crianças são infectadas por este agente até os dois anos de idade e a maioria das infecções é sintomática. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o VRSH possui uma distribuição mundial amplamente difundida, principalmente, em países industrializados em desenvolvimento, como o Brasil (WHO, 2009).

Não existem critérios clínicos em pacientes com pneumonia que sugiram, com absoluta segurança, a etiologia viral. Além disso, as dificuldades no diagnóstico etiológico geral da pneumonia e, particularmente, daquelas causadas por vírus, limita bastante o conhecimento sobre essa doença e sobre seus agentes causadores (Figueiredo *et al.*, 2009).

Através desse estudo pretendeu-se gerar informações sobre a prevalência e a sazonalidade do VRSH em crianças hospitalizadas com PAC na cidade de Belém (clima tropical), durante o período de um ano, assim como, avaliar as manifestações clínicas associadas aos diferentes subgrupos de VRSH.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1– Histórico

O VRSH foi isolado pela primeira vez em 1955 por Morris e colaboradores (1956) a partir de uma epizootia em uma colônia de aproximadamente 20 chimpanzés, no Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) em Washington DC (EUA), com sintomatologia de doença respiratória semelhante a um resfriado comum: coriza, tosse, espirros e secreção mucopurulenta (Morris *et al.*, 1956).

O agente foi isolado em culturas de células hepáticas a partir de *swab* de garganta inicialmente de um chimpanzé fêmea e posteriormente foi verificado que toda a colônia havia sido contaminada, recebendo a denominação de “chimpanzee corysa agent” (CCA) (Blount *et al.*, 1956; Morris *et al.*, 1956). Um dos tratadores dos animais manifestou a mesma sintomatologia, porém com menor gravidade, apresentando um aumento na titulação de anticorpos fixadores de complemento contra CCA (Ogra, 2004).

As inoculações em diversos animais de laboratório dentre eles: camundongos, hamsters, coelhos, cobaios, ratos e chimpanzés mostraram que apenas os últimos desenvolveram a sintomatologia específica (Chanock & Finberg, 1957a). Aventou-se a hipótese de que a colônia de chimpanzés tenha se infectado após o contato com o homem, sendo a origem do CCA atribuída de fato ao homem (Belshe & Mufson, 1991).

Em adolescentes e adultos jovens, inicialmente foi verificada a ocorrência de anticorpos contra CCA pelo teste de fixação de complemento, sugerindo infecção prévia com o agente viral. Em 1956 foram realizados os primeiros isolamentos deste

agente a partir de uma criança com pneumonia e de outra com crupe (difteria laríngea) em Baltimore nos EUA (Chanock & Finberg, 1957a e 1957b). O agente passou a ser denominado então de Vírus Respiratório Sincicial Humano, tendo a presente designação atribuída pela sua característica em cultivo celular de formar sincícios, forma resultante da fusão de células infectadas originando uma célula multinucleada, e pelo seu tropismo ao trato respiratório humano (Chanock & Finberg 1957a; Collins *et al.*, 2001).

Estudos sorológicos realizados na época mostraram que a maioria das crianças em Baltimore havia sido infectada com o VRSH antes dos quatro anos de idade. Investigações similares relatam a associação mundial deste agente com doenças do trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquiolite (Collins *et al.*, 2001), sendo responsável por um elevado índice de hospitalizações em crianças até cinco anos de idade representando um alto custo para os sistemas de saúde (Viegas & Mistchenko, 2005)

No Brasil o vírus foi isolado pela primeira vez por Candeias em 1964. Foram estudadas 24 crianças hospitalizadas com quadro respiratório agudo e em quatro amostras foi possível a identificação do isolamento viral, confirmado pela realização através da prova de neutralização utilizando o soro padrão (Candeias, 1967).

2.2 - Classificação

O VRSH está classificado com base na morfologia e pelo tropismo pelo trato respiratório como: ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovirus*. (Falsey & Walsh, 2000; Van Regenmortel *et al.*,

2000) (**FIGURA I**). Além do VRSH, constitui espécie no mesmo gênero o RSV bovino e o vírus da pneumonia do camundongo (MPV) (van den Hoogen *et al.*, 2001).

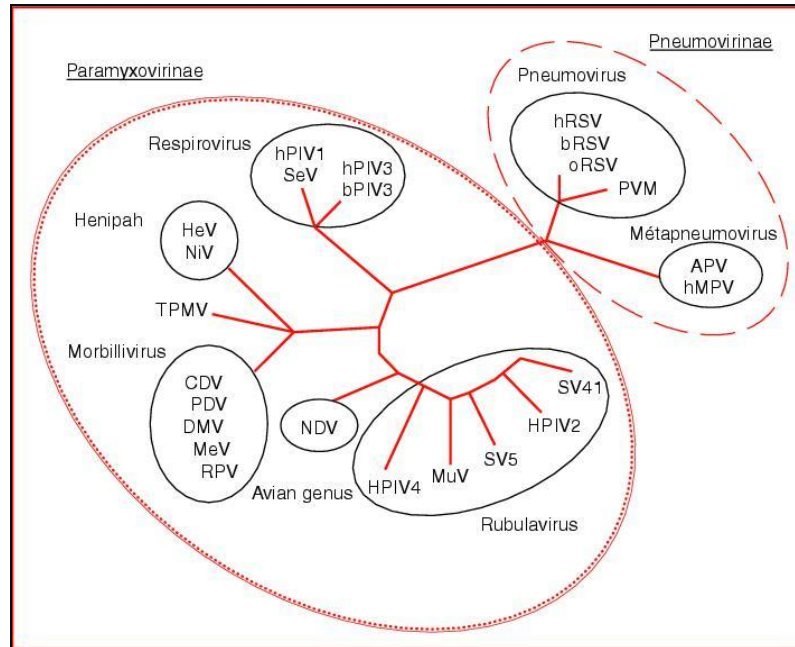


FIGURA I: Classificação dos membros da família Paramyxoviridae

Fonte: John Libbey Eurotext, 2007.

A partícula do VRSH não apresenta as proteínas de superfície Hemaglutinina e Neuraminidase, encontradas no vírus da Influenza e sua classificação é baseada na morfologia da partícula (Van Regenmortel *et al.*, 2000). O vírus utiliza uma enzima Ácido Ribonucléico (RNA) Polimerase própria sintetizada dentro da célula hospedeira e o processo de replicação viral dá-se no citoplasma. É considerada uma partícula extremamente lábil, sendo muito sensível a extremos de temperatura e pH, bem como a detergentes. À temperatura de 55°C é rapidamente destruído e à 37°C apenas 10% da sua infectividade permanece pelo período de 24 horas. Após o armazenamento em temperatura de 4°C, durante o período de uma semana, somente 1% de sua infectividade é preservada (Tristam & Welliver, 1996).

2.3 - Morfologia

O VRSH é pleomórfico com diâmetro variando de 150 a 300 nm. O vírion é composto de um nucleocapsídeo de simetria helicoidal envelopado com diâmetro de 12 a 15 nm. O envelope viral consiste em uma dupla camada lipídica originada na membrana citoplasmática da célula hospedeira, sendo, portanto, de constituição lipoproteica. Sua superfície possui espículas que são as glicoproteínas F e G de origem viral que formam projeções de 11 a 20 nm, separadas por intervalos de 6 a 10 nm, que estão envolvidas no processo de aderência e penetração do vírus (Collins *et al.*, 2001, Santos, 2008) (**FIGURAS II e III**).

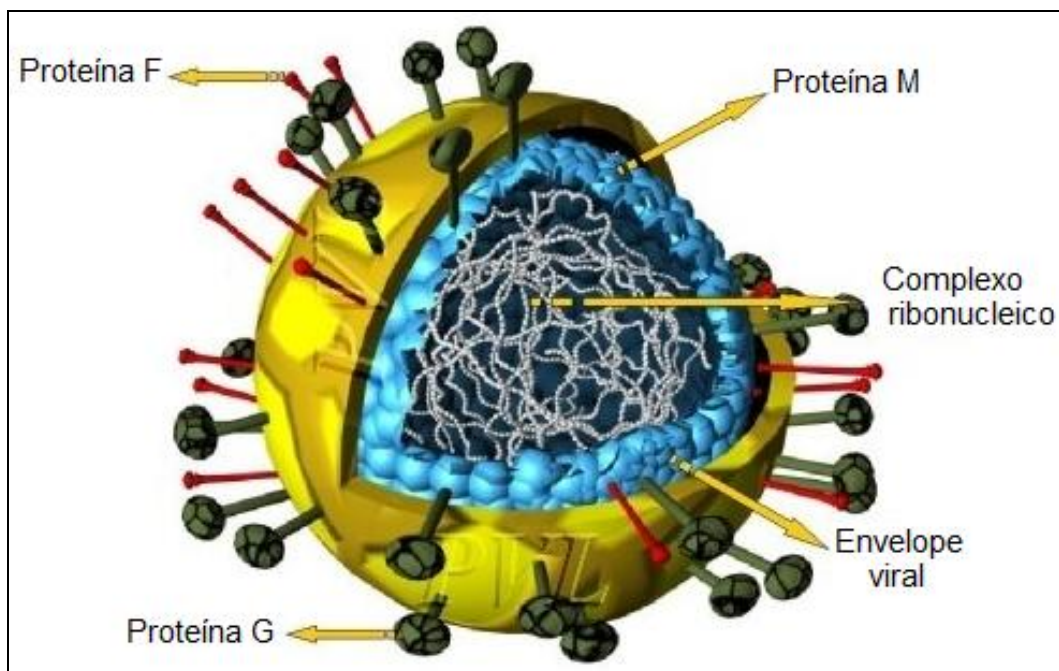


FIGURA II: Esquema representativo da partícula viral do VRSH.

Fonte adaptada de: University of Cape Town, 2011.



FIGURA III: Eletromicrografia do Vírus Respiratório Sincicial.

Fonte: Visual photos/CDC, 2011.

2.4 – Estrutura genômica

Cada partícula infecciosa contém apenas uma cópia funcional do genoma (Collins *et al.*, 2001). O genoma viral é composto de RNA de fita simples não segmentado de polaridade negativa (-ssRNA), com peso molecular aproximado de 5×10^3 Kilodalton (Kda) contendo 15.222 nucleotídeos (nts), por convenção com o protótipo (cepa viral) A2 Long, porém este número pode variar entre os diferentes sorotipos (Huang & Wertz, 1982). Por o genoma não ser segmentado, o VRSH não tem a mesma capacidade de recombinação dos segmentos que o vírus da Influenza, no qual ocorrem os “shifts” antigênicos, responsáveis pelas pandemias. Contudo, como todos os vírus de RNA, o VRSH tem a capacidade de pequenas mutações genômicas, devido à dependência da RNA polimerase que perde a capacidade de correção e edição (Welliver, 2003).

No transcriptoma das células infectadas foi identificado cerca de dez RNAs mensageiros (RNAm), de origem viral distintos que codificam 11 proteínas, identificadas como estruturais (S) e não-estruturais (NS). Dentre as estruturais, três são proteínas de superfície transmembrânica (G, F e SH), duas estão presentes na matriz do vírus e são conhecidas por M e M2, três estão associadas ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral (N, P e L) e as duas últimas, não estruturais, são designadas como NS1 e NS2 (Collins *et al.*, 2001, Santos, 2008).

A posição 3' do RNA genômico consiste de uma região extragênica não-codificante de 44 nts (região “leader”), onde se localiza o promotor viral e esta é seguida por 10 genes virais que obedecem a seguinte ordem: 3'–NS1–NS2–N–P–M–SH–G–F–M2–L–5' havendo também uma região “trailer” de 155 nts na extremidade 5' (**FIGURA IV**). O genoma dos pneumovírus codifica dez proteínas distintas e cada um destes RNAm subgenômicos contém uma única fase aberta de leitura (“Open Reading Frame”-ORF), exceto o M2 que possui duas (M2-1 e M2-2), que codificam as proteínas M2-1 e M2-2 (Collins *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2009).

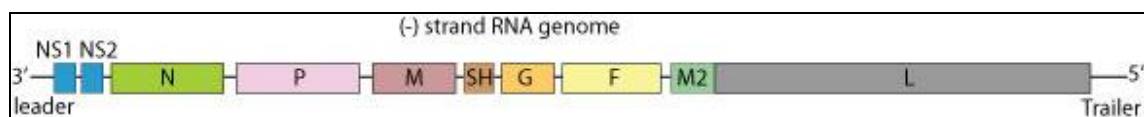


FIGURA IV: Representação do genoma do VRSH.

Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics, 2009.

O gene L é seguido de uma região extragênica de 155 nts, conhecida como região “trailer”, que é mais tolerante à inserção ou deleção de nts que a região “leader”. Todos os genes do VRSH começam com um sinal altamente conservado em seu início (“gene-start signal”) composto por nove nts cuja sequência é 3'CCCCGUUUA, com exceção do gene L que apresenta a seguinte sequência:

3'CCCUGUUUUA. Ao término de cada gene ocorre um sinal semiconservado (“gene-end signal”) que direciona a terminação transcricional e a poliadenilação cuja sequência é: 3'UCA^AUN^{AAA}UUUUUU (Collins *et al.*, 2001).

Os primeiros nove genes não apresentam sobreposições e são separados por regiões intergênicas que, tendo como padrão a linhagem A2, variam de 1 a 56 nts. Essas regiões não parecem desempenhar um papel importante na expressão gênica sendo pouco conservadas entre diferentes amostras. Os dois últimos genes, M2 e L, apresentam uma sobreposição (“overlapping”) de 68 nts. Assim sendo, o gene L tem o início de sua transcrição dentro do gene M2 e, em uma fase de leitura diferente, o sinal de término e poliadenilação do gene M2 está localizado dentro do gene L (Collins *et al.*, 2001, Santos, 2008). A **TABELA I** sintetiza as características atribuídas aos genes do VRSH.

TABELA I: Características dos genes do VRSH e seus produtos.

Gene	Tamanho do gene (nucleotídeo)	Tamanho da proteína (aa)	Peso da proteína não processada (KDa)	Peso da proteína processada (KDa)
N	1203	391	43	45
P	914	241	27	33
L	6578	2165	250	250
M2-1	582	194	22	22
F	1903	574	63	70
G*	923	298	33	90
SH	410	64	8	8
M	958	256	29	25
NS1	532	139	16	14
NS2	503	124	15	15
M2-2	270	90	11	11

* Existem divergências em relação ao tamanho deste gene

Fonte: (Carromeu, 2007)

2.5 - Proteínas

O nucleocapsídeo presente nos vírions dos VRSH é formado pelo RNA genômico associado com as proteínas N, P, L e M2-1 (Collins *et al.*, 2001). As

proteínas M e M2 são proteínas de matriz. A associação entre as proteínas N (“Nucleoprotein”), P (“Phosphoprotein”) e L (“Large protein”) formam o complexo ribonucleoproteína (**FIGURA V**) que é considerado como a unidade mínima suficiente capaz de dar início a transcrição e replicação do material genético viral (Yu *et al.*, 1995). No entanto a proteína M2-1 é necessária para uma transcrição eficiente do genoma pela RNA polimerase viral (Hardy & Wertz, 1998). No **QUADRO I**, observam-se as principais características atribuídas às proteínas virais do VRSH.

As proteínas NS1 e NS2 (não estruturais) estão presentes em abundância nas células infectadas, mas em pequenas quantidades nos vírions. Três são glicoproteínas de superfície: G (adesão), F (fusão), e SH (“small hydrophobic”). As proteínas virais F e G são importantes imunógenos durante a infecção viral sendo a proteína F bastante conservada ao contrário do observado com a proteína G (Collins *et al.*, 2001; Easton *et al.*, 2004).

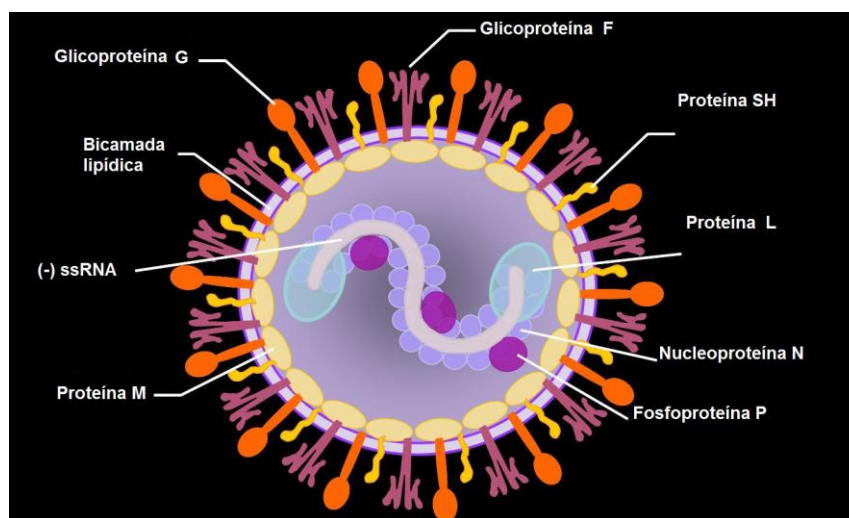


FIGURA V: Esquema representativo da distribuição das proteínas na partícula viral do VRSH.

Fonte adaptada de: Katholieke Universiteit Leuven, 2010.

QUADRO I: Proteínas codificadas pelo genoma do VRSH e suas principais características.

Proteínas estruturais	Características
Nucleoproteína (N)	Principal proteína do nucleocapsídeo; atividade de ligação a RNA.
Fosfoproteína (P)	Associada ao nucleocapsídeo; co-fator da polimerase.
M2-1	Associada ao nucleocapsídeo; fator essencial para elongação/antiterminação do VRSH.
<i>Large</i> (L)	Associada ao nucleocapsídeo; principal componente da polimerase
Matriz (M)	Localizada na face interna do envelope; importante na morfogênese viral.
Fusão (F)	Presente no envelope; atividade de fusão importante na penetração do vírus na célula e na formação de sincícios.
Glicoproteína (G)	Presente no envelope; principal mediador da adsorção viral
<i>Small hydrophobic</i> (SH)	Presente no envelope
M2-2	Status não definido como estrutural ou não-estrutural; responsável pela regulação do processo de transcrição/replicação do RNA.
Proteínas não-estruturais	
NS-1	Possivelmente não-estrutural; interfere com a indução de interferon α e β .
NS-2	Possivelmente não-estrutural; interfere com a indução de interferon α e β .

Fonte adaptada de: Santos, 2008.

2.5.1 – Proteína N

A nucleoproteína N possui 391 aminoácidos (aa) e peso molecular de 43,4 KDa, sendo que o gene que a codifica possui 1.203 nts, está estritamente associada ao RNA genômico e é a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo. O RNA genômico e anti-genômico encontra-se sempre associado com a proteína N e este complexo é usado como molde para a síntese de RNA e apresenta diversas funções para o vírus, como prevenir a formação de estruturas secundárias na molécula de RNA e proteger a mesma de degradação por nucleases (Collins *et al.*, 2001) **(FIGURA VI).**

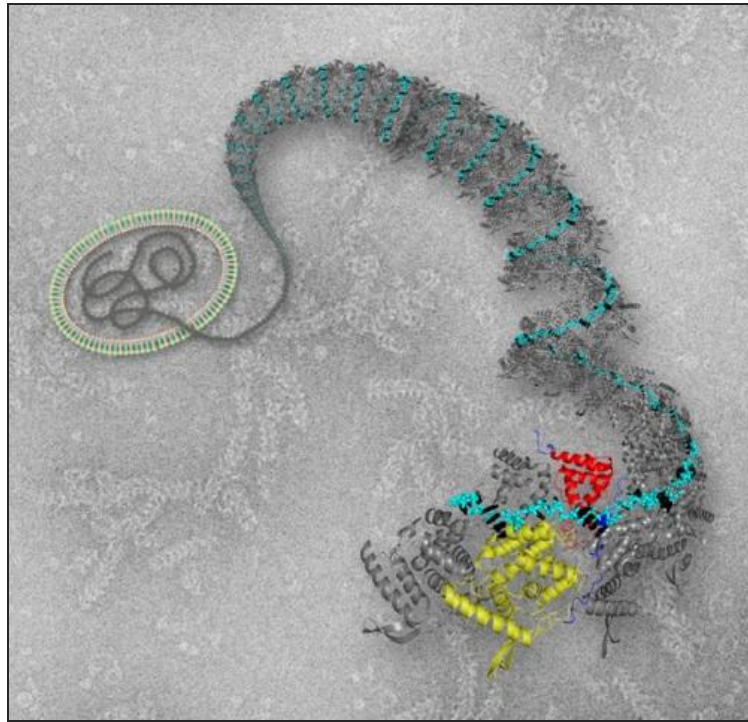


FIGURA VI: Estrutura tridimensional da nucleoproteína do VRSH.

Nota: Estrutura tridimensional da nucleoproteína do vírus sincicial respiratório. O genoma do vírus é composto por uma molécula de RNA (preto e azul turquesa) coberto por dois lóbulos de uma nucleoproteína (vermelho e amarelo) que se fecha em torno do RNA como uma pinça. Dois braços (azul escuro) permitem à nucleoproteína interagir com moléculas vizinhas e formar uma corrente contínua, escondendo e protegendo o RNA.

Fonte: Tawar *et al.*, 2009

2.5.2 – Proteína P

A Proteína P é altamente fosforilada, com caráter ácido e que desempenha uma importante função na regulação do processo da transcrição e replicação do VRSH. Possui 241 aa e peso molecular de 35 KDa e o gene que a codifica possui 914 nts. Constitui uma subunidade da polimerase viral (formada pelas proteínas P e L) e, por analogia a outros vírus pertencentes à ordem *Mononegavírus*, parece mediar o contato entre a proteína L e o complexo proteína-N-RNA (Tran *et al.*, 2007).

2.5.3 – Proteína L

A proteína L é a maior proteína viral constituída de 2165 aa, com peso molecular de 250 KDa e o gene que a codifica possui 6.578 nts. Com base em seu tamanho e localização no nucleocapsídeo, atribui-se a esta proteína as atividades enzimáticas de RNA polimerase RNA dependente, com função de replicação, poliadenilação e formação da estrutura “cap” do RNAm (Mason *et al.*, 2004). Contém seis segmentos que são altamente conservados e presumivelmente representam domínios funcionais. É considerada a proteína de menor abundância na partícula viral (van den Hoogen *et al.*, 2001).

2.5.4 – Proteína NS1 e NS2

As proteínas NS1 (peso molecular de 15,5 KDa) e NS2 (peso molecular de 14,6 KDa) possuem respectivamente 139 e 124 aa. Estas proteínas exercem uma importante função como agente antagonista do fator interferon (INF) do tipo I durante a resposta antiviral imunológica inata. Atuam em conjunto de forma cooperativa na repressão da ativação e translocação nuclear do INF-3 das células hospedeiras. Elas medeiam a degradação das proteínas hospedeiras STAT2 e elongin-cullin E3 ligase e inibem a apoptose celular de forma prematura, facilitando o crescimento e proliferação viral dentro das células hospedeiras (Collins *et al.*, 2001).

2.5.5 – Proteína M

A proteína M (peso molecular de 27 KDa) possui 256 aa, é uma proteína interna e não glicosilada e o gene que a codifica possui 958 nts. Esta proteína está associada ao nucleocapsídeo viral nas células infectadas e, como as proteínas de matriz de outros vírus de RNA de fita negativa têm a função de inibir a transcrição

celular no início das infecções e subsequentemente inibirem a transcrição viral (Ghildyal *et al.*, 2002). Esta associação também facilita a montagem da partícula viral com o envelope nascente (Easton *et al.*, 2004).

2.5.6 – Proteína M2-1 e M2-2

A proteína M2-1 (peso molecular de 22 KDa) possui 194 aa. Esta proteína é interna e não glicosilada e interage com as proteínas N e P, atuando no processo de transcrição, prevenindo o término prematuro durante este processo (Cartee & Wertz, 2001; Cuesta *et al.*, 2000). Esta proteína facilita assim a síntese completa do RNAm (Collins *et al.*, 2001). Esta proteína atua como um fator que permite o trânsito da polimerase através da região intergênica para acessar promotores gênicos distais além da função muito importante na replicação, pois alterações na sua sequência podem diminuir drasticamente a infectividade do vírus (Tang *et al.*, 2001). A proteína M2-2 também é interna e não glicosilada e possui 90 aa, peso molecular de 11 KDa e está relacionada à regulação da transcrição e replicação da molécula de RNA (Collins *et al.*, 2001). Quando expressa em altos níveis, inibe completamente a replicação viral sugerindo que esta, quando produzida nas células infectadas em grande quantidade, pode ser um fator crítico na replicação (Cheng *et al.*, 2005).

2.5.7 – Proteína SH

A proteína SH (“Small hydrophobic protein”) é uma molécula pequena com 64 aa e peso molecular de aproximadamente 7,5 KDa que se insere na membrana citoplasmática da célula hospedeira por meio de uma sequência hidrofóbica que vai do aminoácido de número 14 ao 41. Possui sítios para a adição potencial de carboidratos tanto na região amino quanto na carboxila-terminal. Nas células infectadas pode estar

presente de quatro formas diferentes dependendo do grau de glicosilação, conhecidas como SHo, SHg, SHp e SHt (Collins *et al.*, 2001).

Foi observado que os vírus recombinantes com deleção do gene SH apresentam crescimento normal em cultura de células, inclusive com formação de sincícios (Karron *et al.*, 1997). Até pouco tempo atrás, a função desta proteína durante o processo de replicação ainda não estava totalmente esclarecida sendo possível que esta modifique alguma propriedade do Complexo de Golgi facilitando o transporte das proteínas virais pela via de secreção, uma vez que há acúmulo desta proteína na membrana desta organela (Rixon *et al.*, 2004).

Mais recentemente foi demonstrado que a proteína SH forma um canal iônico próton-seletivo, na membrana citoplasmática da célula hospedeira, atuando na montagem do vírus e durante o processo de entrada na célula hospedeira. Esta proteína também pode apresentar função de resposta contra a imunidade inata da célula hospedeira (Fuentes *et al.*, 2007).

2.5.8 – Proteína F

A glicoproteína F é uma proteína do tipo I, ou seja, está ancorada na região próxima à região carboxila-terminal (intracitoplasmática) e contém uma sequência sinal de clivagem próxima à região amino-terminal (localizada na parte externa da membrana citoplasmática). Possui 574 aa, peso molecular de 70 KDa e o gene que a codifica possui 1.903 nts (Collins *et al.*, 2001).

Identificada como proteína de fusão, é a responsável pela ligação do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira, liberando o nucleocapsídeo diretamente dentro do citoplasma. Proporciona também a fusão da

célula infectada com uma adjacente, favorecendo a formação de sincícios (Collins *et al.*, 2001).

É sintetizada como um precursor inativo denominado F0, que consiste em dois domínios denominados F2 (1-130 aa) e F1 (137-154 aa) e de um peptídeo clivável (132-136 aa) (Rixon *et al.*, 2002, Low *et al.*, 2008). Após a síntese e a glicosilação, a proteína F0 é clivada proteoliticamente por uma protease celular, semelhante à tripsina, em duas subunidades, F2 (peso molecular de 20 KDa) e F1 (peso molecular de 68 KDa), que permanecem ligadas por pontes dissulfeto nos resíduos cisteína (Schelender *et al.*, 2003). Para os *Pneumovírus* e *Paramyxovírus*, em geral, os primeiros 19 a 26 aa da porção amino-terminal da subunidade F1 são hidrofóbicos e estão diretamente envolvidos com a inserção na membrana (Earp *et al.*, 2004). A subunidade F1 é relativamente bem conservada, sendo sua função comprometida mediante deleções ou substituições de aa (Ruiz-Arguello *et al.*, 2004). A apresentação esquemática do precursor pode ser visualizada na **FIGURA VII**.

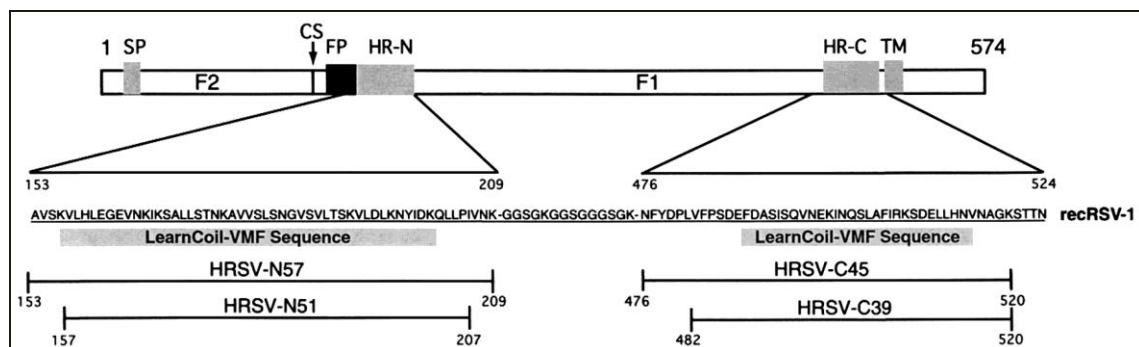


FIGURA VII: Representação esquemática da glicoproteína F do VRSH.

Nota: F1 e F2 são formados após a clivagem proteolítica do precursor F0. O peptídeo sinal (SP), o sítio de clivagem (CS), o peptídeo de fusão (FP), a região N-terminal (HR-N), a região C-terminal (HR-C), e segmento transmembrana (TM) dentro da sequência de aa são indicadas. O HR-N e regiões HR-C prevista pelo programa “LEARNCOIL-VMF” são representados pelas caixas sombreadas. Fragmentos de protease-resistente a tripsina (VRSH-N57 e VRSH-C45) e proteinase K (VRSH-N51 e VRSH-C39) de clivagem são indicados.

Fonte: Zhao *et al.*, 2000.

A subunidade F2 demonstrou-se como o determinante de especificidade nas infecções por vírus respiratórios sinciciais. Adjacente à região do peptídeo de fusão (FP), existem duas regiões contendo sequências repetidas de sete aa denominadas HR-N e HR-C. Estas regiões repetidas são necessárias para o processo de fusão viral. As regiões HR-N e HR-C são consideradas candidatas como alvo para o desenvolvimento de drogas direcionadas contra a proteína F, inibindo a ligação de peptídeos à região HR-C e prevenindo a mudança conformacional necessária para a fusão do envelope viral à membrana celular (Schelender *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2009).

A proteína F também interage com uma proteína da família Ras chamada RhoA, uma pequena GTPase que possui inúmeras funções biológicas, tais como: secreção de interleucinas (IL) pró-inflamatórias, especificamente IL-1, IL-6 e IL-8; interferência com a reorganização da actina no citoesqueleto; modulação da expressão gênica; alterações na morfologia, mobilidade e proliferação celular. A interação da proteína F do VRSH com RhoA induz a formação de sincícios em células HEp-2 infectadas (Silva *et al.*, 2009).

2.5.9 – Proteína G

A glicoproteína G é uma proteína do tipo II, ou seja, está ancorada à membrana próxima à sua porção amino-terminal por um domínio hidrofóbico, não clivável, tipo sinal âncora, que se estende dos resíduos 38 aos 66. Possui de 289 a 319 aa, dependendo da amostra viral. O gene que a codifica possui, em geral 918 nts (grupo A) e varia de 920 a 980 nts para o grupo B (Trento *et al.*, 2003; Zlateva *et al.*, 2004).

A proteína G, ao contrário da proteína F, não é conservada e pode ser homométrica ou homotetramérica (Collins *et al.*, 2001). Em 1987, Levine e

colaboradores estabeleceram que a glicoproteína G tem a função de adsorção ao demonstrarem que anticorpos contra a proteína inibiam a ligação do vírus às células hospedeiras. Esta glicoproteína é análoga a hemaglutinina de outros vírus da família Paromyxoviridae, porém não possui ação hemaglutinante (Sullender *et al.*, 2000).

É sintetizada como uma proteína de peso molecular de 33 KDa, sendo posteriormente glicosilada para obtenção da sua forma madura de peso molecular de 90 KDa. O ectodomínio carboxila-terminal da proteína G caracteriza-se por conter um alto teor de serina e treonina, cerca de 30% que são potenciais sítios de ligação de glicídios por ligações glicosiladas do tipo “O”, ou seja a ligação de glicídios a átomos de oxigênio das cadeias de aa. A glicosilação da proteína também se faz por ligação glicosídica tipo “N”, ou seja a ligação de glicídios a átomos de nitrogênio da cadeia lateral da asparagina. O ectodomínio externo contém, portanto, de três a oito sítios para adição de oligonucleotídeos por ligação glicosídica tipo N e mais de 70 sítios mais para a adição de oligossacarídeos por ligação glicosídica tipo “O”, embora estime-se que a proteína madura possua de 24 a 25 cadeias de glicídios O-ligados (Wertz *et al.*, 1985; Johnson *et al.*, 1987). Possui também um alto teor de resíduos de prolina (cerca de 10%) o que contribui para a redução das estruturas secundárias da proteína (Collins *et al.*, 2001). Devido a sua constituição, foi sugerido que a glicoproteína G seria homóloga às mucinas secretadas pelas células epiteliais (Johnson *et al.*, 1987).

Estudos demonstraram que esta proteína liga-se à membrana citoplasmática interagindo com heparan sulfato, sendo importante para a ligação do vírion à célula hospedeira no início da infecção. Esta proteína também interage com o receptor celular CX3CR1, modulando assim a resposta imunológica do hospedeiro e facilitando a infecção (Beeler *et al.*, 2000).

A glicoproteína G é de especial interesse por possuir a maior variabilidade entre os isolados de VRSH. Pode suportar inserções, deleções ou múltiplas substituições de aa sem a perda de sua função (Nagai *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005). A variabilidade está concentrada no domínio extracelular, no qual se encontram duas regiões variáveis, que contém alto conteúdo de serina e treonina entre os aa 69-164 e 207-298, com aproximadamente 56% de divergência entre as amostras A e B (Johnson *et al.*, 1987). Intercalando esta região de alta variabilidade, existe uma região mais conservada com um pequeno segmento de 13 aa (164-176) e quatro resíduos de cisteína (C173, C176, C182 e C186), conservados em todas as amostras de VRSH (Hacking & Hull, 2002), sugerindo ser este segmento o responsável pela ligação do vírus a um receptor celular na célula hospedeira (**FIGURA VIII**) (Sullender *et al.*, 2000).

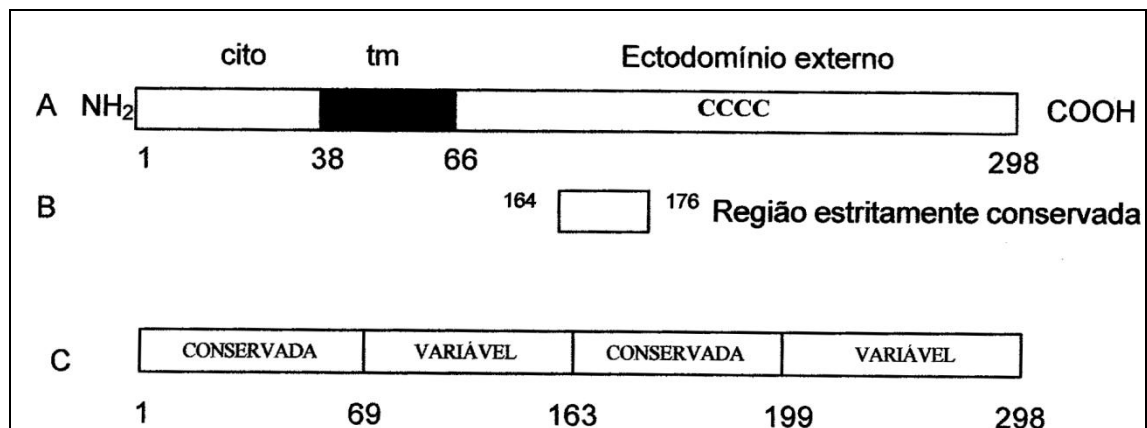


FIGURA VIII: Representação esquemática da glicoproteína G.

Nota: (A) estrutura primária de aa da linhagem A2, sendo: Tm = domínio transmembrana; cito = domínio interno à membrana citoplasmática; CCCC = quatro resíduos de cisteína (C173 C176 C182 C186) conservados em todas as amostras. (B) Região de 13 aa estritamente conservada nas amostras de VRSH; (C) Representação das duas regiões variáveis da proteína G intra e intergrupos do VRSH, ricas em serina e treonina, compreendendo os aa 69-163 e 199-298 e região conservada compreendendo os aa 163-199. As regiões transmembrana e citoplasmática, compreendendo os aa 1-69, são conservadas.

Fonte: Sullender *et al.*, 2000.

Estudos mais recentes sobre a interação das proteínas F, G e SH, sugerem que as primeiras formem um complexo na superfície das células infectadas, porém não foi encontrada nenhuma evidência de que as três proteínas juntas formem um complexo. Apesar dos mecanismos que levam a fusão de membrana em células infectadas pelo VRSH ainda não serem bem entendidos, as associações entre as proteínas F e G encontradas, sugeriram que a proteína G apresenta um papel indireto no processo de fusão (Low *et al.*, 2008).

2.6 – Caracterização antigênica e molecular

Os primeiros pesquisadores a desvendar as diferenças antigênicas entre duas amostras (A1 e Long) do VRSH foram Coates e Kendrick (1963). Em um estudo seguinte, Coates *et al.* (1966), observaram diferenças antigênicas entre outras amostras virais, Long e CH-18537. A cepa Long foi isolada em 1956 de uma criança com pneumonia, enquanto a cepa CH-18537 foi isolada em 1962 de uma criança com doença do trato respiratório superior. Ambos os estudos utilizaram a reação de neutralização com soro de animal hiperimune (coelhos ou cobaias). Nestes estudos demonstrou-se que a cepa A1 não era neutralizada com o soro preparado com a amostra Long ou CH-18537, sugerindo assim que diferentes variantes poderiam estar circulando simultaneamente na mesma população (Coates *et al.*, 1966; Wulff *et al.*, 1964).

Com o surgimento dos anticorpos monoclonais (Mabs) essas diferenças antigênicas mostraram-se mais definidas. Esta variabilidade antigênica pode ser visualizada pelas diferenças de títulos de anticorpos neutralizantes, que podem ser maiores na ordem de até quatro vezes quando testado em amostras do mesmo grupo. Foram testados MAb para as proteínas P e N e as glicoproteínas F e G. Foram os

trabalhos de Anderson e colaboradores (1985) e Mufson e colaboradores (1985) entretanto, que estabeleceram a divisão do VRSH em grupos antigênicos (A e B) com base na reatividade com um painel de MAbs classificando as amostras A2 e Long como pertencentes ao subgrupo A e CH-18537 e SW8/60 ao subgrupo B as principais diferenças encontradas entre os isolados foram observadas na glicoproteína G (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985).

Estudos posteriores demonstraram que os dois subgrupos apresentam aproximadamente 25% de homologia. Alguns trabalhos mostraram que o dimorfismo antigênico entre os grupos A e B é maior na glicoproteína G, com uma correlação antigênica de 1% a 7%, conferindo vantagem para o vírus em termos da evasão de uma resposta imune pré-existente, enquanto que a proteína F apresenta uma correlação antigênica de aproximadamente 50% entre os grupos. Crianças em tenra idade parecem não montar uma resposta imunológica vigorosa contra a glicoproteína G (Queiroz *et al.*, 2002).

Posteriormente, outros estudos demonstraram haver diferenças antigênicas dentro de cada um dos grupos possibilitando a divisão em subgrupos. A princípio, foram identificados sete subgrupos do tipo A (A1 a A7) e três do tipo B (B1 a B3). Hall e colaboradores descreveram posteriormente mais um subgrupo dentro do grupo B (B4) (Anderson *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1990).

Os estudos de variabilidade antigênica foram complementados por estudos de variabilidade genética, que corroboraram a ocorrência dos dois grupos e abriram novos horizontes no sentido de proporcionar um melhor entendimento com relação à circulação e evolução do VRSH (Cane *et al.*, 1999; Sullender *et al.*, 2000). Novas metodologias foram aplicadas para o melhor esclarecimento da variabilidade genética, dentre as quais, a hibridação de ácidos nucléicos, a reação em cadeia por

polimerase (PCR), análise da sequência de nts e outros. Todos os estudos de variabilidade genética do VRSH usaram as amostras virais Long e A2 identificadas pelos MAb's como grupo A e a amostra CH-18537 identificada como grupo B. De acordo com os trabalhos citados acima, os grupos A e B apresentam, entre si, 33% de divergência na sequência de nts da proteína G e 47% dos aa.

Desde a confirmação da existência dos dois grupos antigênicos do VRSH, investigações têm sido realizadas no intuito de demonstrar variantes antigênicas dentro de cada grupo e sua relação com a gravidade da doença e também a alta incidência das re-infecções causada por este vírus (Sullender *et al.*, 2000; Valdivia *et al.*, 1999). Estudos relataram que a divergência entre os aa da proteína G dentro de um mesmo grupo pode ser de até 20% (Sullender *et al.*, 2000).

Foram realizados também estudos comparando as sequências dos genes NS1, SH e N, porém a variação é bem menor. A similaridade de nts e aa encontrados foi 72% e 76% para o gene SH, 83% e 87% para o gene NS1 e 86% e 96% para o gene N (Johnson *et al.*, 1987).

Vários estudos baseados apenas nas propriedades antigênicas foram realizados no sentido de elucidar o padrão de circulação o que possibilitou algumas conclusões: a co-circulação dos grupos durante os surtos e a variação do padrão de circulação de subgrupos em diferentes comunidades durante o mesmo período (Anderson *et al.*, 1991). O conhecimento da variação antigênica e suas implicações são fundamentais para o desenvolvimento da vacina para o VRSH.

Atualmente, há descrição na literatura de mais um genótipo do grupo A (SAV1), totalizando oito subgrupos e mais três genótipos do grupo B (SAB1, SAB2 e SAB3), totalizando sete subgrupos ("GeneBank"). Mais recentemente foi descrito um

genótipo do grupo B (BA) circulando na América do Sul e nordeste da Ásia (Nagai *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004).

Foram reportadas três cepas do grupo antigênico B (BA3833/99B, BA3859/99B e BA4128/99B) isolados no ano de 1999 em Buenos Aires (Argentina). Estes isolados possuíam uma duplicação de 60 nts na região C-terminal do gene da glicoproteína G e foi descrito na literatura como subtipo BA (Trento *et al.*, 2003). Subsequentemente sequências da glicoproteína G com a mesma duplicação foram descritas em localidades distintas. (Trento *et al.*, 2006). Esta sequência nucleotídica foi traduzida em um polipeptídeo de 315 aa. Esta proteína apresenta características estruturais iguais às proteínas G de outros isolados de VRSH, tais como uma região de cisteínas e a presença de múltiplos sítios potenciais para a glicosilação da ligação O e N no ectodomínio da proteína (Trento *et al.*, 2003).

2.7 – Ciclo replicativo do vírus

A macromolécula utilizada como receptor celular para a adsorção do VRSH à célula hospedeira ainda permanece desconhecido. Para o gênero *Morbilivírus*, que diferentemente dos outros gêneros não possui atividade de neuraminidase, foi descoberto que o receptor celular é o CD46. Para os gêneros *Respirovírus* e *Rubalavírus* da subfamília *Paromyxovirinae*, o receptor celular é uma molécula que contém ácido siálico. Para os *Pneumovírus* especula-se a possibilidade de que o receptor também seja uma molécula que não possua ácido siálico, uma vez que neste gênero, assim como nos *Morbilivírus*, não existe a presença de uma neuraminidase (Collins *et al.*, 2001; Kingsbury, 2001).

A adsoção do vírus a receptores presentes na superfície da célula hospedeira é mediada pela glicoproteína G. Um glicosaminoglicano semelhante à

heparina, composto de uma sequência alternada de ácido hexurônico e glucosamina, ou outro ainda não identificado seriam os receptores celulares (Kingsbury, 2001, Techaarpornkul *et al.*, 2002). Entretanto, ainda não se pode afirmar que a interação é apenas um passo inicial para a posterior ligação do vírus a um receptor de alta afinidade ainda desconhecido (Martinez & Melero, 2000). Malhotra e colaboradores (2003) observaram em células HEp-2 um aumento da anexina II, após a infecção do VRSH, sugerindo o envolvimento desta na adsorção.

Após a ligação da proteína G, a proteína F promove a fusão do envelope viral à membrana celular da célula hospedeira através de um mecanismo no qual se envolve principalmente a porção hidrofóbica amino-terminal de F1. Este processo conhecido como “desnudamento” resulta na liberação do nucleocapsídeo viral dentro do citoplasma da célula hospedeira (Kingsbury, 2001).

Com o nucleocapsídeo liberado, no citoplasma ocorre o início do processo de transcrição do genoma viral (**FIGURA IX**). Os genes são transcritos na direção 3' – 5' a partir de um único promotor localizado na posição 3'. De acordo com o mecanismo proposto, a enzima RNA polimerase RNA dependente adere-se à região “leader” que se localiza no extremo 3' do genoma e a transcrição é iniciada no primeiro nt. Na junção entre a região “leader” e o primeiro gene, inicia-se a transcrição por um mecanismo sequencial de início-fim, guiada pelos sinais de início (“start signal gene”) e fim (“end signal gene”).

O resultado deste processo é a síntese de uma série de RNAs subgenômicos. Os RNAs parecem ser cópias exatas dos genes, não havendo evidências de modificações como, por exemplo, “splicings” alternativos. Os RNAs transcritos recebem um “cap” na extremidade 5' e são poliadenilados na extremidade 3' (Collins *et al.*, 2001).

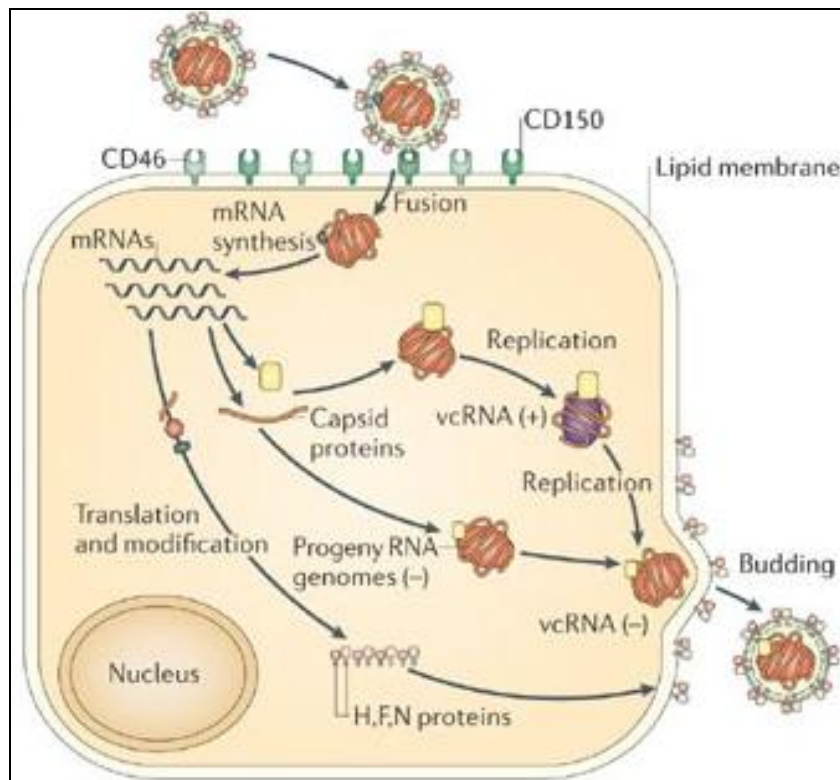


FIGURA IX: Esquema representativo da replicação da partícula viral

Fonte adaptada de: Nature reviews, 2006

Além dos dez RNAs produzidos pode-se encontrar, em menores quantidades, grandes RNAs poliadenilados. Estes politranscritos são gerados pela transcrição contínua de dois ou mais genes e contém tanto a sequência dos genes quanto a de região intergênica. Aparentemente, em torno de 5% a 10% das vezes, a polimerase falha no reconhecimento do sinal de fim do gene e continua sintetizando o RNA até encontrar o próximo sinal. O sinal de início do gene L localiza-se 68 nts acima do sinal de fim do gene M2, não afetando, todavia, a síntese do RNA do gene M2. Por outro lado, a presença do sinal de fim do gene M2 dentro do gene L resulta numa alta frequência (aproximadamente 90%) de terminação prematura da transcrição do gene L. O principal produto é um RNA poliadenilado de 68 nts, sendo o RNA do gene L menos abundante. Possivelmente, assim como para os politranscritos, o RNA

completo do gene L é gerado quando a polimerase falha em reconhecer o sinal de fim do gene M2 (Collins *et al.*, 2001).

A quantidade de cada RNAm diminui com a distância do gene ao promotor, possivelmente pelo desligamento da polimerase durante a transcrição sequencial. Este mecanismo regulatório possibilita aos vírus fazer uso eficiente da maquinaria traducional da célula. Um nucleocapsídeo contém cerca de cem vezes mais proteína N, na sua estrutura, do que proteína L (Kingsbury, 2001).

Além da transcrição e tradução das proteínas, outro passo importante é a replicação do genoma que produz moldes adicionais do genoma para transcrição e replicação e fornece genomas em grande quantidade para serem incorporados nas novas partículas virais. A produção da fita complementar de RNA positivo (+ssRNA), que servirá de molde para gerar cópias do genoma viral de polaridade negativa (-ssRNA), requer que a maquinaria de produção de RNA entre num modo de “anti-terminação”, ignorando todos os sinais de início e fim presente entre os genes e entre a sequência “leader” e o gene NS1 (Kingsbury, 2001).

A maturação do vírus ocorre, num primeiro passo, com a montagem do nucleocapsídeo pela combinação da proteína N com o RNA genômico seguida da adição das proteínas P e L. A montagem do envelope ocorre com as glicoproteínas virais, modificadas pós-traducionalmente por glicosilação durante seu transporte através do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, ocupando o lugar das proteínas celulares na membrana plasmática (Kingsbury, 2001). Em seguida, as proteínas da matriz se agregam na porção interna do envelope nascente. Finalmente, o capsídeo alcança a superfície e ocorre o brotamento do mesmo, levando consigo uma porção da membrana plasmática, num processo inverso ao da penetração por fusão **(FIGURA X)** (Kingsbury, 2001). Os antígenos virais podem ser detectados 9 horas após

infecção em cultura de células e o vírus infeccioso entre 11 e 13 horas (Ogra *et al.*, 2004).

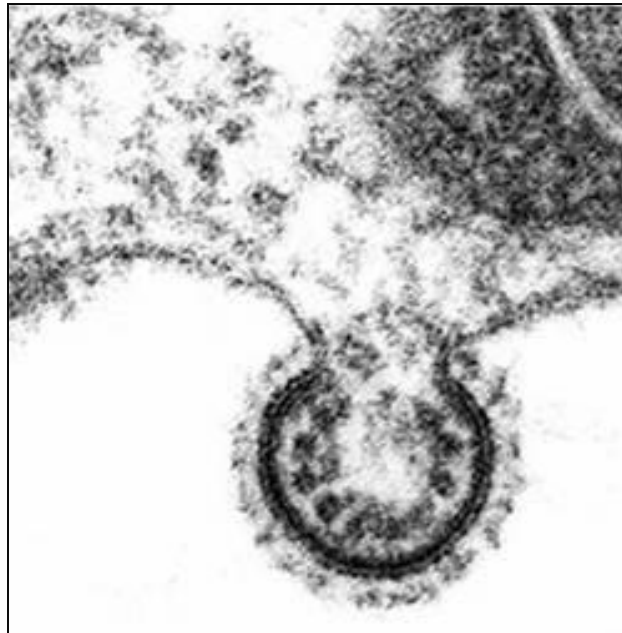


FIGURA X: Eletromicrografia da partícula viral do VRSH na membrana da célula hospedeira.

Fonte: Wadsworth Center, 2011.

2.8 – Patogênese

O VRSH pode acometer todas as faixas etárias. O Vírus atinge o trato respiratório através do contato próximo entre pessoas infectadas sendo que a transmissão da infecção ocorre através de aerossóis produzidos por tosse, espirro, contato com superfícies e objetos contaminados ou, mais frequentemente, por fômites, sendo um importante agente de infecção nosocomial. A infecção ocorre quando o vírus penetra no organismo através da membrana mucosa dos olhos, boca e nariz (Hall *et al.*, 1975; Santos, 2008).

O tempo de sobrevivência do VRSH nas mãos é de aproximadamente 1 hora, no entanto, em superfícies duras e não porosas (estetoscópio), pode durar até 24

horas. O período de incubação é de quatro a cinco dias. Na fase inicial da infecção, o vírus é replicado na nasofaringe, atingindo títulos de $10^4 - 10^6$ TCID₅₀/ml na secreção nasal em crianças e títulos um pouco mais baixos em adultos. Crianças excretam o VRSV por uma média de nove dias, enquanto adultos excretam durante um a dois dias. Algumas crianças podem excretar o vírus por mais de três semanas após o surgimento da doença (Falsey *et al.*, 2000; Santos, 2008).

O vírus é replicado primariamente na camada superficial do epitélio respiratório. Ele também infecta macrófagos e monócitos e parece interferir em algumas de suas funções. A disseminação viral do trato respiratório superior para o inferior envolve aspiração da secreção ou propagação via epitélio respiratório. O vírus também pode se propagar de célula para célula por fusão, sem emergir no meio extracelular; contudo, a importância desse mecanismo “in vivo” ainda não está clara (Santos, 2008).

Durante a infecção as células epiteliais ciliadas são destruídas, e necrose bronquiolar é observada nos casos mais graves. A necrose dos brônquios e bronquíolos induz a formação de tampões de muco e fibrina, juntamente com material necrótico, nas vias aéreas mais estreitas (Santos, 2008).

Embora o VRSV seja pneumotrópico, ele não fica restrito a esse sítio. Em diversos casos fatais de infecção em adultos e crianças imunocomprometidos, foi observado que o vírus se disseminou para outros órgãos, incluindo fígado, rins e miocárdio (Santos, 2008).

O VRSV caracteriza-se fundamentalmente por seu caráter sazonal predominante no inverno e início da primavera, com duração variável de quatro a seis

meses dependendo das características climáticas de cada País ou região (Ogra *et al.*, 2004).

2.9 - Aspectos Clínicos

As infecções respiratórias agudas (IRAs) têm sido as causas principais de morbidade e mortalidade em crianças de até cinco anos de idade em todo mundo, sendo consideravelmente maior em países em desenvolvimento (Law *et al.*, 2002).

O VRSH pode causar diversos quadros de doenças das vias aéreas, desde resfriado comum até pneumonia. As primeiras manifestações clínicas são típicas de um resfriado comum, com secreção nasal clara, tosse moderada, febre baixa e, algumas vezes sibilância, geralmente evoluindo para a recuperação no período de uma a três semanas. A tosse é um dos sintomas mais comuns, e cerca de 90 a 97% dos pacientes são acometidos e também podem aparecer sintomas como diminuição do apetite, além da ocorrência de complicações como otite média e sinusite (Winther *et al.*, 2002). Embora a temperatura corporal ocasionalmente alcance 39 a 40°C são, via de regra, mais baixas das que as observadas nas infecções do vírus da Influenza (Falsey e Walsh, 2000; Polak *et al.*, 2004).

Durante os primeiros anos de vida, o VRSH está associado à bronquiolite e à pneumonia, com maior ocorrência entre seis semanas de vida e nove meses e com pico de incidência entre dois e sete meses, período que há diminuição dos títulos de anticorpos maternos (Gupta *et al.*, 2011, Salomão Junior *et al.*, 2011). Após a infecção natural, a proteção contra re-infecções é de curta duração e as re-infecções são frequentemente observadas em crianças menores de dois anos. Re-infecções em adultos também ocorrem, porém com sinais clínicos mais brandos (Silva *et al.*, 2009).

Além de induzir episódios agudos de chiados, particularmente bronquiolite nos dois primeiros anos de vida, as infecções por VRSV têm sido entendidas como fatores de risco importantes para o desenvolvimento subsequente de asma e sensibilização a alérgenos inalantes, principalmente em indivíduos com predisposição genética para atopia e asma (Camara *et al.*, 2004; Ogra *et al.*, 2004; Welliver *et al.*, 2003).

Não existem estimativas exatas sobre as taxas de letalidade, mas estudos indicam que em torno de 0,5% a 1,0% das infecções resultam em morte em crianças hospitalizadas em países desenvolvidos (Nyati *et al.*, 2002; Ogra *et al.*, 2004). Estudos demonstram que a letalidade é maior em crianças que apresentam antecedentes que predis põe à doença mais grave (Nyati *et al.*, 2002; Shay *et al.*, 2001).

As formas mais graves de doença do trato respiratório inferior envolvem infiltrado peribronquiolar de células mononucleares acompanhado de edema da submucosa e broncorréia (expectoração abundante), levando a obstrução bronquiolar **(FIGURA XI)** (Santos, 2008).

A migração do vírus do trato respiratório superior ao trato respiratório inferior provavelmente envolve a aspiração de secreções ou migração via epitélio respiratório. A bronquiolite resulta da destruição do epitélio bronquiolar, inflamação peribronquiolar, edemas dos tecidos das vias aéreas e produção de muco. A obstrução das vias aéreas pode resultar também em enfisema e colapso da porção distal do pulmão (Polak *et al.*, 2004).

Pacientes prematuros, idosos, com cardiopatias congênitas, portadores de leucemia, imunocomprometidos, tais como receptores de transplantes e pacientes

portadores de HIV, podem evoluir para um quadro clínico mais grave, dependendo muito da magnitude da imunodepressão (Figueiredo, 2009).

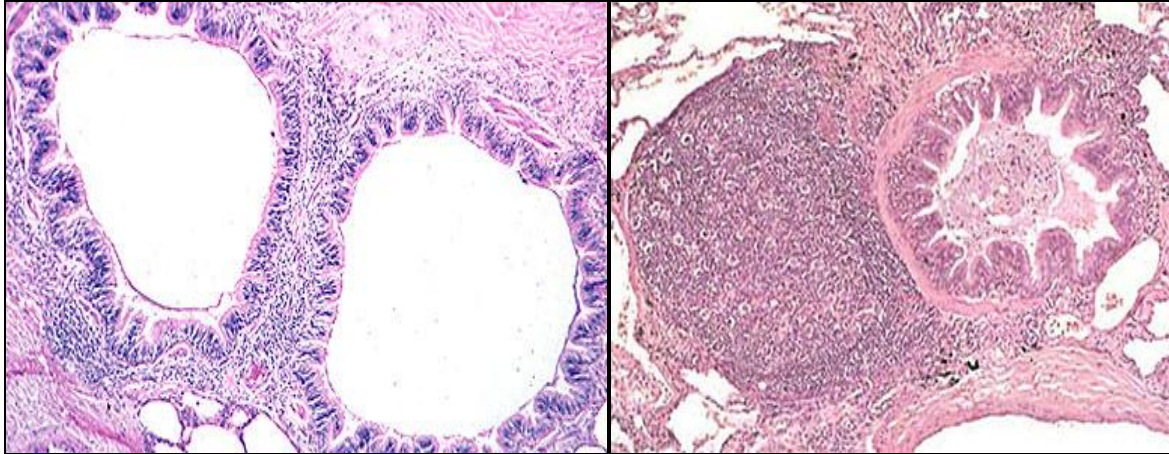


FIGURA XI: Histologia do bronquíolo normal e da obstrução bronquiolar provocada pelo VRSH.

Fonte: Sistema Nervoso, 2004/2005.

2.9.1 - Pneumonia adquirida na comunidade (PAC)

Como definição, a pneumonia é uma infecção aguda do parênquima pulmonar, distal às vias aéreas de condução e envolvendo os bronquíolos respiratórios e as unidades alveolares. Se expressa clinicamente por febre ou hipotermia, calafrios, sudorese, dispnéia e tosse de início recente, acompanhada ou não de expectoração, ou alteração da coloração das secreções respiratórias em doentes com tosse crônica, associados a uma síndrome esteto-acústico de condensação (Bártholo *et al.*, 2009, Figueiredo *et al.*, 2009). O seu diagnóstico é baseado na presença de sinais e sintomas citados anteriormente e pela demonstração radiológica de um infiltrado pulmonar (**FIGURA XII**) (Halm *et al.*, 2002). A dosagem de PCR tem sido utilizada na tentativa de diferenciar a etiologia da infecção sendo que dosagens acima de 40mg/dL são

usualmente sugestivas de infecção bacteriana, porém o diagnóstico definitivo se dá pelo resultado da cultura bacteriana (Diniz *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2009).

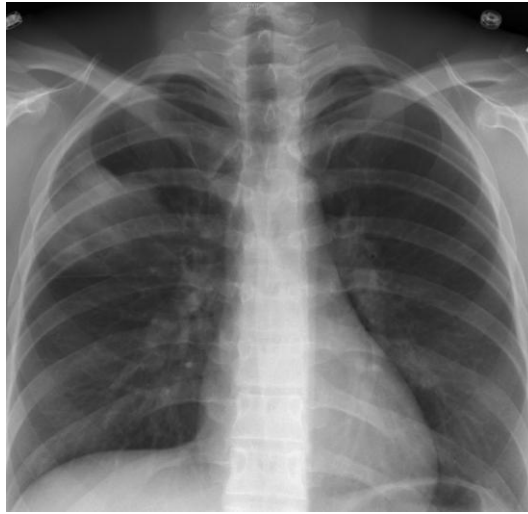


FIGURA XII: Quadro clássico radiológico de PAC com infiltrado presente no lobo superior direito do paciente.

Fonte: Instituto Evandro Chagas, 2006

Entre as infecções respiratórias agudas do trato respiratório inferior, a PAC é a principal causa de morbidade e mortalidade infantil, especialmente em países em desenvolvimento, requerendo um grande consumo de recursos econômicos e sociais. Nos EUA contribui para 1,7 milhões de admissões hospitalares e é a mais comum causa de morte associada a doenças infecciosas (Bártholo *et al.*, 2009; Niederman *et al.*, 2007), principalmente as que acometem a faixa etária inferior aos cinco anos de idade (McIntosh, 2002).

A incidência anual de pneumonias em crianças menores de cinco anos é de 30 a 40 casos por 1.000 habitantes na Europa e na América do Norte e, nos países em desenvolvimento, as pneumonias na infância apresentam-se de forma mais grave causando maior mortalidade (McIntosh, 2002). O Fundo para as Nações Unidas para a Infância (UNICEF) estima que mais de três milhões de crianças morram de pneumonia

a cada ano, predominantemente nos países em desenvolvimento (Rodrigues *et al.*, 2002). No Brasil, as pneumopatias agudas são responsáveis por 11% das mortes em crianças com idade inferior a um ano, e por 13% na faixa etária entre um e quatro anos (Rodrigues *et al.*, 2002).

2.9.2 – Pneumonia Viral

O VRSV e o vírus da Influenza A são os agentes mais comumente implicados na pneumonia viral, especialmente durante a lactância, porém, diversos outros vírus estão associados também como agentes de pneumonia, incluindo o adenovírus, vírus Influenza B, parainfluenza 1, 2 e 3, rinovírus e coronavírus 229E, OC43 e mais recente o Bocavírus (Bártholo *et al.*, 2009, Silva *et al.*, 2010)

Define-se pneumonia viral como aquele acometimento em que ocorre anormalidade nas trocas gasosas em nível alveolar, acompanhada por inflamação do parênquima pulmonar. O fenômeno inflamatório do pulmão, comumente, traduz-se em anormalidades de imagem detectáveis por radiografia. Nas pneumonias virais, os quadros clínicos são muito variáveis, dependendo do agente infectante, bem como da idade e do estado imune do hospedeiro (Figueiredo *et al.*, 2009).

Por outro lado, além da pneumonia primária, os vírus, ao lesarem a mucosa do trato respiratório, prejudicam seus mecanismos locais de defesa, favorecendo assim o surgimento de pneumonias bacterianas secundárias. Além disso, algumas doenças crônicas, a insuficiência cardíaca e mesmo a gravidez têm sido descritas como associadas a um maior risco de pneumonias causadas por vírus (Treanor, 2002).

Estudos sobre a patogênese da pneumonia por influenza mostram que o vírus, em casos de diferentes gravidades, acomete pneumócitos como alvo primário,

com dano alveolar difuso. A submucosa apresenta-se hiperêmica, com hemorragias focais, edema e infiltrado celular associado ao processo intra-alveolar, contendo neutrófilos, células mononucleares com fibrina e fluido edematoso. Em uma fase mais avançada da infecção, ocorre organização fibrocelular intra-alveolar (bronquiolite obliterante com pneumonia em organização) com presença de histiócitos e pneumócitos multinucleados (Ng *et al.*, 2006). Com relação ao VRSH tem sido observada intensa replicação viral local, resposta pró-inflamatória exacerbada e um alto nível de ativação das células T (Buchholz *et al.*, 2009).

Não existem critérios clínicos em pacientes com pneumonia que sugiram, com absoluta segurança, a etiologia viral. Além disso, existem dificuldades no diagnóstico etiológico geral das pneumonias e, particularmente, no daquelas por vírus, o que limita o conhecimento sobre essas doenças e sobre seus agentes causadores (Figueiredo *et al.*, 2009). Quadros clínicos de maior gravidade também têm sido associados a elevadas cargas virais. Inversamente, anticorpos neutralizantes parecem exercer um efeito protetor contra as formas graves (Borges *et al.*, 2007).

2.9.3 – População de risco para infecção pelo VRSH

Vários fatores de risco contribuem para o aumento da incidência e/ou da gravidade das pneumonias virais em crianças como fatores demográficos (sexo, idade), socioeconômicos (renda familiar, educação dos pais), ambientais (poluição atmosférica e intradomiciliar, aglomeração), nutricionais (baixo peso ao nascer, desnutrição, desmame precoce e deficiência de vitamina A), dentre outros (Bohland *et al.*, 1999).

Algumas características especiais como sazonalidade, imunidade não permanente, presença de dois sorotipos diferentes e ausência de anticorpos específicos fazem com que o VRSH esteja associado à doença de maior morbidade em

populações de alto risco. Nesse sentido é fundamental que sejam instituídas medidas profiláticas. Atualmente, a Academia Americana de Pediatria entende como população de risco os prematuros, os infantes com doença pulmonar crônica associada a prematuridade (anteriormente chamada de Displasia Bronco-Pulmonar), as cardiopatias congênitas, os portadores de doenças neuromusculares e pacientes com imunodeficiência (Committee of Infectious Disease, 2003).

O **QUADRO II** apresenta a população que é considerada de risco, devido à sua maior susceptibilidade a doenças respiratórias, e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sua gênese.

QUADRO II: Mecanismos Fisiológicos envolvidos na população de risco para o VRSH.

Fatores de Risco	Consequências
Prematuros	Aparelho respiratório imaturo Baixos níveis de anticorpos maternos
Doença Pulmonar Crônica (Displasia broncopulmonar)	Lesão da árvore brônquica Função pulmonar reduzida
Cardiopatias Congênitas	Comprometimento da circulação pulmonar Hipertensão pulmonar Fluxo sanguíneo pulmonar aumentado
Doenças Neuromusculares	Diminuição da capacidade muscular respiratória funcional
Imunodeficiência	Mecanismos imunes inatos e adquiridos inadequados

Fonte adaptada de: Sociedade Brasileira de Pediatria, 2010.

2.10 – Epidemiologia

O VRSH é o agente etiológico mais prevalente nas infecções respiratórias da infância. Virtualmente todas as crianças são infectadas por este agente até os dois anos de idade. A maioria das infecções é sintomática e segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (setembro de 2009) o VRSH possui uma distribuição mundial

amplamente difundida, principalmente em países industrializados em desenvolvimento, como o Brasil. Apenas nos EUA são reportados anualmente 125.000 casos de infecção respiratória pelo VRSH. Mundialmente são estimados 64 milhões de casos de infecção pelo VRSH, com aproximadamente 160.000 mortes por ano em decorrência de complicações causadas pela infecção (WHO, 2009).

2.10.1 – Na América Latina

A ocorrência do VRSH na América Latina é comparável ao observado em países desenvolvidos. Os estudos revelam uma prevalência elevada de infecções respiratórias baixas nos primeiros dois anos de idade ocasionada pelo VRSH (Law *et al.*, 2002). A Tabela II apresenta alguns estudos e suas respectivas prevalências.

TABELA II: Estudos de prevalência do VRSH na América Latina.

Autor, ano	País	Amostra	Período	População estudada	Prevalência VRSH (%)
Avedaño, 2003	Chile	531	Abr – out, 2003	< 2 anos com ITRB – consultas/admissões	52,7
Baumeister, 2003	Argentina	254	2002	< 2 anos com ITRB – hospitalizações	44,5
Calvillo, 2001	México	98	1989 – 1997	< 2 anos com óbitos por pneumonia	30,0
Carballal, 2001	Argentina	1.278	1993 – 1994	< 5 anos com ITRB – hospitalizações	25,3
Carballal, 2000	Argentina	1.304	1990 - 1996	< 2 anos com ITRB – hospitalizações	26,9

* ITRB = Infecção do trato respiratório baixo

Fonte adaptada de: Sociedade Brasileira de Pediatria, 2010

Avedaño e colaboradores estudaram 16.947 crianças menores de dois anos de idade, atendidas em ambulatórios, unidades de emergência ou hospitalizadas. Os autores verificaram que durante o período considerado de maior probabilidade de infecção do VRSH no Chile, foram internadas 531 crianças devido à infecção do trato

respiratório baixo (ITRB), sendo que o VRSH foi identificado como o agente etiológico em 52,7% destes casos (Avedaño *et al.*, 2003).

Na Argentina, Baumeister e colaboradores publicaram em 2003 um estudo com 254 crianças hospitalizadas por ITRB. Em 113 casos (44,5%) o agente etiológico foi o VRSH (Baumeister *et al.*, 2003). No mesmo país, Carballal e colaboradores, estudaram 1278 crianças com menos de 5 anos de idade, internadas por ITRB. Destas, 74% eram menores de um ano. Em 25,3% dos casos o VRSH foi o agente etiológico responsável. Este achado correspondeu a 78,2% de todos os casos com etiologia viral comprovada (Carballal *et al.*, 2001). Os estudos na América Latina revelam uma incidência situada entre 25,3 e 44,5% (Avedaño *et al.*, 2003; Bedoya *et al.*, 1996; Calvillo *et al.*, 2001; Carballal *et al.*, 2000).

2.10.2 – No Brasil

No Brasil, a prevalência do VRSH varia de 21 a 67,8%. As variações dos achados dependem da região estudada, população e metodologia empregada. Cox e colaboradores publicaram dados de estudo prospectivos durante o ano de 1991 no interior de São Paulo em crianças de zero a 24 meses. O resultado mostrou que toda a população estudada possuía níveis de anticorpos anti-VRSH, do tipo IgG, ao final de 24 meses de vida. Neste estudo, os níveis de anticorpos no cordão umbilical estão elevados, diminuindo nos primeiros meses. O aumento inicia a ocorrer a partir do oitavo mês de vida por exposição ao VRSH (Cox *et al.*, 1998).

O estudo realizado por Vieira e colaboradores, na cidade de São Paulo, no período de março de 1995 até março de 1996, em menores de 15 anos, revelou uma prevalência de 55% de VRSH em crianças menores de um ano. Estes dados foram obtidos através da análise do aspirado de nasofaringe no momento da

internação hospitalar (Vieira *et al.*, 2001). Em outro relato envolvendo recém-nascidos internados por bronquiolite e/ou pneumonia, Vieira encontrou uma prevalência de 44,4% de VRSH (Vieira *et al.*, 2002; Straliozzo *et al.*, 2002).

Em Porto Alegre (RS), em dois estudos publicados por Straliozzo e colaboradores, no período de 1990 até 1995 e no ano de 1998, revelaram que a presença do VRSH foi a infecção respiratória mais frequente em menores de um ano de idade, com uma prevalência geral de 26% (Straliozzo *et al.*, 2001). Pitrez e colaboradores, em Porto Alegre, encontraram em crianças com bronquiolite aguda com menos de 6 meses de idade, a prevalência de 94,3% para VRSH (Pitrez *et al.*, 2005).

Moura e colaboradores avaliaram a um segmento populacional da cidade de Salvador (BA) com idade inferior a 5 anos com doença respiratória aguda, de janeiro a dezembro de 1998. A investigação revelou que a maior prevalência de VRSH, em infecções respiratórias baixas, foi em pacientes menores de um ano de idade, atingindo 60% dos casos (Moura *et al.*, 2003).

Na cidade de Vitória (ES), a prevalência do VRSH no primeiro ano de vida chega a 60%, conforme relatado por Checon e colaboradores (2002). Não obstante, como pode ser observada, a prevalência do VRSH no Brasil é muito elevada nas infecções respiratórias do trato respiratório baixo, principalmente nos pacientes menores de um ano de vida. Nesta população, a prevalência é superior a 50% dos casos. O VRSH também é o agente responsável pela maioria das internações em unidades neonatais em casos de infecções respiratórias (Vieira *et al.*, 2003).

Recentemente, Salomão Junior e colaboradores indicaram a alta prevalência da infecção do VRSH em pacientes pediátricos. Foram investigados pacientes hospitalizados no estado de São Paulo com ITRB (Salomão Junior *et al.*,

2011). No mesmo ano, de Paulis e colaboradores, no estado de São Paulo, detectaram em pacientes hospitalizados oito espécies de vírus respiratórios, e então, estes resultados foram correlacionados com o tempo de hospitalização e a necessidade de ventilação mecânica. Os resultados apontaram que a coinfeção viral não interferiu no prognóstico do paciente (de Paulis *et al.*, 2011).

A **FIGURA XIII** apresenta dados provenientes do DATASUS que são referentes à internação por pneumonia, de todas as etiologias, na cidade de Belém, nos anos de 2004 a 2007, onde se observa que do mês de janeiro ao mês de junho há um aumento no número de casos na cidade, período semelhante ao descrito por Santos (2006) na região em pacientes ambulatoriais positivos para o VRSH.

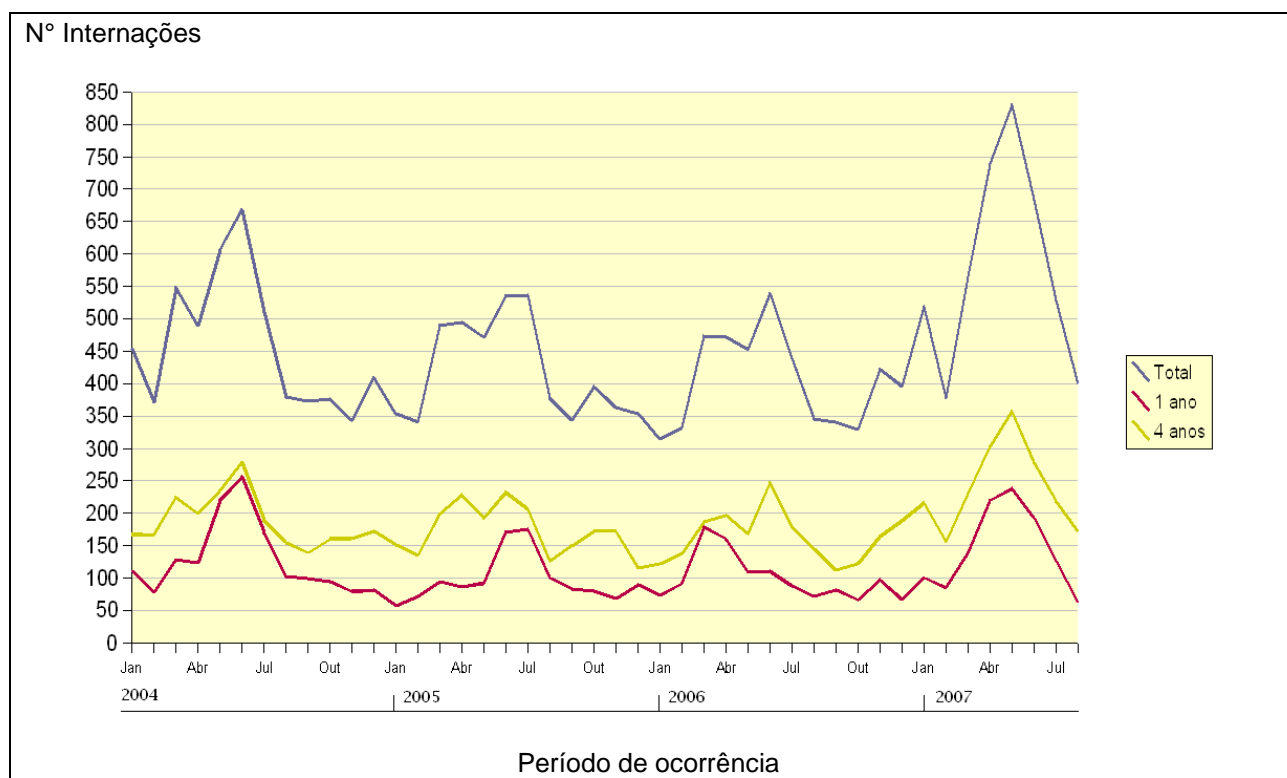


FIGURA XIII: Admissão Hospitalar – SUS: Dados de internação por pneumonia, de todas as etiologias, na cidade de Belém, segundo faixa etária.

Fonte: DATASUS, 2008.

2.10.3 – Dos subtipos virais

Independentemente da sazonalidade, a gravidade da doença no trato respiratório pode variar a cada surto. Flutuações no grupo e cepas circulantes podem contribuir para a variação da gravidade anual de cada surto (Hall *et al.*, 1990).

O padrão de circulação dos tipos virais A e B aparece com grande variação de acordo com a região e com o ano. Vários estudos demonstram que os dois subtipos têm circulado concomitantemente em muitas epidemias em diversas regiões do mundo, com predominância de um deles. Há também variantes dos grupos A e B circulando concomitantemente (Stensballe *et al.*, 2003).

Os dados disponíveis na literatura são por vezes conflitantes, não ficando clara a existência ou não de diferenças de patogenicidade entre os grupos (Santos, 2008). Após a descoberta que o VRSH apresentava dois grupos antigênicos, passou-se a especular se haveria influência dos tipos de vírus na gravidade da doença. Alguns estudos concluíram que as infecções pelo tipo A resultam em doenças mais graves (Falsey *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 1990), por outro lado, outros autores descrevem maior gravidade em crianças infectadas pelo grupo B (Zelaya *et al.*, 1994; Hornsleth *et al.*, 1998). Outros estudos não encontraram relação de maior ou menor gravidade da doença com o tipo do vírus, mas sim com a quantidade da carga viral presente na secreção (Buckingham *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2001)

Com base nos dados de sequências de nt dos genes G e F do VRSH, foi identificada a circulação dos subgrupos A e B e os genótipos GA2, GA5 e SSA1 (subgrupo A) (Botosso *et al.*, 2009). O genótipo SAA1 foi identificado pela primeira vez no sul da África (Venter *et al.*, 2001). Os genótipos GA2 e GA5 predominantes durante

o período estudado, e a ocorrência destes foi observada também em países vizinhos ao Brasil, como Argentina e Uruguai (Frabasile *et al.*, 2003; Galiano *et al.*, 2005).

As sequências analisadas como pertencentes ao subgrupo B foram identificadas em três genótipos distintos dentro desse subgrupo, notadamente GB3 (SAB3) e BA (BAIII). O genótipo do subgrupo B identificado como BA foi isolado pela primeira vez na Argentina, tendo como principal característica deste genótipo a duplicação de 60 nts na posição após o resíduo 792 do gene G (Trento *et al.*, 2003).

No Brasil, nas cidades de Porto Alegre e Ribeirão Preto, revelaram padrões de circulação do VRSH e co-circulação de ambos os subgrupos com alternância de predominância dos subgrupos A e B de ano para ano (Cintra *et al.*, 2001; Straliozzo *et al.*, 2001). Na cidade de Salvador, análises filogenéticas revelaram a presença dos dois subgrupos e os genótipos GA2, GA5 e GA7 (subgrupo A), SAB3 e GB3 (subgrupo B) circulantes no Brasil (Botosso *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2004).

Na cidade de Belém (PA), entre janeiro de 2000 a maio de 2006, foram diagnosticados 153 casos de infecção respiratória aguda, em amostras de pacientes ambulatoriais, associados ao VRSH. A maioria dos casos (90,19%) tinha idade igual ou inferior a quatro anos e o período de maior ocorrência concentrou-se nos seis primeiros meses do ano, com predominância nos meses de abril e maio, sendo que no ano de 2001 foi observado um segundo pico de atividade, nos meses de setembro e outubro. Este estudo revelou também, a co-circulação dos vírus A e B nos anos de 2001 e 2003, com predominância do subgrupo B em ambos os anos (Santos, 2006).

2.11 - Diagnóstico

O diagnóstico efetivo das infecções respiratórias virais, bem como o reconhecimento e entendimento dos benefícios e limitações dos testes laboratoriais são essenciais para evitar o uso desnecessário de antibióticos e evitar infecções nosocomiais, nas quais o VRSH apresenta-se frequentemente envolvido (Henrickson *et al.*, 2007).

Os espécimes clínicos de escolha são, geralmente, *swab* nasal e aspirado de nasofaringe, devendo ser transportados em gelo e mantidos a 4°C até o processamento, já que o congelamento pode gerar perda da infecciosidade (Santos, 2008).

2.11.1 – Isolamento Viral

Para otimização no diagnóstico das infecções respiratórias virais agudas, várias técnicas virológicas necessitam ser empregadas. Um dos métodos diagnósticos mais utilizados para detecção do VRSH é o isolamento viral em culturas celulares. Esta técnica permite a “multiplicação” de pequenas quantidades de vírus que estão presentes na amostra. A presença do vírus é observada pelo aparecimento do efeito citopatogênico (ECP) visível ao microscópio óptico (Santos, 2008).

Este método é considerado o teste padrão ouro para o diagnóstico do VRSH, que cresce em uma variedade de linhagens celulares, porém é mais bem cultivado em células epiteliais humanas, tais como a HEp-2 (carcinoma epitelial de laringe humana) e HeLa (carcinoma epitelial de cervix humano). Outras linhagens como Vero (derivada de rim de macaco verde) e fibroblastos humanos também são úteis para o isolamento, porém não são tão sensíveis quanto às linhagens epiteliais humanas. A

linhagem celular considerada mais eficiente para o isolamento e propagação do VRSH é a HEp-2 (Santos, 2008).

O aparecimento do ECP, ou seja, a formação de células gigantes e sincícios resultante da fusão de células (**FIGURA XIV**), ocorre em geral de 3 a 7 dias ou mais da inoculação do vírus (van Elden *et al.*, 2002). Embora o vírus cresça em uma variedade de linhagens celulares, o ECP e o título viral dependem da cepa viral e das condições das células. Títulos maiores que 10^7 PFU/ml são difíceis de serem obtidos, principalmente em amostras isoladas de adultos, já que a excreção neste grupo é considerada baixa (até 10^3 PFU/ml) e de curta duração (3 a 4 dias). Por isso, a sensibilidade do isolamento viral nesta faixa é menor que em crianças, visto que a excreção do vírus é maior (10^6 PFU/ml) e com uma duração de 21 dias em crianças hospitalizadas com comprometimento do trato respiratório inferior (Santos, 2008).

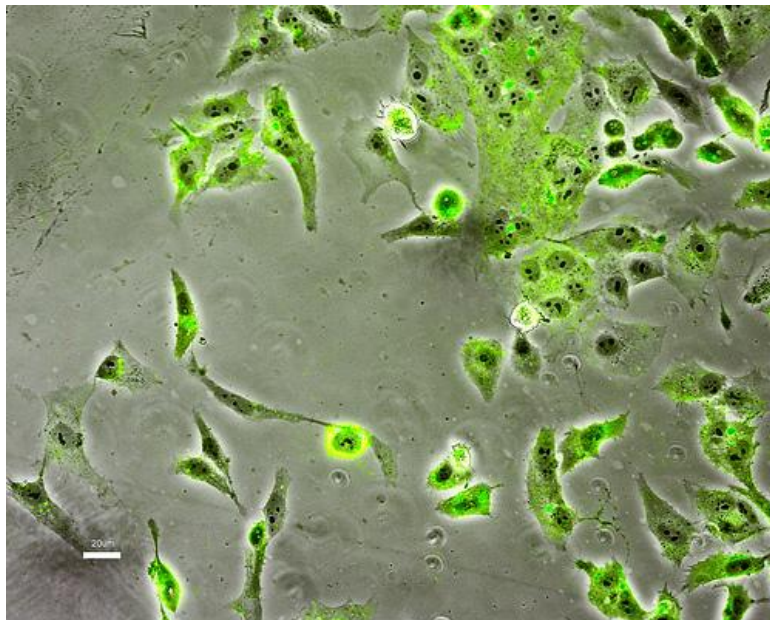


FIGURA XIV: Cultivo de células HEp-2 infectado pelo VRSH

Fonte: Flickr, 2011.

Vários fatores podem interferir, entretanto, na eficácia do isolamento, destacando-se, por exemplo, as condições de coleta e o manuseio das amostras. O VRSH é um vírus termolábil, necessitando de condições adequadas para o transporte, tais como rapidez (entre uma e duas horas após a coleta) e refrigeração (4°C), pois a infectividade do vírus na amostra clínica pode cair rapidamente à temperatura ambiente (Falsey e Walsh, 2000). Alguns trabalhos sugerem que as amostras virais devem permanecer a 4°C de 3 a 5 horas e depois devem ser estocadas a -70°C, podendo, desta forma, as amostras permanecerem viáveis (Kellogg *et al.*, 1991, Santos, 2008).

Outro fator que pode interferir no isolamento viral é a presença de bactérias ou enterovírus, diminuindo ou até mesmo anulando o ECP produzido pelo VRSH (Kellogg *et al.*, 1991). Atualmente a cultura que apresenta ECP para o VRSH é confirmada por imunofluorescência com anticorpos monoclonais (van Elden *et al.*, 2002).

2.11.2 – Imunofluorescência (IF)

A técnica de IF é largamente utilizada para a detecção do VRSH em células epiteliais de nasofaringe ou para a confirmação do isolamento viral em cultura. Este teste é um método rápido e de fácil execução quando comparado ao isolamento, o que resulta em menor tempo de trabalho, porém requer técnico bem treinado para a leitura, já que se pode ter inespecificidade devido à presença de muco na amostra (Santos, 2008, Tristam & Weliver, 1996). A **FIGURA XV** apresenta um resultado positivo para pesquisa de VRSH.

Os padrões de fluorescência observados dependem dos anticorpos monoclonais utilizados: contra as glicoproteínas de superfície (G e F) apresentam um padrão de fluorescência de membrana, enquanto que monoclonais contra proteínas do

nucleocapsídeo (N e P) apresentam padrão citoplasmático de fluorescência (Tristam e Weliver, 1996).

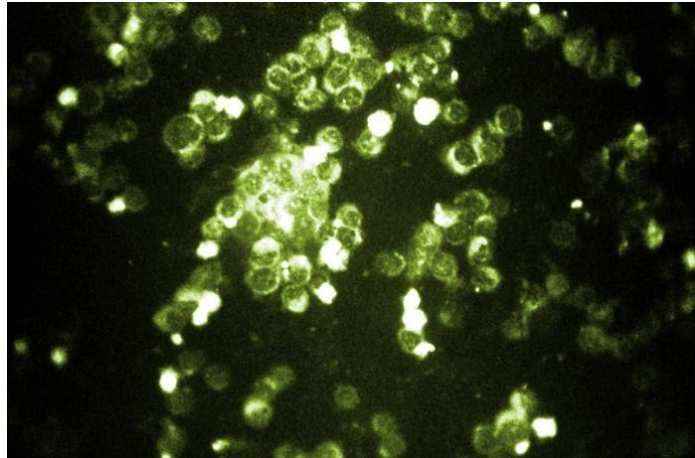


FIGURA XV: Teste de imunofluorescência positivo para VRSH

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2011.

A qualidade da amostra clínica deve ser levada em consideração, contendo um bom número de células, por isso a coleta deve ser realizada por técnico treinado, além de ter um transporte e um processamento adequados para que as células não sejam destruídas (Tristam & Weliver, 1996).

2.11.3 – RT-PCR

Os métodos de diagnóstico molecular como a RT-PCR (reação em cadeia por polimerase após transcrição reversa) e hibridação também são muito utilizadas neste diagnóstico, principalmente quando a quantidade e o período de excreção são pequenos (Ong *et al.*, 2001).

É uma técnica de amplificação usada para sintetizar, *in vitro*, sequências específicas de DNA. Inicialmente o RNA alvo é isolado de tecidos, fluidos do paciente ou de cultura de células infectadas, em seguida este é convertido de DNA

complementar (cDNA) por transcrição reversa antes de começar o processo de amplificação. A partir desta etapa o DNA é amplificado enzimaticamente através da PCR (Santos, 2008) (**FIGURA XVI**).

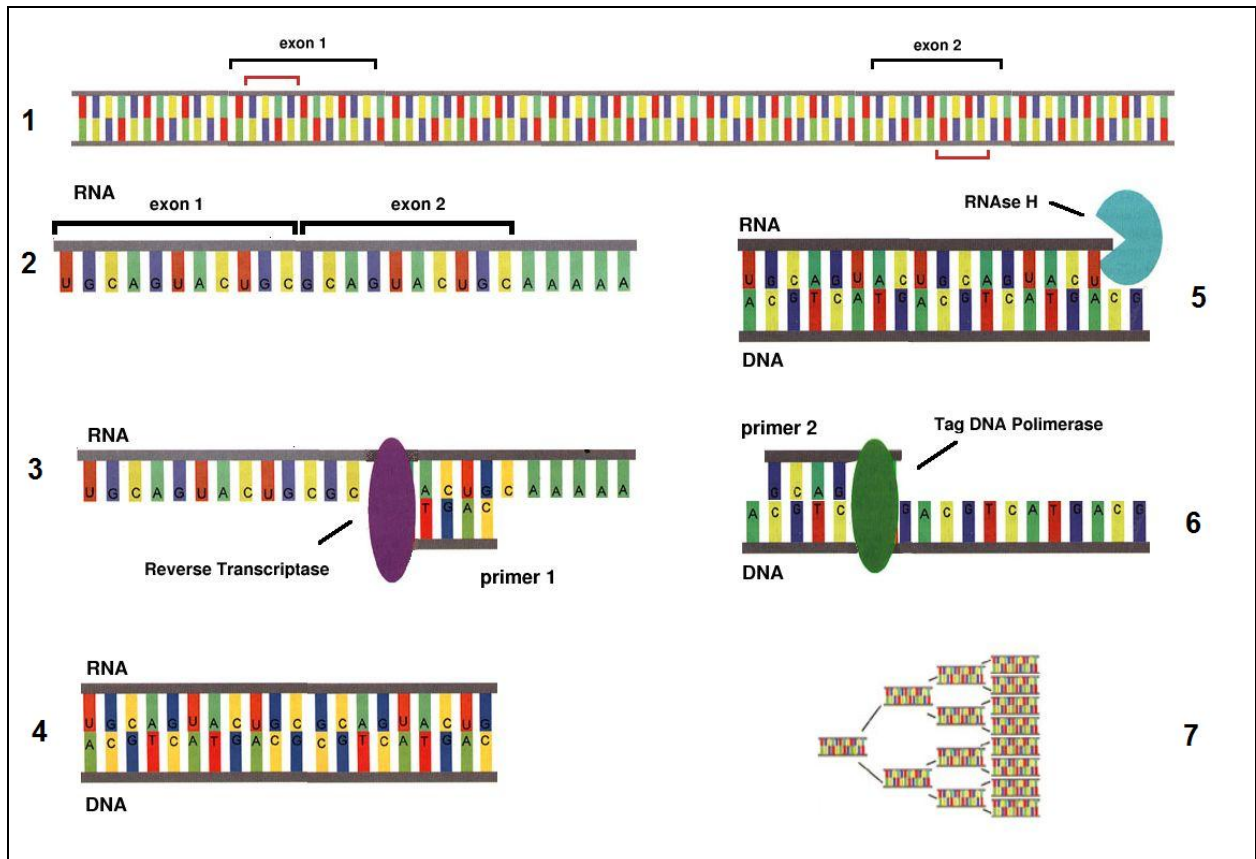


FIGURA XVI: Esquema representativo das etapas da RT-PCR.

Fonte: Blogspot, 2011

O produto amplificado é denominado de “amplicon”, e este pode ser detectado por hibridização com sondas específicas ou visualizado após eletroforese e coloração do gel (Santos, 2008) (**FIGURA XVII**).

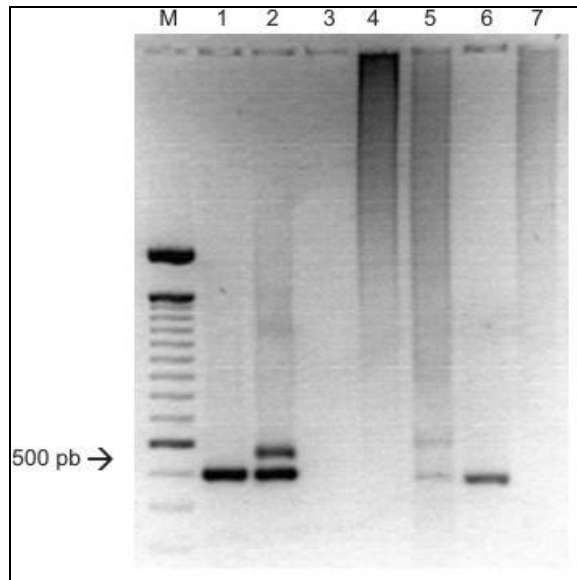


FIGURA XVII: Exemplo da detecção do VRSH pela RT-PCR com visualização em gel de agarose.

Nota: (M) Peso molecular; (1) e (2) controles positivos; (3) e (4) amostras negativas; (5) e (6) amostras positivas e (7) controle negativo.

Fonte: Scielo, 2011

2.11.4 – PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real oferece a habilidade de monitorar o progresso da reação no momento que ela está ocorrendo de modo que não é necessário o ensaio pós-analítico da PCR convencional (eletroforese em gel de agarose). Neste método a reação é caracterizada pelo ponto no tempo dentro de um ciclo, no qual a amplificação do DNA alvo é primeiramente detectada (**FIGURA XVIII**). Desta maneira quanto mais cedo for observado o início da amplificação do DNA alvo, maior será o nível de fluorescência detectado e, conseqüentemente, o número de cópias detectadas será maior em uma proporção direta (Low *et al.*, 2008).

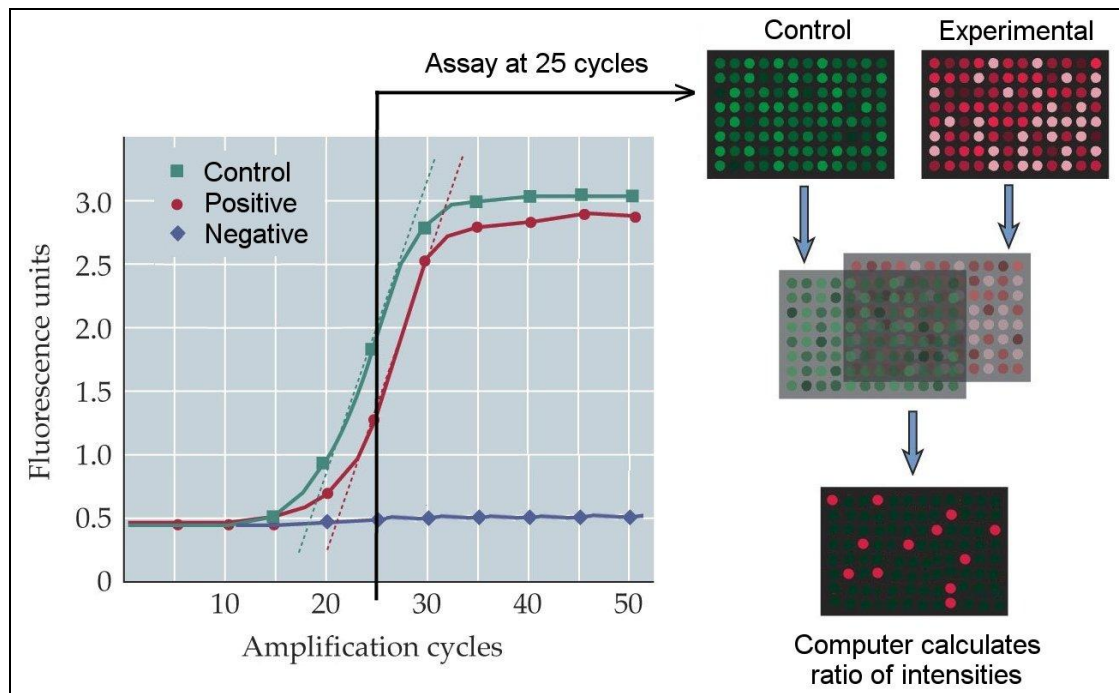


FIGURA XVIII: Esquema demonstrativo da PCR em tempo real.

Fonte: Memorial University of Newfoundland, 2011

Novos equipamentos de biologia molecular, como a LC-RT-PCR (“Light Cycler Reverse Transcriptase PCR”), desenvolvido pela Roche Diagnostics, que mostrou ser altamente específico e rápido. É uma tecnologia que transfere energia de ressonância fluorescente (FRET) para duas sondas de hibridação (marcadas com Fluoróforo). Estas sondas são continuamente monitoradas no processo de amplificação dos “amplicons”, sendo por isso denominada também de PCR em tempo real (Santos, 2008).

Outras químicas baseadas na técnica de PCR em tempo real têm sido descritas para a detecção genômica dos vírus, como Syber Green, Taq Man, Lux, Scorpion (Borg *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2003; Van Elden *et al.*, 2003). A PCR em tempo real diminui a manipulação de “amplicons”, é reprodutível e também pode ser utilizada para quantificar o ácido nucléico (Mackay *et al.*, 2002; Santos, 2008).

2.11.5 – Teste sorológicos

Quanto aos diagnósticos sorológicos, estes podem ser feitos pelas reações de neutralização e fixação de complemento, atualmente pouco utilizados pelo difícil trabalho. Também se pode realizar a determinação de imunoglobulinas classe específica (IgM e IgG), através da técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA). O diagnóstico é feito com base no aumento de título entre as fases aguda e de convalescença. Pode ser realizado no soro, na saliva ou em aspirado de nasofaringe (Wilson *et al.*, 2000), contudo a sorologia não permite o diagnóstico rápido da doença, já que os anticorpos só surgem após a fase aguda. Além disso, a sorologia apresenta valor limitado no diagnóstico de infecção primária em crianças menores de 6 meses de idade, pois 40% destas não apresentam aumento do título de anticorpos. Em adultos e crianças maiores, entretanto, a sorologia é considerada como um bom indicador de re-infecções (Cox *et al.*, 1998, Santos, 2008).

Estes testes possuem algumas vantagens quando comparados a fluorescência, já que não necessitam de células intactas do trato respiratório, e pelo seu potencial de automação que permitem o processamento de um número grande de amostras simultaneamente (Santos, 2008). A desvantagem da técnica é que esta parece não ser tão sensível quanto a IF, além de poder apresentar resultados falso-positivos (Abels *et al.*, 2001; Santos, 2008).

2.12 - Imunidade:

A imunidade do VRSH é mediada via respostas humoral e celular, incluindo anticorpos séricos (adquiridos como resultados da infecção ou de origem materna), anticorpos de mucosas e MHC-I restrito a Linfócito T citotóxico. A imunidade adquirida para o VRSH mostra-se incompleta e de curta duração, portanto repetidas

infecções ocorrem ao longo da vida, como demonstrado por diversos estudos. Observa-se que crianças expostas a uma epidemia de VRSH são reinfectadas na frequência de 74% e 65% na segunda e terceira epidemias, respectivamente (Collins *et al.*, 2001).

No processo de reinfeção, observa-se que o VRSH não produz uma imunidade substancial a infecções subsequentes. Entretanto, a severidade das doenças geralmente decai (Black *et al.*, 2003).

O VRSH replica primeiramente no epitélio respiratório. Por essa razão, anticorpos neutralizantes séricos não previnem a infecção. Entretanto, altos títulos de anticorpos neutralizantes séricos contra VRSH fazem a proteção do trato respiratório inferior, como demonstrado em estudos com animais (Prince *et al.*, 1985). Em outra pesquisa, observou-se que altos títulos de anticorpos contra VRSH derivados da mãe têm uma relação inversa com a incidência de infecções por VRSH e a gravidade da pneumonia nos seis primeiros meses de vida (Black *et al.*, 2003).

A primeira infecção por VRSH nem sempre induz uma resposta imune que protegerá o trato respiratório inferior, essa fraca proteção pode ser explicada, em parte, pela especificidade ao subgrupo viral (A ou B). As crianças primo-infectadas por VRSH desenvolvem uma resposta com anticorpos neutralizantes específicos para a cepa infectante, e não a cepas heterólogas. Somado a isso, infantes desenvolvem níveis de anticorpos neutralizantes contra as proteínas de superfície F e G apenas na percentagem de 15 a 25% (Hendry *et al.*, 1989).

2.13 – Resposta celular e humoral do hospedeiro

No caso de resposta imune celular, em estudo feito também com modelo animal, demonstrou-se que ambos os subgrupos de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ são importantes na resolução da infecção primária. Os linfócitos TCD8⁺, juntamente com as células “Natural Killer” (NK) podem modular a resposta imune mediante a secreção de linfocinas antivirais (Domaschowske & Rosenberg, 1999).

No combate à infecção atuam grupos de citocinas tais como, IL-6, IL-8 e Fator de Necrose Tumoral – α (TNF- α), que podem ter efeito antiviral direto. As citocinas são responsáveis também pela atração e ativação de subgrupos de leucócitos como os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T e células NK. A participação destas células na resposta imune pode atuar como desencadeadora das lesões e sintomas observados em pacientes infectados por VRSH quer seja pela ação direta às células infectadas ou por liberação de citocinas pró-inflamatórias. Como exemplo, a degradação eosinofílica libera compostos vasoativos, histamina e leucotrieno 4, que podem atuar como mediadores potenciais de broncoespasmos. Assim como a ação dos linfócitos TCD8⁺, quando de forma exacerbada, pode danificar o tecido pulmonar (Collins *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de um quadro clínico mais grave com a administração do vírus inativado com formalina gerou uma demanda no estudo das relações do VRSH com o sistema imune. Uma série de dados aponta que o vírus produz uma forma solúvel da proteína G durante a infecção e que esta proteína estimula a liberação de uma série de citocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, envolvidas na resposta do tipo Th2. Desta forma, o vírus causa um desvio da resposta imune, um processo similar ao causado por agentes alergênicos (Becker, 2006). Comprovando esta teoria, o uso de um epítipo indutor de resposta imune celular da proteína M2, fusionado à proteína

G e expresso por um vírus vacínia recombinante, foi capaz de reduzir o desvio da resposta imune para Th2, estimulando um grande número de células TCD8⁺ e gerando proteção contra VRSH em camundongos (Zeng *et al.*, 2006).

Outro aspecto interessante da infecção é que não há proteção eficaz contra re-infecção, ou seja, o vírus é capaz de evadir os sistemas de defesa do organismo. Um mecanismo importante para este processo é a inibição da resposta por INF do tipo I, responsável por gerar um estado antiviral na célula e um dos principais mecanismos de resposta inata do organismo. Foi demonstrado que a proteína NS2 é capaz de inibir a cascata de sinalização JAK-STAT, impedindo a indução de INF (Spann *et al.*, 2004; Kotelkin *et al.*, 2006).

Uma série de outros mecanismos, revisados por Simabuco (2008), são atribuídos à infecção pelo VRSH para explicar a evasão do sistema imune, tais como: diversidade na sequência da proteína G, um dos principais antígenos protetores; interferência nas funções dos macrófagos e das células dendríticas, como inibição da maturação destas últimas pelas proteínas NS1 e NS2; tropismo pelas células da superfície do lúmen pulmonar, onde a eficiência do sistema imune é menor; inibição da apoptose por uma série de proteínas virais; como NS1, NS2 e SH; e apesar de ser altamente infeccioso, o vírus é pouco invasivo.

2.14 – Tratamento e profilaxia

O tratamento da infecção pelo VRSH consiste na remoção mecânica das secreções, administração de oxigênio umidificado, posicionamento adequado da criança a fim de facilitar a respiração e em casos mais graves, assistência respiratória (Collins *et al.*, 2001). Uma terapia efetiva ainda não está disponível e a eficácia de corticoesteróides e broncodilatadores ainda não está bem definida. Estudos sobre a

vitamina A, interferon e antibióticos são, até o momento, desapontadores (Kneyber *et al.*, 2000).

O uso da ribavarina, um antiviral análogo do nucleosídeo guanosina, é controverso. Quando administrada oralmente, a droga apresenta moderada toxicidade hepática e da medula óssea e quando aplicada sobre a forma de aerossol, parece ter pouca ou nenhuma toxicidade sistêmica. Esta licenciada desde 1986 e seu uso é indicado na forma de aerossol para tratamento de doenças graves causadas pelo VRSH (Committee on Infectious Diseases, 1993). Apesar de a ribavarina diminuir a quantidade de partículas virais secretadas pelo paciente e aumentar seus níveis de oxigenação, não há evidências de que haja diminuição das taxas de mortalidade, duração da hospitalização ou necessidades de terapia de suporte (Collins *et al.*, 2001). Além disso, o tratamento utilizado requer altas doses para ser eficaz e a administração por aerossol é prolongada, durando de 12 a 18 horas diárias e mais de sete dias de aplicação. Por isso a ribavarina possui uma eficácia clínica limitada no tratamento de infecções por VRSH (Jafri *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2004).

Após o período de incubação do vírus no trato respiratório superior de três a cinco dias, pode ocorrer a ITRB. Esse período possibilita uma intervenção terapêutica efetiva, pela utilização de moléculas inibidoras de fusão da proteína F com a célula hospedeira, administradas via oral, como o BMS-433771 (Polak *et al.*, 2004; Cianci *et al.*, 2005). Este componente é ativo contra ambos os grupos do VRSH (A e B). Estudos *in vitro* demonstraram que o fármaco inibe diretamente a formação de sincícios, mesmo quando adicionado após o estabelecimento da infecção e não apresentou citotoxicidade em nenhuma das culturas de células testadas, inclusive em hepatócitos humanos, além de mostrar eficiência quando testados em dois modelos de roedores, que receberam o BMS-433771 uma hora antes de serem inoculados com o VRSH. Não

houve evidência de vírus resistentes em nenhum dos modelos estudados, sendo efetivo em camundongos imunossuprimidos infectados pelo VRSH, demonstrando que a resposta imune não contribui para a eficiência deste componente antiviral (Cianci *et al.*, 2005).

A imunoprofilaxia passiva é feita com o uso de imunoglobulinas (Igs). As Igs devem ser administradas com grande cuidado para se evitar a exacerbação da doença, principalmente porque a população alvo é composta de crianças e neonatos. Inicialmente quando utilizadas apresentavam títulos de anticorpos variáveis, não sendo capazes de proteger contra a doença (Meissner *et al.*, 1993). Outras Igs com títulos mais altos foram testadas, sendo capazes de abrandar o quadro clínico, porém não foi observada proteção total contra infecção natural (Simões *et al.*, 1996). O alto custo das Igs, o risco associado ao grande volume de globulina administrado e a necessidade de várias visitas ao hospital ou ambulatório limitam a sua utilização (Ottolini *et al.*, 1997). A primeira medida efetiva na prevenção da ITRB e, conseqüentemente, a hospitalização de crianças, foi a administração mensal, via intravenosa, de imunoglobulinas confeccionadas a partir de plasma humano com altos títulos de anti-VRSH (Respigam®) (Sastre *et al.*, 2004).

Para melhorar a potência dos anticorpos e substituir a administração intravenosa por intramuscular foi desenvolvido um anticorpo monoclonal anti-VRSH denominado MEDI-493 ou palivizumab (Synagis™), aprovado pelo “Food and Drug Administration” (FDA) desde 1998, que se mostrou eficaz na redução de internações de lactentes de alto risco. O Palivizumab é um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra um local específico da superfície do VRSH. O alvo é o envelope através da glicoproteína F, possui, portanto uma potente atividade neutralizante, inibindo a fusão celular induzida pelo vírus e protegendo contra a infecção. O uso foi autorizado para a

prevenção de infecções graves do trato respiratório inferior em crianças com maior risco de infecção para o VRSH, bem como o desenvolvimento da doença aguda, crianças com displasia broncopulmonar e crianças com menos de dois anos de idade e com doença cardíaca congênita hemodinamicamente importante (Feltz e Sondheimer, 2007; Zhao *et al.*, 2004).

De Vincenzo e colaboradores (2004) analisaram vírus isolados de pacientes de oito centros dos EUA, não identificando nenhum vírus resistente ao palivizumab. Um desestimulante para o seu uso é o alto custo financeiro associado ao trabalhoso programa de prevenção. As ampolas, uma vez abertas e reconstituídas, devem ser utilizadas no prazo máximo de 6 horas (Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn, 1998; Medimmune Inc.; Pediatric Pharmacotherapy – University of Virginia).

O uso de monoclonais mais potentes está em curso para a determinação da segurança e eficácia (Mejías *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005). Diversos estudos ao redor do mundo realizados com amostras de VRSH com inserção de 60 nts na glicoproteína G mostraram a existência de mutações sendo acumuladas ao longo do tempo e que a seleção positiva está influenciando na evolução deste vírus. A rápida disseminação mundial deste genótipo sugere que pode estar havendo vantagens seletivas sobre os outros vírus circulantes. O conhecimento adquirido através de estudos de variabilidade genética da glicoproteína G pode ter impacto não apenas na evolução deste vírus, mas também sobre outras áreas, tais como o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, vacinas e principalmente o tratamento (Trento *et al.*, 2006).

2.15 - Desenvolvimento de vacina

O VRSH possui características que representam um desafio ao desenvolvimento de uma vacina. Uma dessas características é a possibilidade de re-infecção na presença de imunidade pré-existente, podendo acometer recém-nascidos com anticorpos adquiridos passivamente da mãe e pessoas imunologicamente competentes (Glezen *et al.*, 1981). Re-infecções podem ocorrer por exposições repetidas a isolados de vírus pertencentes ao mesmo grupo, pois a imunização não é completa e dura um pequeno período de tempo (Hall *et al.*, 1991).

Outra característica reside no fato de que a primeira infecção ocorre normalmente entre dois e sete meses de idade (Santos, 2008), portanto uma vacina eficaz deve ser capaz de estimular uma boa resposta imune antes dos dois meses de idade. Porém a imaturidade imunológica do indivíduo nesta idade dificulta a produção deste tipo de vacina (Collins *et al.*, 2001). A maioria dos indivíduos que se encontram dentro do grupo de risco para apresentar um quadro mais grave da doença possui alguma alteração no sistema imune, seja imaturidade, deficiência, ou supressão (recém nascidos, idosos, imunossuprimidos e imunodeficientes), dificultando ainda mais a produção de uma vacina (Greenberg e Piedra, 2004).

A prevenção das infecções pelo VRSH por meio de uma vacina foi muito estudada, contudo, sem sucesso até o momento. A primeira tentativa de se obter a vacina foi utilizando vírus inativado, por formalina, na década de 60. Durante os testes clínicos em crianças e lactentes, notou-se que, apesar de induzirem uma forte resposta imune, essa vacina não era protetora (Kim *et al.*, 1969) e quando estes indivíduos entraram em contato com o VRSH selvagem apresentaram manifestações muito mais severas da doença do que pessoas não vacinadas (cerca de 80% de hospitalizações e dois óbitos) (Dudas e Karron, 1998; Openshaw *et al.*, 2001). O aumento da gravidade

da doença foi também observado em animais e o resultado de diversos fatores: como a produção deficiente de anticorpos neutralizantes no soro, baixa imunidade local, deposição do complexo imunológico, indução de resposta exacerbada e aumento da produção das citocinas IL-4 e IL-5 (Durbin e Karron, 2003; Polack *et al.*, 2002).

O avanço nas técnicas de biologia molecular e da biotecnologia na última década possibilitou o teste de novos métodos para fabricação de vacinas como: atenuação do vírus gerada por passagens em culturas de células e baixas temperaturas juntamente com o uso de agentes mutagênicos (Crowe *et al.*, 1994; Randolph *et al.*, 1994); vacinas contendo subunidades virais (Homa *et al.*, 1999; Oien *et al.*, 1994); e vírus recombinantes que contém os epítomos protetores (Brandt *et al.*, 1997). Vacinas de subunidades utilizando proteína F purificada (PFP) ou proteína F em conjunto com G e M (Sanofir-Pasteur) ou ainda, o domínio central da proteína G, BBG2Na, foram desenvolvidas e submetidas a testes clínicos, sendo a PFP, a vacina com resultados mais promissores, apresentando-se segura e imunogênica em adultos, crianças acima de 12 meses com ou sem doença pulmonar, bem como em idosos e mulheres grávidas (Falsey *et al.*, 1997; Groothuis *et al.*, 1998). Os recém nascidos de mães que receberam a vacina apresentaram título quatro vezes maior em comparação cujas mães receberam o placebo (Piedra *et al.*, 1998).

Vacinas atenuadas aplicadas na mucosa respiratória foram desenvolvidas e estudadas por mais de uma década, sendo a mais estudada, a atenuada por termossensibilidade, e com crescimento adaptado ao frio. Porém o uso dessas vacinas está comprometido pela possibilidade de reversão genética e da virulência, além da baixa imunogenicidade (Wright *et al.*, 2000).

Outras vacinas utilizando a tecnologia do DNA recombinante foram avaliadas, em ensaios pré-clínicos e clínicos, sendo uma delas atenuada e tolerada por

crianças de 6 a 24 meses, não estando associada com o desenvolvimento de doenças do trato respiratório e com limitada instabilidade fenotípica (Karron *et al.*, 2005).

A combinação de vacinas de vírus atenuado com as vacinas de subunidades também é uma opção considerada para proteção contra doenças causadas pelo VRSH, entretanto estudos preliminares foram inconclusivos em crianças e idosos (Girard *et al.*, 2005).

Atualmente, apesar da importância médica e de todos os esforços, nenhuma das vacinas em estudo tem previsão de licenciamento ou utilização (Bernstein *et al.*, 2011). As restrições ocorrem por receio às reações adversas, descritas após a primeira experiência de imunização, à presença de anticorpos maternos e o sistema imune imaturo do público alvo da imunização (Crowe *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2011).

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

O Instituto Evandro Chagas (IEC) sediado no município de Ananindeua – PA é uma instituição federal subordinada ao Ministério da Saúde e faz parte da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). A instituição conta atualmente com laboratórios de referências que tem como principal missão o serviço de vigilância epidemiológica da região visando também o apoio às investigações biomédicas. Assim, o laboratório de vírus respiratório, lotado na seção de virologia, com capacitação técnica e operacional para realizar exames virológicos, e o comprometimento da empresa GlaxoSmithKline, a qual disponibilizou para o laboratório as amostras biológicas de pacientes hospitalizados com PAC, incentivaram e possibilitaram a realização do presente projeto.

Assim, sabendo-se que a suscetibilidade e a vulnerabilidade da população ao VRSH estão relacionadas ao hospedeiro, estas podem também serem influenciadas pela diversidade antigênica e genética do VRSH. Não obstante, tal diversidade pode ainda ser relevante para o desenvolvimento de drogas antivirais e vacinas contra o VRSH. Em decorrência dos restritos trabalhos publicados no Brasil sobre o VRSH e em casos de PAC, torna-se necessária a realização de estudos que avaliem a epidemiologia molecular do vírus nesta doença, a sazonalidade em regiões tropicais, e a caracterização clínica durante períodos epidêmicos e interepidêmicos.

Através desse estudo pretendeu-se gerar informações sobre a prevalência e a sazonalidade do VRSH em crianças hospitalizadas com PAC na cidade de Belém (clima tropical), durante o período de um ano, assim como, avaliar as manifestações clínicas associadas aos diferentes subgrupos de VRSH.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Identificar a prevalência de VRSH em amostras de pacientes pediátricos hospitalizados com pneumonia, na cidade de Belém (PA), no período de novembro de 2006 a outubro de 2007.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência do VRSH em crianças hospitalizadas com PAC.
- Determinar o sorotipo do VRSH detectados.
- Identificar o padrão sazonal do VRSH no período do estudo.
- Relacionar os achados com os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 – Casuística

Foi realizado um estudo de corte transversal, com amostras clínicas de aspirado da nasofaringe obtidas de 1.050 crianças internadas com diagnóstico de Pneumonia Adquirida na Comunidade, durante o período de novembro de 2006 a outubro de 2007, nos seguintes hospitais da região metropolitana de Belém: Clínica de Crianças Pio XII, Clínica Pediátrica do Pará, Hospital Infantil Santa Terezinha, Instituto Materno Infantil Mamaray, Maternidade Clínica do Bebê, Maternidade Saúde da Criança, Policlínica Infantil e Sociedade Beneficente São Brás.

O presente estudo foi derivado de um projeto de pesquisa sediado no Instituto Evandro Chagas, sob os auspícios da empresa GlaxoSmithKline, intitulado “Epi-Strep”.

O aspirado da nasofaringe foi coletado após consentimento dos pais ou responsáveis legais, os quais assinaram um termo de consentimento (**ANEXO I**) com aprovação da Comissão Ética do Instituto Evandro Chagas (protocolo nº 106086). Os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes foram obtidos através de uma ficha de investigação clínico-laboratorial (**ANEXO II**) preenchida no momento da coleta.

5.2 – Critérios de elegibilidade

5.2.1 - Critérios de inclusão

Foram incluídas crianças com idade igual ou inferior a três anos; hospitalizadas nas unidades pertencentes à vigilância “Epi-Strep”; com sinais e sintomas de ITRB e comprovação diagnóstica por radiografia torácica; com

consentimento de participação na pesquisa pelos pais ou responsáveis, após a leitura do termo livre e esclarecido junto ao profissional técnico da equipe, responsável também por esclarecer possíveis dúvidas em relação ao termo de consentimento.

5.2.2 - Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes que tiveram alta antes da visita da equipe de vigilância do projeto; as que não consentiram em participar do estudo; e, com dados clínico-epidemiológicos insuficientes.

5.3 – Aspectos éticos

O projeto conta com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do IEC (protocolo nº 106086) como um adendo ao projeto de pesquisa intitulado “Epi-Strep”.

5.4 – Coleta de dados clínicos

As crianças hospitalizadas na rede de vigilância do projeto “Epi-Strep” tiveram avaliação médica realizada por pediatras da equipe do projeto que, após a identificação de pneumonia adquirida na comunidade, solicitaram o consentimento informado dos pais ou responsáveis pela criança para a inclusão desta na pesquisa, autorizando a coleta dos dados clínico-epidemiológicos e do espécime clínico para pesquisa de VRSH.

5.5 – Variáveis do estudo

Inicialmente os pacientes foram divididos em grupos VRSH-positivos e VRSH-negativos e posteriormente o grupo VRSH-positivos foi dividido em Subgrupo A e Subgrupo B. Foram analisadas as seguintes variáveis: Idade, sexo, tempo de início

dos sintomas, sintomas, bairro de residência, dosagem de proteína C-reativa, achados radiológicos do tórax e coinfeção bacteriana.

5.6 – Coleta das amostras clínicas.

A coleta da secreção nasofaríngea foi obtida por aspiração a vácuo por técnico autorizado pela comissão médica do Projeto “Epi-Strep”, utilizando-se uma bomba a vácuo acoplada a um coletor de secreções plástico descartável (Argyle®) (**FIGURA XIX**), com um catéter, que era introduzido na cavidade nasal da criança (**FIGURA XX**). Em seguida, a amostra (aproximadamente 1ml) foi acondicionada com 4ml do meio de transporte (meio de Hank’s adicionado de gelatina a 0,5%).



FIGURA XIX: Coletor plástico de secreções de aspirado da nasofaringe utilizado na pesquisa de VRSH.

Nota: (1) extremidade para acoplar o cateter; (2) extremidade para acoplar a bomba à vácuo

Fonte adaptada de: Instituto Evandro Chagas, 2007

Os tubos devidamente rotulados com o nome do paciente e a data de coleta foram mantidos sob refrigeração de 4°C e posteriormente encaminhados, sob refrigeração, ao laboratório de Vírus Respiratórios do Serviço de Virologia Geral (SEVIR) do IEC para processamento. As amostras foram processadas no máximo de

seis horas após a coleta do aspirado e obedeceram o seguinte cronograma laboratorial de acordo com a **FIGURA XXI**.

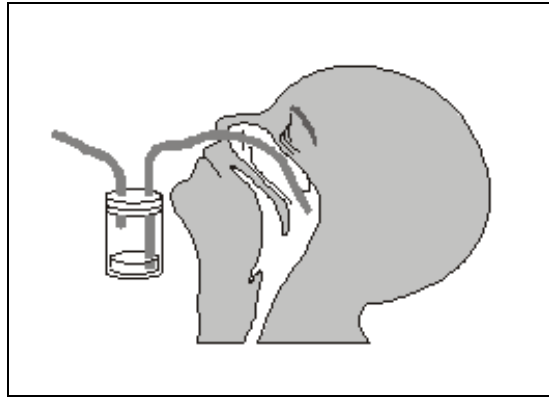


FIGURA XX: Desenho ilustrativo da coleta da secreção da nasofaringe.

Fonte: Instituto Evandro Chagas, 2007.

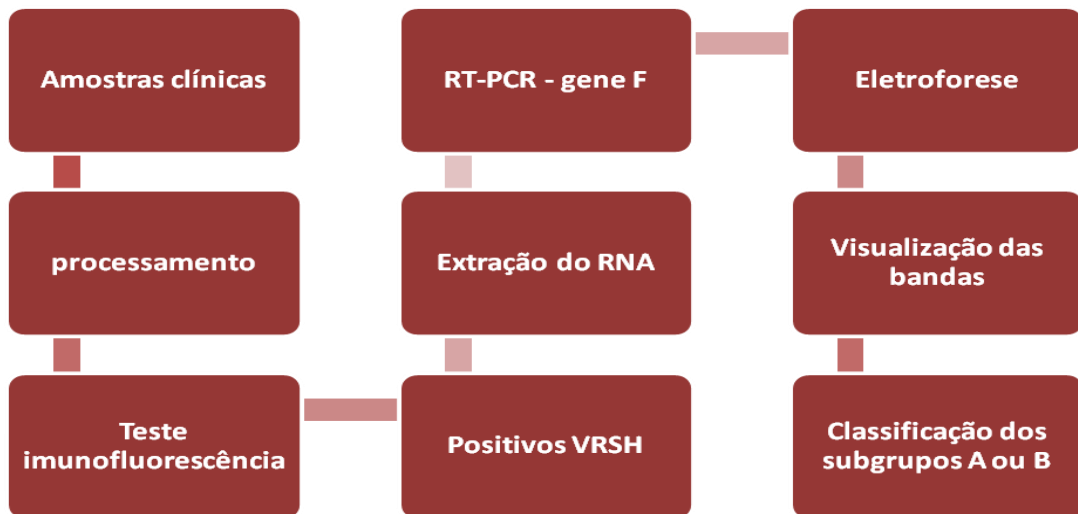


FIGURA XXI: Fluxograma laboratorial aplicado para a pesquisa de VRSH e caracterização do subtipo viral.

5.7 – Processamento das amostras

No laboratório de Vírus Respiratórios, as amostras foram inicialmente homogeneizadas e transferidas para um tubo cônico de polipropileno de 15 ml,

devidamente rotulado com o registro do espécime. Após centrifugação a 1.300 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi separado e congelado de imediato em nitrogênio líquido, para posterior etapa de extração de RNA, e o sedimento re-suspendido com 4ml de solução salina tamponada (PBS- “Phosphate Buffered Saline”) 0,01M e pH 7,2 estéril, homogeneizado e novamente centrifugado e descartado o sobrenadante, repetindo por mais uma vez este procedimento para posteriormente preparar a lâmina utilizada no teste de imunofluorescência.

5.8 – Reação de imunofluorescência

5.8.1 – Preparo das lâminas

O sedimento da amostra clínica processada, constituído de células do trato respiratório, foi re-suspendido com PBS, 0,01M e pH 7,2 estéril, e depositado em lâminas próprias para o teste de imunofluorescência. Estas lâminas após secar em temperatura ambiente foram fixadas em acetona a 4°C por 10 minutos e posteriormente utilizadas no teste de imunofluorescência.

5.8.2 – Triagem das amostras por imunofluorescência

Todas as amostras recebidas foram testadas para o VRSV pelo método de imunofluorescência direta utilizando-se o Kit comercial da Chemicon com anticorpo monoclonal específico. O procedimento adotado foi estabelecido de acordo com as recomendações do fabricante que consistiu: em cada orifício da lâmina foi adicionado 20µL do anticorpo monoclonal específico ligado ao conjugado; as lâminas foram então incubadas em câmara úmida em estufa a 37°C por 30 min. Após este período as lâminas foram submetidas a três lavagens com PBS pH 7.2 por 5 min a temperatura ambiente; as lâminas após secarem em temperatura ambiente foram cobertas o fluido

de montagem e coberta com uma lamínula. A leitura foi procedida em microscópio de fluorescência, com luz de mercúrio, no aumento de 400x (DMLB, Leica Microsystems GmbH). O teste foi considerado positivo somente quando observada a presença de fluorescência no citoplasma da célula, de acordo com as orientações do fabricante.

5.9 – Extração do RNA viral

Extração com kit comercial. Neste método o RNA viral foi extraído a partir do espécime clínico (sobrenadante), utilizando-se o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). E as etapas foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante. O produto final foi mantido à temperatura de -70°C até a posterior etapa da RT-PCR.

5.10 – RT-PCR para o gene F.

Esta etapa consiste na amplificação das cópias de RNA viral existentes nas amostras. A técnica é realizada em um único tubo utilizando-se o kit comercial SuperScript™ One-step RT-PCR with Platinum *Taq*[®] - (Invitrogen Life Technologies). As reações de RT-PCR foram feitas para um volume final de 25 μL contendo, 5 μL de RNAv, 0,2 μL de cada oligonucleotídeo iniciador (50 pmol/ μL) (**TABELA III**) (adaptado de Canducci et al., 2008), 12,5 μL de tampão de reação 2X (contendo 0,4mM de cada dNTP, 2,4mM de MgSO_4), 0,12 μL inibidor de ribonuclease 40U/ μL (RNAsine Inhibitor, Promega) e 0,5 μL de mix RT/*Taq* (SuperScript™ RT/Platinum *Taq*).

Em cada conjunto de amostras submetidas à reação de RT-PCR foi utilizado um controle negativo, composto por todos os reagentes da mistura da reação, exceto o RNA e uma amostra de vírus conhecida foi utilizada como controle positivo.

Todas as etapas de RT-PCR foram realizadas em termociclador automático “Master Cycler” (Eppendorf, Birkmann Instrument), inicialmente para o subgrupo B e posteriormente, para o subgrupo A. Para a amplificação dos seguimentos do gene F a mistura de reação foi submetida a 42°C por 45 minutos, 55°C por 15 minutos e 94°C 5 minutos. Esta etapa foi seguida por 30 ciclos de PCR cada um composto por etapas de desnaturação 94° por 30 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 30 segundos. A reação foi completada com um ciclo de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

TABELA III: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação da RT-PCR para o gene F do VRSH.

Subgrupo	Gene	Oligonucleotídeos	Sequência dos oligonucleotídeos	Tamanho
A	F	RSVFA3	5'TTATACTCAATRCCAAAAWACC 3'	363 pb
A	F	RSVFA4	5'AAATTCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT 3'	
B	F	RSVFB3	5'ATCTTCCTAACTCTTGCTRTTAATGCATT 3'	611 pb
B	F	RSVFB4	5'GATGCGACAGCTCTGTTGATTACTAT 3'	

5.11 – Eletroforese em gel de agarose

Ao término da amplificação os produtos da RT-PCR foram analisados por eletroforese horizontal utilizando cuba para eletroforese convencional (Biorad). O gel de agarose foi preparado a 1,5% pesando-se 0,9 g de agarose em pó (Gibco-BRL) e acrescentando 60 ml de tampão tris-acetato-EDTA (TAE). A agarose foi dissolvida por aquecimento durante 2 minutos em forno microondas, após o resfriamento, foram adicionados 3 µL de brometo de etídio (BET) a 0,5% (posteriormente substituído pelo SYBR Safe®). Após a solidificação do gel na cuba os produtos da RT-PCR foram

aplicados nos poços do gel, sendo que no último foi aplicado o marcador de peso molecular 200 lines SmartLadder (EUROGENTEC). Em seguida o gel foi submetido à migração, inicialmente por 5 minutos 70 volts (V), seguido de 25 minutos a 110 V. A visualização dos amplicons foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta (UV) e fotografado com auxílio do sistema Gel Doc 1000 (BioRad). Com esta etapa pôde-se dividir os positivos em subgrupo A e B.

5.12 – Análise estatística

Para as análises estatísticas, os pacientes foram divididos em dois grupos (RSVH-positivo e RSVH-negativo) de acordo com os resultados da IF. Foi utilizado o programa estatístico SPSS, versão 17.0 para Windows e foi aplicado o teste do Qui-Quadrado; em variáveis com valor inferior a 5 foi aplicado também o teste de Fisher's. Para a comparação de médias foi aplicado o teste T de Student. Foi adotado o intervalo de confiança (IC) de 95%; o valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

A análise multivariada foi realizada utilizando a regressão logística. O p com valor inferior a 0,05 foi considerado significativo. Foram realizadas duas análises (1) e (2) e ambas tiveram como variável dependente o resultado da pesquisa para o VRSH. Na análise (1) foi realizada uma comparação da PAC com resultado positivo e negativo para o VRSH incluindo as seguintes variáveis independentes: idade, gênero, dosagem de PCR e resultado da cultura bacteriana. Para a análise (2) foram incluídas as seguintes variáveis independentes: tosse, coriza, febre, obstrução nasal, vômito e diarreia.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

De acordo com os critérios de elegibilidade, durante o período do estudo foram triados 1.214 pacientes com PAC, dos quais 13,51% não tiveram consentimento dos pais ou responsáveis legais em participar da pesquisa. O aspirado da nasofaringe foi obtido dos demais 86,49% (n = 1.050) pacientes sendo estes incluídos de fato na pesquisa. Não houve diferenças significativas entre os dados demográficos dos indivíduos incluídos e não incluídos no estudo.

O resultado do teste de imunofluorescência direta foi possível para todas as 1.050 amostras. Deste total, 585 são de pacientes do gênero masculino com a idade média de 14,2 meses e 465 do gênero feminino com a idade média de 15,4 meses, ambos os gêneros tiveram a variância de idade de 1 a 36 meses. A prevalência da infecção pelo VRSH foi de 23,1% (243/1.050). Características demográficas e dados clínico-epidemiológicos dos pacientes positivos e negativos estão presentes na

TABELA IV.

De acordo com a variável idade, a média do grupo VRSH-positivo (12,1 meses) foi inferior a média observada no grupo VRSH-negativo (15,5 meses) ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao gênero (51,8% masculino e 48,2% feminino). Entre os pacientes dos grupos que tiveram amostras quantificadas para proteína C-reativa (77,1%), o grupo VRSH-positivo apresentou média inferior à média observada no grupo VRSH-negativo ($p < 0,01$).

Os resultados do exame radiológico apontaram que a maioria dos pacientes apresentava infiltrado intersticial tanto no grupo VRSH-positivo (483/944, 54,2%) quanto no grupo VRSH-negativo (50,3%).

A maioria dos pacientes VRSH-positivos apresentou resultado bacteriológico negativo (98/109), porém, quando comparado com o grupo VRSH-

negativo, observou-se que entre as amostras com cultura bacteriana positiva, 10% pertenciam ao grupo VRSH-positivo (co-infecção) e 4,5% ao grupo VRSH-negativo ($p < 0,05$). Foi observado em ambos os grupos uma média aproximada de seis dias de início de sinais e sintomas.

TABELA IV: Dados epidemiológicos, clínicos, e resultados laboratoriais observados nos pacientes pediátricos VRSH-positivo e VRSH-negativo hospitalizados com pneumonia adquirida na comunidade em Belém.

Características	RSV-positivo 243 (23,1%)		RSV-negativo 807 (76,9%)		p	Subtipos		p
	n	%	n	%		A n=18	B n=207	
Idade (anos)								
0 - 1	152/243	62,5	340/807	42,1	< 0,001	10/18	135/207	0,282
Média ± DP* (meses)	12,1 ± 13,2		15,5 ± 8,8		< 0,001	13±11	11±13	0,024
Gênero								
Masculino	126/243	51,8	449/807	55,6	0,113	9/18	108/207	0,542
Proteína C-reativa								
≤48 mg/dL	155/178	87,0	469/632	74,2	< 0,001	9/13	133/151	< 0,001
Média ± DP (mg/dL)	15,3 ± 26,6		24,0 ± 34,7		< 0,001	19±25	13±24	< 0,001
Radiografia								
Infiltrado intersticial	117	54,2	366	50,3	0,085	9	102	0,235
Infiltrado alveolar	49	22,7	164	22,5		1	45	
Infiltrado lobar	50	23,1	198	27,2		5	39	
Cultura bacteriana								
Positiva	11 ^Δ /109	10,0	17/381	04,5	0,043	1/8	10/92	0,342
Início dos sintomas								
Média ± DP (dias)	6,7 ± 4,2		6,4 ± 4,4		0,216	6 ± 5	6 ± 4	0,324

* desvio padrão.

^Δ *S. epidermidis* (3 patients), *A. baumannii* (2), *S. pneumoniae* (1), *Com. acidovorans* (1), *K. pneumoniae* (1), Gram Positive (1), *Candida spp* (1), outros (1).

Foi possível determinar o subtipo viral em 227/243 amostras (93,4%). O subtipo B foi encontrado em maior frequência do que o subtipo A (209 vs 18 amostras, respectivamente). Quando comparados os sorotipos e os dados clínico-

epidemiológicos dos pacientes foi observado que os pacientes infectados com o subtipo B apresentaram uma média de idade inferior aos pacientes com o subtipo A (11,0 vs 13,0 meses; $p < 0,03$). De acordo com a dosagem de proteína C-reativa, o subtipo B apresentou uma média menor quando comparado a média observada nos pacientes infectados com o subtipo A (11,0 vs 19,0 mg/dL, $p < 0,05$). Gênero, resultados radiológicos, cultura bacteriana e tempo de início de sinais e sintomas apresentaram distribuição similar entre os pacientes infectados com os diferentes subtipos (**TABELA IV**).

A **TABELA V** apresenta os sinais e sintomas dos pacientes dos grupos VRSH-positivo e VRSH-negativo. Aproximadamente 98% das crianças do grupo VRSH-positivo apresentavam tosse no momento da admissão hospitalar, dado similar foi observado nos pacientes VRSH-negativo (96,1%; $p > 0,05$). Cinco parâmetros clínicos tiveram diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos VRSH-positivo e VRSH-negativo: febre, vômito e diarreia foram detectados predominantemente no grupo VRSH-negativo (80,2% vs 72,4%, 12,2% vs 4,9% e 8,1% vs 4,1%, respectivamente), enquanto coriza e obstrução nasal foram predominantemente encontrados nos pacientes do grupo VRSH-positivo (78,2% vs 71,5% e 59,2% vs 32,8%, respectivamente; $p < 0,05$). Pacientes infectados com os subtipos A e B não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação aos sinais e sintomas dos pacientes.

A **FIGURA XXII** apresenta a detecção das amostras VRSH positivas durante o mês de Janeiro a Julho de 2007, com maior prevalência observada nos meses de Abril (48,6%) e Maio (52,4%). Durante o período do estudo foi observada a co-circulação dos dois subtipos com predominância do subtipo B (92,1%), sendo que o subtipo A apesar da menor frequência (7,9%) foi identificado no mesmo período que o subtipo B.

TABELA V: Sinais e sintomas identificados na hospitalização dos pacientes VRSH-positivos e VRSH-negativos com Pneumonia Adquirida na Comunidade e os subtipos identificados.

	RSV-positivo 243 (23,1%)		RSV-negativo 807 (76,9%)		p	Subtipo		
	N	%	n	%		A	B	P
Tosse	238	97,9	714	96,1	0,056	100%	98,5%	0,779
Coriza	190	78,2	531	71,5	0,002	83,3%	77,8%	0,443
Febre	176	72,4	596	80,2	0,009	83,3%	71,8%	0,323
Obstrução nasal	144	59,2	244	32,8	0,000	66,6%	58,7%	0,359
Vômitos	12	4,9	91	12,2	0,001	0	4,8%	0,428
Diarréia	10	4,1	60	8,1	0,023	0	14,8%	0,428

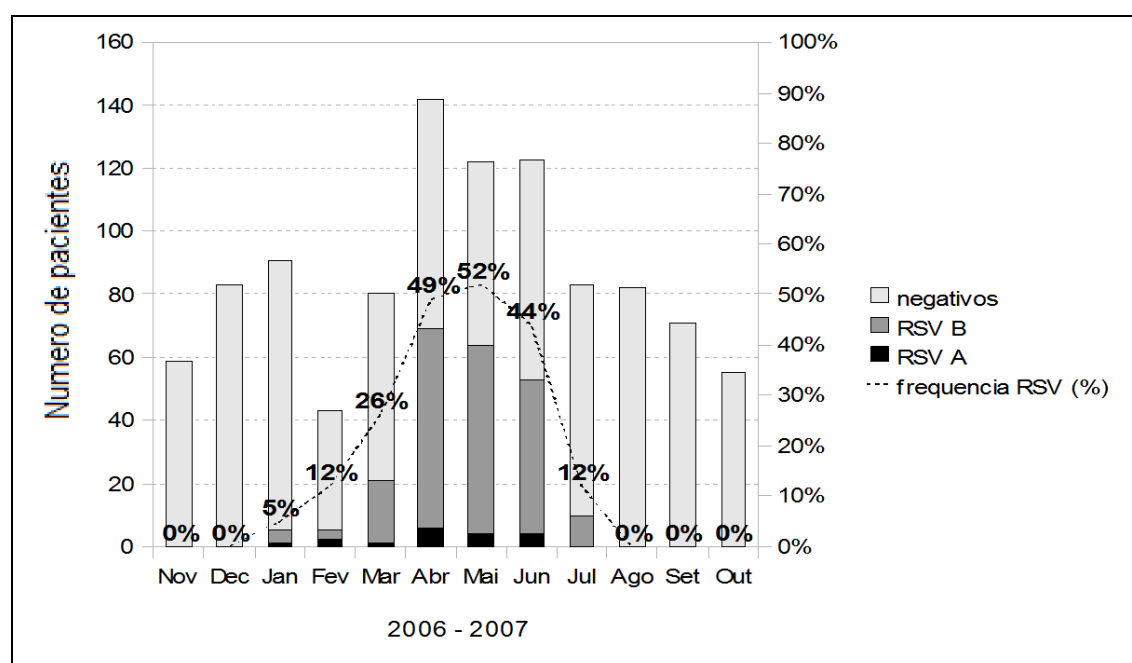


FIGURA XXII: Prevalência mensal de Vírus Respiratório Sincicial Humano (VRSH) em crianças de até 3 anos, hospitalizadas com Pneumonia Adquirida na Comunidade, de novembro de 2006 a outubro de 2007.

Entre os pacientes VRSH-positivos com dosagem elevada de proteína C-reativa (≥ 48 mg/dL), foi observado que: 8,2% apresentavam resultado radiológico de

infiltrado intersticial, 2,5% de infiltrado alveolar e, a maioria, 33,3% apresentavam resultado de infiltrado lobar. No entanto, em dosagens de proteína C-reativa < 48 mg/dL foi observado uma menor predominância do padrão radiológico de infiltrado lobar em comparação com os outros achados radiológicos, de acordo com a **TABELA VI** (66,7% vs 91,8% e 97,5%) ($p < 0,001$). Em relação ao resultado da cultura bacteriana e dosagem de PCR não houve diferenças estatísticas significantes entre os pacientes VRSH-positivos.

TABELA VI: Resultados das dosagens de proteína C-reativa nos pacientes com Pneumonia Adquirida na Comunidade, positivos para VRSH e com diferentes resultados radiológicos e bacteriológicos.

	Proteína C-reativa				Total	p
	< 48 mg/dL		≥ 48 mg/dL			
	N	%	N	%		
Radiografia						
Infiltrado intersticial	89	91,8	8	8,2	97	<0,001
Infiltrado alveolar	39	97,5	1	2,5	40	
Infiltrado lobar	26	66,7	13	33,3	39	
Cultura bacteriana						
Positiva	8	80,0	2	20,0	10	0,440
Negativa	81	86,1	13	13,8	94	

Os resultados da análise multivariada dos fatores de risco para a PAC positiva para o VRSH estão apresentados na **TABELA VII**. Na análise (1) foi observado que pacientes com idade inferior a 1 ano (OR 1,36; 95% CI; 1,06 – 1,74; $p < 0,015$), dosagem de PCR inferior a 48mg/dL (OR 3,49; 95% CI; 1,80 – 6,77; $p < 0,001$) e coinfeção bacteriana (OR 2,57; 95% CI; 1,08 – 6,09; $p < 0,032$) foram independentemente associadas ao VRSH. Na análise (2) apenas o sintoma de

obstrução nasal foi independentemente associado ao VRSH (OR 3,07; 95% CI; 2,24 – 4,21; $p < 0,001$).

TABELA VII: Resultados das análises multivariadas para os fatores de risco na infecção do VRSH em pacientes com PAC.

Análises	p	OR	95% IC		
			Inferior	Superior	
Sinais e sintomas					
(1)	Febre	0,109	0,754	0,535	1,065
	Coriza	0,798	0,952	0,654	1,386
	Obstrução nasal	<0,001	3,075	2,244	4,215
	Tosse	0,107	2,428	0,825	7,146
	Diarréia	0,646	0,836	0,390	1,794
	Vômitos	0,078	0,551	0,283	1,069
Características					
(2)	PCR <48mg/dL	<0,001	3,498	1,807	6,772
	Co-infecção	0,032	2,570	1,081	6,094
	Idade <1 ano	0,015	1,361	1,062	1,745
	Genero masculino	0,476	1,186	0,742	1,895

(1) (2) pneumonia positiva e negativa para VRSH como variável dependente.

O **QUADRO III** apresenta a relação dos bairros de residência dos pacientes investigados para o VRSH e a positividade encontrada durante o período da pesquisa. Observou-se que o maior número de amostras foi proveniente do bairro do Guamá (141 amostras), o bairro da Terra firme apresentou o maior número de amostras positivas (31 amostras) e os bairros do Umarizal, Curió, São Brás e Barreiro tiveram o maior percentual de amostras positivas (33,3% das amostras).

As oito unidades hospitalares pediátricas da cidade de Belém que participaram da pesquisa estão presentes na **FIGURA XXIII** com os respectivos números de amostras coletadas e o número de amostras positivas para o VRSH. A

Clínica Pediátrica do Pará foi a unidade que mais encaminhou amostras para a pesquisa de VRSH.

QUADRO III: Bairros de residência dos pacientes, com Pneumonia Adquirida na Comunidade, incluídos no estudo e o número de amostras positivas para o Vírus Respiratório Sincicial Humano durante o período de novembro/2006 a outubro/2007.

Bairro de residência	N. amostras	Total positivos	%	Bairro de residência	N. amostras	Total positivos	%
GUAMÁ	141	28	19,8	PRATINHA	16	0	0
TERRA FIRME	124	31	25	CURIÓ	12	4	33,3
JURUNAS	121	23	19	UMARIZAL	12	4	33,3
TAPANÃ	52	16	30,7	CIDADE VELHA	10	1	10
MARCO	49	12	24,4	SÃO BRÁS	9	3	33,3
SACRAMENTA	48	9	18,7	SOUZA	9	2	22,2
CONDOR	46	12	26	CASTANHEIRA	8	0	0
PEDREIRA	46	13	28,2	FÁTIMA	8	1	12,5
MARAMBAIA	45	8	17,7	NOVA MARAMBAIA	8	2	25
CREMAÇÃO	44	12	27,2	BARREIRO	6	2	33,3
VAL DE CANS	43	11	25,5	BATISTA CAMPOS	6	3	50
TELÉGRAFO	40	7	17,5	CAMPINA	5	2	40
BENGUI	33	6	18,8	MANGUEIRÃO	3	0	0
CANUDOS	32	8	25	MONTESSE	3	0	0
CABANAGEM	28	7	25	MARACANGALHA	1	0	0
PRATINHA II	20	5	25	REDUTO	1	0	0

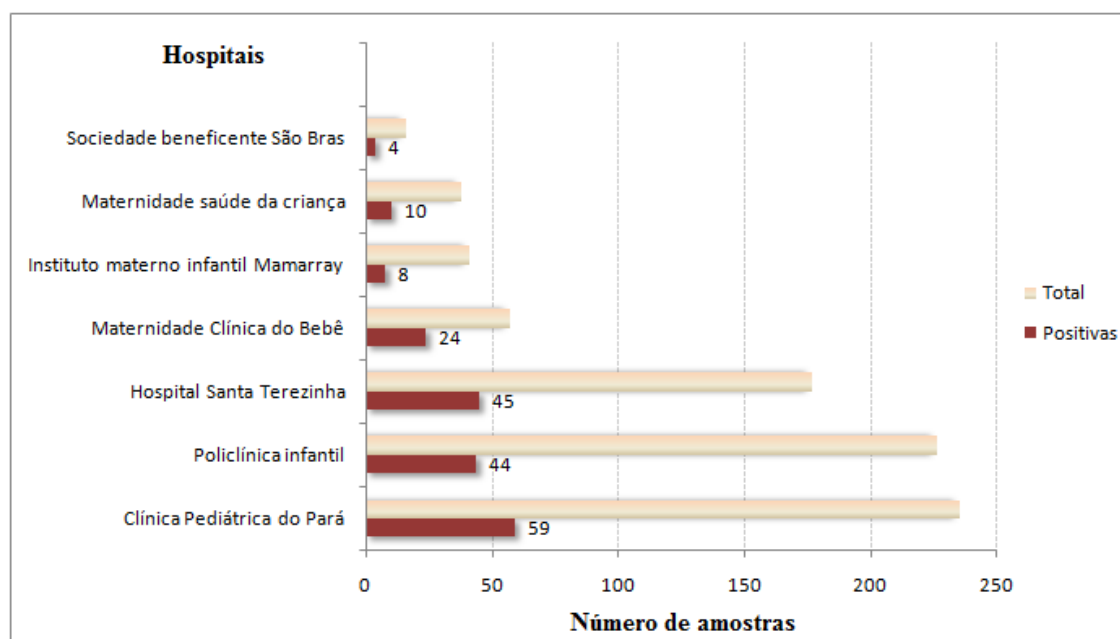


FIGURA XXIII: Distribuição das amostras utilizadas na pesquisa de VRSH recebidas das Unidades Hospitalares Pediátricas da cidade de Belém que participaram do estudo.

6.1 – Artigo científico

O artigo científico com os resultados desta tese foi encaminhado para o periódico científico **BMC Infectious Diseases** e, após as correções sugeridas pelos referees, foi aceito para a publicação. Atualmente, a versão final do artigo (**ANEXO III**) aguarda a publicação na próxima edição da revista.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A detecção de VRSH em 23% das amostras em nosso estudo denota uma prevalência semelhante a observada em estudos de investigação de VRSH em casos de ITRB no Brasil (Pecchini *et al.*, 2008; Riccetto *et al.*, 2006; Calegari *et al.*, 2005).

Calegari e colaboradores (2005) investigaram o VRSH em amostras de ANF em crianças com idade de até 5 anos com sinais e sintomas de ITRB atendidas no Hospital das Clínicas de Uberlândia (MG). Pelo teste de imunofluorescência foi identificado 76/317 amostras (24%) positivas para o VRSH. Na cidade de São Paulo (SP), Pecchini e colaboradores (2008) investigaram crianças com idade inferior a 5 anos com IRAs atendidos no Hospital Santa Casa de São Paulo. Pelo método da imunofluorescência, aproximadamente 27% (124/455) das amostras foram identificadas positivas para o VRSH. Riccetto e colaboradores (2006) encontraram a incidência de 17% de VRSH em 152 crianças hospitalizadas com ITRB em dois hospitais universitários no estado de São Paulo utilizando o teste de imunofluorescência.

Estudos diagnósticos apontam uma maior sensibilidade da RT-PCR em comparação às técnicas de imunofluorescência e cultivo celular. Reis e colaboradores (2008), em um estudo comparativo de identificação do VRSH, utilizaram 316 amostras de Nas em diferentes técnicas: isolamento viral, imunofluorescência direta e a RT-PCR. Do total de amostras investigadas, 25 (7,9%) foram positivas pela IF, 20 (6,3%) pelo cultivo celular e, 35 (11,1%) pela RT-PCR, a qual apresentou uma maior sensibilidade em relação às outras técnicas. Munywoki e colaboradores (2011) em um recente estudo utilizando diagnóstico por PCR em tempo real demonstrou que 14% das amostras negativas pela IF tornaram-se positivas por esta metodologia. Devido ao grande número de amostras investigadas nesta pesquisa e, principalmente, a

necessidade de fornecer um resultado rápido para o médico e para o paciente, optou-se, por custo-benefício, pela técnica de imunofluorescência direta. Os possíveis resultados falso-negativos da pesquisa são minimizados devido ao grande número de amostras que foram trabalhadas não alterando a significância estatística dos resultados.

O VRSH é referido na literatura como principal agente responsável pela pneumonia durante o primeiro ano de vida (D'Elia *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007). Na cidade do Rio de Janeiro, D'Elia e colaboradores (2005) analisaram amostras de 89 crianças menores de um ano internadas com ITRB, sendo que 42 (47,1%) tiveram o resultado da IF positivo para VRSH. Lee e colaboradores (2007) coletaram dados de 775 crianças com diagnóstico positivo da IF para VRSH, hospitalizadas em Taiwan, identificando a média de 10 meses de idade nestes pacientes. De acordo com os nossos resultados, 62% das crianças apresentaram idade inferior a um ano, sugerindo que a infecção nesta faixa etária apresenta maior gravidade, o que requer hospitalização com pronta e eficaz intervenção médica.

A prevalência de infecções pelo VRSH apresenta distribuição semelhante quanto ao gênero em alguns dos estudos observados na literatura (Lee *et al.*, 2007; Riccetto *et al.*, 2006). Lee e colaboradores (2007) observaram que 62% das 775 crianças com infecção positiva para o VRSH pertenciam ao gênero masculino, semelhante achado obtido por Riccetto e colaboradores, que encontrou a porcentagem de 61,2%, porém ambos os estudos não encontraram resultado significativo quando investigado o risco relativo em relação ao gênero. No nosso estudo 51,8% dos pacientes VRSH-positivos pertencem ao gênero masculino e, de acordo com os resultados dos trabalhos mencionados, não apresentaram diferenças significativas.

A dosagem da PCR é muito utilizada pelos médicos na tentativa de diferenciar a etiologia da PAC entre bacteriana e viral (Diniz *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2009). Diniz e colaboradores (2005) encontraram diferenças significativas entre as dosagens de PCR, onde 65% dos pacientes com infecção nosocomial pelo VRSH apresentaram dosagem < 40 mg/dL. No nosso estudo o grupo VRSH-positivo apresentou uma média na dosagem de PCR inferior a do grupo VRSH-negativo. Assim, baixos níveis de PCR podem sugerir uma infecção viral e, dependendo do quadro clínico e radiológico do paciente, podem auxiliar o médico quanto a não administração de antibióticos e na redução do tempo de internação hospitalar.

A análise radiológica é fundamental para a conclusão do diagnóstico de PAC pela demonstração de um infiltrado pulmonar. Poucos estudos associam os achados radiológicos com o agente viral, no entanto, Diniz e colaboradores observaram uma correlação significativa entre a ITRB nosocomial pelo VRSH e um resultado radiológico de infiltrado intersticial. Foi analisado o total de 78 pacientes, dos quais 23 tiveram infecção comprovada pelo VRSH, destes, 65,2% apresentaram um infiltrado intersticial, e, entre os pacientes VRSH negativos e com infecção confirmada por bactérias e/ou fungos todos apresentaram infiltrado alveolar ($p < 0,001$). Os achados radiológicos do nosso estudo não apresentaram um padrão diferente de infiltrado entre os pacientes VRSH-positivos e VRSH-negativos. Não obstante, 54% dos pacientes positivos apresentaram infiltrado intersticial, percentual semelhante foi encontrado entre os pacientes VRSH-negativos (50,3%).

Os resultados dos estudos que avaliam a co-infecção bacteriana e viral pelo VRSH na literatura são controversos. Duttweiler e colaboradores (2004) investigaram 127 crianças hospitalizadas com bronquiolite e resultado para o VRSH positivo, com até 5 anos de idade, e concluíram que este evento teve notória

importância naqueles pacientes que necessitaram de ventilação mecânica. Kneyber e colaboradores (2005) investigaram 82 crianças e concluíram que a prévia infecção pelo VRSH, bem como o uso da ventilação mecânica, não foram um fator de risco significativo para a co-infecção bacteriana, de acordo com os resultados de Randolph e colaboradores (2004) e Titus e colaboradores. No primeiro estudo foram investigados 165 pacientes hospitalizados positivos para o VRSH e apenas em um paciente foi identificada uma co-infecção bacteriana. No segundo estudo, Titus e colaboradores (2003) pesquisaram 174 pacientes e apenas dois pacientes apresentaram co-infecção bacteriana. Discordando destes achados, Michelow e colaboradores (2004) investigaram 154 crianças com ITRB das quais 23% apresentaram co-infecção bacteriana e viral. Thorburn e colaboradores (2006) encontraram também co-infecção bacteriana em 40% dos pacientes positivos para o VRSH com bronquiolite. O nosso estudo identificou a co-infecção bacteriana em 10,0% dos pacientes VRSH-positivos vs 4,5% no grupo VRSH-negativo, provando uma correlação entre a infecção viral e a bacteriana nos pacientes do nosso estudo.

Este estudo relata uma predominância de infecção pelo subtipo viral B em crianças hospitalizadas com PAC, fato também observado em outras regiões (Mlinaric-Galinovic 2009; Suwanjutha, 2002). Na verdade, é observada uma alternância entre os subtipos de acordo com o ano e a região da investigação. Mlinaric-Galinovic e colaboradores, em um estudo na Croácia do ano de 2006 a 2007, identificaram em 2006 duas epidemias causadas predominantemente pelo subtipo B e em 2007 pelo subtipo A. Suwanjutha e colaboradores identificaram no primeiro ano do estudo a predominância do subtipo B em contraste com o segundo ano do estudo quando o subtipo A teve maior predominância. D'Elia e colaboradores, na cidade do Rio de Janeiro, identificaram nos dois anos de investigação em casos internados de ITRB a predominância do subtipo viral A (71,4% e 78,6%) (D'Elia *et al.*, 2005), assim como

Oliveira e colaboradores, com 78% de amostras de subtipo A, no estado de Minas Gerais (Oliveira *et al.*, 2008).

Devido ao elevado número de infecções pelo subtipo viral B em comparação ao subtipo A (este com apenas 18 casos), os resultados das análises entre os subtipos virais e os dados clínico-epidemiológicos não são conclusivos. No entanto, o nosso estudo identificou que naqueles pacientes com infecção pelo subtipo B a média da idade foi mais baixa em relação ao outro subtipo (11,0 vs 13,0, $p < 0,03$), dados semelhantes foi relatado por Papadopoulos e colaboradores (2004). Mlinaric-Galinovic (2009) e colaboradores não encontraram diferenças significativas em relação a idade entre os subtipos virais, assim como Oliveira e colaboradores (2008). No entanto, no estudo de Mlinaric-Galinovic (2009) foi observado que a maioria (88,8%, $p < 0,024$) dos pacientes infectados com o subtipo viral B e idade inferior a 12 meses eram do sexo masculino. Oliveira e colaboradores (2008) encontraram 57,8% dos casos com infecção pelo subtipo A, porém sem significância estatística. Infelizmente, até o momento nenhuma explicação é plausível para estes achados.

No nosso estudo foi observado que a média da PCR nos pacientes infectados com o subtipo B foi menor que a média observada para o subtipo A (13,0 vs 19,0; $p < 0,05$), mas a razão para este achado permanece desconhecida. Novas pesquisas com um número adequado de amostras devem ser conduzidas na tentativa de entender melhor as diferenças clínico-epidemiológicas dos pacientes infectados com os subtipos do VRSH nos casos de PAC.

Em relação aos sinais e sintomas avaliados nos pacientes do estudo, aproximadamente 98% do grupo VRSH-positivo apresentou tosse no momento da hospitalização, porém não houve diferença estatística para o grupo VRSH-negativo (96,1%, $p > 0,05$). Coriza e obstrução nasal foram sintomas predominantemente

observados no grupo VRSH-positivos. Diniz e colaboradores (2005) investigaram os sintomas de pacientes prematuros infectados com o VRSH e observaram que chiado, coriza, vômitos e diarreia foram significativamente mais frequentes, enquanto que em nosso estudo, vômitos e diarreia foram detectados predominantemente nos pacientes do grupo VRSH-negativos. É observado que os sintomas clínicos não são suficientes para prever a etiologia por VRSH da PAC, os estudos que descrevem esta característica são ainda controversos e outros fatores como idade e estado imunológico podem influenciar nestas análises.

Com relação à sazonalidade, o nosso estudo identificou no ano de 2007 a atividade do VRSH em crianças hospitalizadas com PAC com maior prevalência nos meses de abril e maio, período que coincide com fortes chuvas na região. No Brasil, surtos ocorrem principalmente durante os meses com baixa temperatura, assim como relatado por Costa e colaboradores (2006) em Uberlândia (região Centro-Oeste). Na cidade de Campinas (SP) (Ricetto, 2006) e em Vitória (ES) (Checon, 2002), ambas na região Sudeste, a maior incidência de infecções pelo VRSH ocorre entre janeiro e junho, mesmo período encontrado no nosso estudo.

A maior compreensão dos fatores que determinam a atividade do VRSH é essencial para melhorar a conduta dos pacientes e do sistema de saúde. Por isso, é fundamental a realização de estudos clínico-epidemiológicos na nossa região. A atividade de monitoramento do VRSH é necessária a fim de restringir o uso de antibióticos para as crianças que realmente necessitam e para proporcionar uma melhor terapia profilática para os pacientes.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

- A prevalência do VRSH em casos de PAC na nossa região foi semelhante à observada em outras localidades.
- Foi observado uma maior prevalência nos casos de PAC por VRSH na faixa etária até 1 ano de idade.
- Baixas dosagens de PCR (< 48 mg/dL) foram associadas à infecção por VRSH.
- A infecção bacteriana foi mais frequente nos pacientes infectados pelo VRSH.
- A obstrução nasal foi o sintoma que estava independentemente associado à infecção pelo VRSH nos casos de PAC.
- Ambos os subtipos de VRSH foram associados com a PAC na nossa região, e durante o período do estudo foi identificado maior predominância do subtipo B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELS S, NADAL D, STROEHLE A, BOSSART W. Reliable detection of respiratory syncytial virus infection in children for adequate hospital infection control management. **J Clin Microbiol.** Sep;39(9):3135-9, 2001.

ANDERSON LJ, HIERHOLZER JC, TSOU C, HENDRY RM, FERNIE BF, MCINTOSH K, *et al.* Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **J Infect Dis.**;151(4):626-33, 1985.

ANDERSON LJ, HENDRY RM, PIERIK LT, TSOU C, MCINTOSH K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. **J Infect Dis.**;163(4):687-92, 1991.

AVEDAÑO LF, PALOMINO MA, LARRAÑGA C. Surveillance for respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile (1989 to 2000). **J Clin Microbiol.**, 41(10):4879-82, 2003.

BÁRTHOLO RM, BÁRTHOLO TP. Pneumonia adquirida na comunidade – aspectos recentes. **Pulmão RJ**; Supl 2:S12-S25, 2009.

BAUMEISTER EG, HUNICKEN DS, SAVY LS. RSV molecular characterization and specific antibody response in young children with acute lower respiratory infection. **J Clin Virol.**, 27:44-51, 2003.

BECKER Y. Respiratory syncytial virus (RSV) evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy--a review. **Virus Genes.** Oct;33(2):235-52, 2006.

BEDOYA VI, ABAD V, TRUJILLO H. Frequency respiratory syncytial virus in hospitalized infants with lower acute respiratory tract infection in Colombia. **Ped. Infect. Dis. J.**, 15: 1123-1124, 1996.

BEELER JA, FELDMAN SA, AUDET S. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. **J Virol.**;74(14):6442-7, 2000.

BELSHE RB, MUFSON MA. Respiratory syncytial virus. In: Belshe RB. **Textbook of human virology.** New York: Littleton Psg Publishing., 1072p. p.388-407, 1991.

BERNSTEIN DI, MALKIN E, ABUGHALI N, FALLOON J, YI T, DUBOYSKY F. Phase 1 Study of the Safety and Immunogenicity of a Live, Attenuated Respiratory Syncytial

Virus and Parainfluenza Virus Type 3 Vaccine in Seronegative Children. **Pediatr Infect Dis J** sept 15, 2011.

BLACK CP. Biology and Medical Management of RSV infection. **Respiratory Care**, 48:209-231, 2003.

BLOUNT RE JR, MORRIS JA, SAVAGE RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proc Soc Exp Biol Med.**; 92(3):544-9, 1956.

BOHLAND AK, JORGE MHPM. Mortalidade infantil de menores de um ano de idade na região do sudoeste do estado de São Paulo. **Rev Saúde Pub. S Paulo.**;33:366-73, 1999.

BORG I, ROHDE G, LÖSEKE S, BITTSCHIEDT J, SCHULTZE-WERNINGHAUS G, STEPHAN V, BUFE A. Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. **Eur Respir J.**; 21: 944-51, 2003.

BORGES AA, FIGUEIREDO LT. Atualização de conhecimentos sobre a patogênese da síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus. **Rev Patol Trop.**;36(3):191-204, 2007.

BOTOSSO VF, ZANOTTO PM, UEDA M, ARRUDA E, GILIO AE, VIEIRA SE, STEWIEN KE, PERET TC, JAMAL LF, PARDINI MI, PINHO JR, MASSAD E, SANT'ANNA OA, HOLMES EC, DURIGON EL; CONSORTIUM VGDN. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. **PLoS Pathog.**;5(1), 2009.

BRANDT C, POWER UF, PLOTNICKY-GILQUIM PH, HUSS T, NGUYEN T, LAMBERT PH, BINZ H, SIERGRIST CA. Protective immunity against respiratory syncytial virus in early life after murine maternal or neonatal vaccination with the recombinant G fusion protein BBG2Na. **J. Infect. Dis.**, 176(4): 884-891, 1997.

BUCHHOLZ UJ, WARD JM, LAMIRANDE EW, HEINZE B, KREMPL CD, COLLINS PL. Deletion of nonstructural proteins NS1 and NS2 from pneumonia virus of mice attenuates viral replication and reduces pulmonary cytokine expression and disease. **J Virol.**;83(4):1969-80, 2009.

BUCKINGHAM SC, BUSH AJ, DEVINCENZO JP. Nasal quantity of respiratory syncytial virus correlates with disease severity in hospitalized infants. **Pediatr. Infect Dis, J.**;19(2):113-7, 2000.

BUCKLEY BC, ROYLANCE D, MITCHELL MP, PATEL SM, CANNON HE, DUNN JD. Description of the outcomes of prior authorization of palivizumab for prevention of

respiratory syncytial virus infection in a managed care organization. **J Manag Care Pharm** 16(1):15-22, 2010.

CALEGARI T, QUEIROZ DA, YOKOSAWA J, SILVEIRA HL, COSTA LF, OLIVEIRA TF. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. **Braz J Infect Dis.**, 9(3):156-61, 2005.

CALVILLO, EB. Molecular detection of respiratory syncytial virus in postmortem lung tissue sample from Mexican children deceased with pneumonia. **Pediatr Infec Dis J.**, 20: 495-501, 2001.

CAMARA AA, SILVA JM, FERRIANI VP, TOBIAS KR, MACEDO IS, PADOVANI MA, HARSI CM, CARDOSO MR, CHAPMAN MD, ARRUDA E, PLATTS-MILLS TA, ARRUDA LK. Risk factors for wheezing in a subtropical environment: role of respiratory viruses and allergen sensitization. **J. Allergy Clin Immunol.**;113(3):551-7, 2004.

CANDUCCI F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berrè S, Terulla C, Gargantini G, Cambieri P, Romero E, Clementi M: Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. **J Med Virol.**, 80: 716–723, 2008.

CANE PA, WEBER M, SANNEH M, DACKOUR R, PRINGLE CR, WHITTLE, H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in the Gambia. **Epidemiol Infect**; 122: 155-60, 1999.

CANDEIAS JA. Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections. **Ver Inst Méd Trop São Paulo**, 9(1):27-30, 1967.

CARBALLAL G. Respiratory syncytial virus: Changes in prevalence of subgroups A and B among Argentinian children, 1990-1996. **J Med Virol.**, 61: 275-79, 2000.

CARBALLAL G. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities of Argentina, 1993-1994. **J Med Virol.**, 64:167-174, 2001.

CARROMEU, C. **Estudos de caracterização estrutural, localização intracelular e imunogenicidade da RNA polimerase do Vírus Respiratório Sincicial Humano.** Tese de doutorado - Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, 2007.

CARTEE TL, WERTZ GW. Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection. **J. Virol.**, 75: 12188-12197, 2001.

Centers for Disease Control and Prevention, 2011. Public Health Image Library (PHIL) ID 6484. Versão eletrônica disponível em: <http://knol.google.com/k/-/-/3fy5eowy8suq3/mtufsm/6484lores1.jpg>, acessado em 20 de outubro de 2011.

CHANOCK RM, FINBERG L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. **Am. J. Hyg**, 66: 281-290, 1957a.

CHANOCK RM, FINBERG L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiological aspects of infection in infants and young children. **Am. J. Hyg**, V.66, p.291-300, 1957b.

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.**, 67(5): 490–491, 2002.

CHENG X, PARK H, ZHOU H, JIN H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. **J. Virol**. V.79, 22:13943-13952, 2005.

CIANCI C, MEANWELL N, KRYSTAL, M. Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. **J. Antimicrob. Chemother.**, 55(3): 289-92, 2005.

CINTRA OA, OWA MA, MACHADO AA, CERVI MC, FIGUEIREDO LT, ROCHA GM, SIQUEIRA MM, ARRUDA E. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial vírus in children in southeast Brazil. **J Med Virol.**;65(2):408-12, 2001.

COATES HV, KENDRICK L, CHANOCK RM. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial vírus of respiratory syncytial vírus. **Proc Soc Exp Biol Med.**;112:958-64, 1963.

COATES HV, ALLING DW, CHANOCK RM. An Antigenic Analysis of Respiratory Syncytial by Plaque Reduction Neutralization Test. **Am J Epidemiol.**;83:299-313, 1966.

COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASE. Use of ribavirin in the treatment of respiratory syncytial virus infection. **Pediatrics**, 92: 501-504, 1993.

COLLINS PL, MCINTOSH K, CHANOCK RM. **Respiratory Syncytial Virus**. In: BN Fields, Virology. Lippincott-Raven Publishers. 4 ed. Philadelphia, 2001.

COSTA LF, YOKOSAWA J, MANTESE OC, OLIVEIRA TFM, SILVEIRA HL, NEPOMUCENO LL, MOREIRA LS, DYONISIO G, ROSSI LMG, OLIVEIRA RC, RIBEIRO LZG, QUEIRÓZ DAO. Respiratory viruses in children younger than five years

old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 101(3): 301-306, 2006.

COX MJ, AZEVEDO RS, CANE PA, MASSAD E, MEDLEY GF. Seroepidemiological study of respiratory syncytial vírus in São Paulo State, Brazil. **J. Med. Virol.**;55:234, 1998.

CROWE JEJR, BUI PT, DAVIS AR, CHANOCK RM, MURPHY BR. A further attenuated derivative of a cold-passaged temperature-sensitive mutant of human respiratory syncytial virus retains immunogenicity and protective efficacy against wild-type challenge in seronegative chimpanzees. **Vaccine**, 12: 783-790, 1994.

CROWE JEJR. Respiratory syncytial virus vaccine development. **Vaccine**, 20: S32-37, 2002.

CUESTA I, GENG X, ASENJO A, VILLANUEVA N. Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. **J. Virol.** 74: 9858-9867, 2000.

DATASUS – Departamento de Informática do SUS, em “Banco de Dados do Sistema Único de Saúde”, 2008. Versão eletrônica disponível em: www.datasus.gov.br, acessado em 03 de julho de 2011.

DE MIGUEL DÍEZ J, ÁLVAREZ-SALA JL. Factores pronósticos en la neumonía adquirida en la comunidad. **An Med Interna** (Madrid); 24: 465-466, 2007.

De PAULIS M, GILIO AE, FERRARO AA, DO SACRAMENTO PR, BOTOSSO VF, DE OLIVEIRA DB, MARINHEIRO JC, HÁRSI CM, DURIGON EL, VIEIRA SE. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. **J Pediatr** (Rio J) 8;87(4), 2011.

De VINCENZO JP, HALL CB, KIMBERLIN DW, SÁNCHEZ PJ, RODRIGUEZ WJ, JANTAUSSCH BA, COREY L, KAHN JS, ENGLUND JA, SUZICH JA, PALMER-HILL FJ, BRANCO L, JOHNSON S, PATEL NK, PIAZZA FM. Surveillance of clinical isolates of respiratory syncytial virus for palivizumab (Synagis)-resistant mutants. **J. Infect. Dis.**, 190(5): 975-8, 2004.

D'ELIA C, SIQUEIRA MM, PORTES SA, SANT'ANNA CC. Respiratory syncytial vírus – associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 38(1):7-10, 2005.

DINIZ EMA, VIEIRA RA, CECCON MEJ, ISHIDA MA, VAZ FAC. Incidence of respiratory viruses in preterm infants submitted to mechanical ventilation. **Rev. Inst. Med. trop.** 47(1):37-44, 2005.

DOMACHOWSKE JB, ROSENBERG HF. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. **Clin Microbiol Rev.** Apr;12(2):298-309, 1999.

DUDAS RA, KARRON RA. Respiratory syncytial vírus vaccines. **Clin Microbiol Rev.**;11(3):430-9, 1998.

DURBIN AP, KARRON RA. Progress in the development of respiratory syncytial vírus and parainfluenza vírus vaccines. **Clin Infect Dis.**;15;37(12):1668-77, 2003.

DUTTWEILER L, NADAL D, FREY B. Pulmonary and systemic bacterial co-infections in severe RSV bronchiolitis. **Arch Dis Child**, 89:1155–7, 2004.

EARP LJ, DELOS SE, PARK HE, WHITE JM. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. **Curr Top Microbiol Immunol.**;285:25-66, 2004.

EASTON AJ, DOMACHOWSKE JB, ROSENBERG HF. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. **Clin Microbiol Rev.**;17(2):390-412, 2004.

FALSEY AR, WALSH EE. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial vírus subunit vaccine (PFP-2) in the institutionalized elderly. **Vaccine.**;15(10):1130, 1997.

FALSEY AR, WALSH EE. Respiratory Syncytial virus infectious in adults. **Clin Microbiol. Rev.**, 13:371-84, 2000.

FELTES, TF, SONDHEIMER, HM. Palivizumab and the prevention of respiratory syncytial vírus illness in pediatric patients with congenital heart disease. **Expert Opin. Biol. Ther.** 7(9):1471-1480, 2007.

FIGUEIREDO LTM. Viral pneumonia: epidemiological, clinical, pathophysiological and therapeutic aspects. **J Bras Pneumol.**, 35(9):899-906, 2009.

FLICKR, 2011. Versão eletrônica disponível em www.flickr.com/photos/yudzz88/3274908419/, acessado em 20 de outubro de 2011.

FRABASILE S, DELFRARO A, FACAL L, VIDELA C, GALIANO M, DE SIERRA MJ. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguai and Argentina 1993-2002. **J Med Virol.**;71:305-12, 2003.

FUENTES S, TRAN KC, LUTHRA P, TENG MN, HE B. Function of the respiratory syncytial vírus small hydrophobic protein. **J Virol.**;81(15):8361-6, 2007.

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.**;43(5):2266-73, 2005.

GHILDYAL R, MILLS J, MURRAY M, VARDAXIS N, MEANGER J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. **J. Gen. Virol.** 83: 753-757, 2002.

GIRARD PM, CHERIAN T, KIENY MP. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. **Vaccine**, 23: 5708-5724, 2005.

GLEZEN WP, PAREDES A, ALLISON JE, TABER LH, FRANK AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. **J Pediatr.**;98(5):708-15, 1981.

GREENBERG HB, PIEDRA PA. Immunization against viral respiratory disease: a review. **Pediatr Infect Dis J.**;(11):54-61, 2004.

GROOTHUIS JR, GUTIERREZ KM, LAUER BA. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. **Pediatr.**;82(2):199-203, 1998.

GUPTA S, SHAMSUNDAR R, SHET A, CHAWAR R, SRINIVASE H. Prevalence of Respiratory Syncytial Virus Infection among Hospitalized Children Presenting with Acute Lower Respiratory Tract Infections. **Indian J Pediatr.** Jun 10, 2011.

HACKING D, HULL J. Respiratory syncytial virus – viral biology and the host response. **J Infect.**;45(1):18-24, 2002.

HALL CB, DOUGLAS RG JR, GEIMAN JM, MESSNER MK. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. **N Engl J Med.**;293(26):1343-6, 1975.

HALL CB, WALSH EE, SCHNABEL KC, LONG CE, MCCONNOCHIE KM, HILDRETH SW, ANDERSON LJ. 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.**;162(6):1283-90, 1990.

HALL CB, WALSH EE, LONG CE, SCHNABEL KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **J Infect Dis.**;163(4):693-8, 1991.

HALM EA, TEIRSTEIN AS. Management of Community-Acquired Pneumonia. **N Engl J Med.** Dez 19;347(25):2039-45, 2002.

HARDY RW, WERTZ GW. The product of respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. **J. Virol.** 72:520-526, 1998.

HENDRY RM, PIERIK LT, MCINTOSH K. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. **J Infect Dis.**;160(2):185-90, 1989.

HENRICKSON KJ, HALL CB. Diagnostic assays for respiratory syncytial virus disease. **Pediatr Infect Dis J.**;(11):36-40, 2007.

HOMA FL, BRIDEAU RJ, LEHMAN DJ, THOMSEN DR, OLMSTED RA, WATHEN MW. Development of a novel subunit vaccine that protects cotton rats against both human respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type-3. **Gen. Virol.**, 74, 1999.

HORNSLETH A, KLUG B, NIR M, JOHANSEN J, HANSEN KS, CHRISTENSEN LS, LARSEN LB. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions. **Pediatr Infect Dis J.**;17(12):1114-21, 1998.

HU A, COLELLA M, TAM J S, RAPPAPORT R, CHENG S. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 149-154, 2003.

HUANG YT, WERTZ GW. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. **J. Virol.**, 43(1):150-157, 1982.

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – Arquivos do Projeto Pneumococos, 2006. Radiografia de paciente com PAC com infiltrado no lobo superior direito.

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS - Laboratório de Vírus Respiratório, 2007. Coletor plástico de secreções de aspirado da nasofaringe utilizado para pesquisa de Vírus Respiratórios.

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS - Laboratório de Vírus Respiratório, 2007. Desenho ilustrativo de coleta de secreções da nasofaringe dos pacientes.

JAFRI HS. Treatment of respiratory syncytial virus: antiviral therapies. **Pediatr Infect Dis J.**;22(2):89-92, 2003.

JANG JE, LEE JB, KIM KH, PARK SM, SHIM BS, CHEON IS, SONG MK, CHANG J. Evaluation of Protective Efficacy of Respiratory Syncytial Virus Vaccine against A and B Subgroup Human Isolates in Korea. **PLoS One**; 6(9):e23797, 2011.

JOHN LIBBEY EUROTEXT, França 2007. Versão eletrônica disponível em: http://www.jle.com/en/revues/bio_rech/vir/e-ocs/00/04/0E/51/texte_alt_jlevir00016_gr1.jpg, acessado em 14 de junho de 2011.

JOHNSON PR, SPRIGGS MK, OLMSTED RA, COLLINS PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial víruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A.**;84(16):5625-9, 1987.

KARRON RA, BUONAGURIO DA, GEORGIU AF, WHITEHEAD SS, ADAMUS JE, SIDHU MS. Respiratory syncytial vírus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication *in vitro*: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. **Proc Natl Acad Sci U S A.**;94(25):13961-6, 1997.

KARRON RA, WRIGHT PF, BELSHE RB, THUMAR B, CASEY R, NWEEMAN F, POLACK PF, RANDOLPH VB, DEATLY A, HACKELL J, GRUBER W, MURPHY BR, COLLINS PL. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. **J. Infect. Dis.** 191: 1093-104, 2005.

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, 2010. Versão eletrônica disponível em: <http://www.kuleuven.be/regamvr/research.html>, acessado em 03 de julho de 2011.

KELLOGG JA. Culture vsdirect antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial vírus. **Arch Pathol Lab Med.**;115(5):451-8, 1991.

KIM HW, CANCHOLA JG, BRANDT CD, PYLES G, CHANOCK RM, JENSEN K, PARROTT RH. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. **Am J Epidemiol.**;89,422-434, 1969.

KINGSBURY DW. **Paromyxoviridae and their replication.** In: B.N. Fields, Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.,942-945, 2001.

KNEYBER MC, MOLL HA, DE GROOT R. Treatment and prevention of respiratory syncytial vírus infection. **Eur J Pediatr.**;159(6):399-411, 2000.

KNEYBER MC, BLUSSÉ vanO-AH, van VLIET M, UITERWAAL CS, KIMPEN JL, van VUGHT AJ. Concurrent bacterial infection and prolonged mechanical ventilation in infants with respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. **Intensive Care Med.** 31(5):680-5, 2005.

KOTELKIN A, BELYAKOV IM, YANG L, BERZOFKY JA, COLLINS PL, BUKREYEV A. The NS2 protein of human respiratory syncytial virus suppresses the cytotoxic T-cell response as a consequence of suppressing the type I interferon response. **J Virol.** Jun;80(12):5958-67, 2006.

LAW BJ, CARBONELL-ESTRANY X, SIMÕES EAF. An update on respiratory syncytial vírus epidemiology: a developed country perspective. **Resp Med.**;96:S1-S7, 2002.

LEE JT, CHANG LY, WANG LC, KAO CL, SHAO PL, LU CY, LEE PI, CHEN JM, LEE CY, HUANG LM: Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in northern Taiwan, 2001-2005 -- seasonality, clinical characteristics, and disease burden. **J Microbiol Immunol Infect.**; 40:293-301, 2007.

LEE KY, YOUN YS, LEE JW, KANG JH. Pneumonia por micoplasma, pneumonia bacteriana e pneumonia viral. **J. Pediatr. (Rio J)** - Vol. 86, Nº 6, 2010.

LEVINE S, KLAIBER-FRANCO R, PARADISO PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial vírus. **J. Gen. Virol.**, V.68, N.9, p.2521-2524, 1987.

LOW KW, TAN T, NG K, TAN BH, SUGRUE RJ. The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. **Biochem Biophys Res Commun.**;366(2):308-13, 2008.

MACKAY, I.M., ARDEN, K.E., Nitsche, A. Survey and Summary real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res.**;30(6):1292-305, 2002.

MALHOTRA R, WARD M, BRIGHT H, PRIEST R, FOSTER MR, HURLE M, BLAIR E, BIRD M. Isolation and characterization of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. **Mic. Infect.**, 5: 123-133, 2003.

MARCOS MA, ESPERATTI M, TORRES A. Viral pneumonia. **Curr Opin Infect Dis,** 22(2):143-7, 2009.

MARTINEZ I, MELERO JA. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. **J. Virol.**, 81: 2715-2722, 2000.

MASON SW, LAWETZ C, GAUDETTE Y, DÔ F, SCOUTEN E, LAGACÉ L, SIMONEAU B, LIUZZI M. Polyadenylation-dependent screening assay for respiratory syncytial vírus RNA transcriptase activity and identification of an inhibitor. **Nucleic Acids Res.**;32(16):4758-67, 2004.

MATHISEN M, STRAND TA, SHARMA BM, CHANDYO RK, VALENTINER-BRANTH P, BASNET S, ADHIKARI RK, HVIDSTEN D, SHRESTHA PS, SOMMERFELT H. Clinical

presentation and severity of viral community-acquired pneumonia in young Nepalese children. **Pediatr Infect Dis J.** Jan;29(1):e1-6, 2010.

MCINTOSH K. Community-acquired pneumonia in children. **N Engl J Med.**;346(6):429-37, 2002.

MEISSNER HC, FULTON DR, GROOTHUIS JR, GEGGEL RL, MARX GR, HEMMING VG, HOUGEN T, SNYDMAN DR. Controlled trial to evaluate protection of high-risk infants against respiratory syncytial virus disease by using standard intravenous immune globulin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 37: 1655-1658, 1993.

MEJÍAS A, CHÁVEZ-BUENO S, RÍOS AM, ATEN MF, RAYNOR BR, PEROMINGO E, SONI P, OLSEN KD, KIENER PA, GÓMEZ AM, JAFRI HS, RAMILO O. Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: time versus potency. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 49: 4700-4707, 2005.

MEMORIAL UNIVERSITY OF NEWFOUNDLAND, Canada 2011. Versão eletrônica disponível em: http://www.mun.ca/biology/scarr/Quantitative_RT-PCR9.jpg, acessado em 20 de julho de 2011.

MICHELOW IC, OLSEN K, LOZANO J, ROLLINS NK, DUFFY LB, ZIEGLER T, KAUPPILA J, LEINONEN M, McCracken GH Jr. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. **Pediatrics** 113(4):701-7, 2004.

MLINARIC-GALINOVIC G, VOJNOVIC G, CEPIN-BOGOVIC J, BACE A, BOZIKOV J, WELLIVER RC, WAHN U, CEBALO L. Does the viral subtype influence the biennial cycle of respiratory syncytial virus?. **Virol J**, 6:133, 2009.

MOHAPATRA SS, BOYAPALLE S. Epidemiologic, Experimental, and Clinical Links between Respiratory Syncytial Virus Infection and Asthma. **Clin Microbiol Rev.** Jul;21(3):495-504, 2008.

MORRIS JA, BLOUNT RE JR, SAVAGE RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proc Soc Exp Biol Med.**;92(3):544-9, 1956.

MOURA FEA, BORGES LC, PORTES SA, RAMOS EA, SIQUEIRA MM. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**;98(6):739-43, 2003.

MOURA FEA, BLANE A, FRABASILE S, DELFRARO A, SIERRA MJ, TOME L, RAMOS EAG, SIQUEIRA MM, ARBIZZA J. Genetic diversity of respiratory syncytial

virua isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. **J Med Virol.**; 74:156-160, 2004.

MUFSON MA, ORVELL C, RAFNAR B, NORRBY E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J Gen Virol.**;66:2111-24, 1985.

MUNYWOKI P, HAMID FJ, MUTUNGA M, *et al.*. Improved sensitivity in detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction using nasopharyngeal flocced swabs. **J Clin Microbiol** (Submitted), 2001.

NAGAI K, KAMASAKI H, KUROIWA Y, OKITA L, TSUTSUMI H. Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. **J Med Virol.**;74:161-165, 2004.

NATURE REVIEWS – microbiology. Nature Publishing Group, 2006. Versão eletrônica disponível em: <http://forum.prisonplanet.com/index.php?topic=135734.0>, acessado em 10 de julho de 2011.

NG WF, TO KF, LAM WW, NG TK, LEE KC. The comparative pathology of severe acute respiratory syndrome and avian influenza A subtype H5N1--a review. **Hum Pathol.**;37(4):381-90, 2006.

NIEDERMAN MS. Recent advances in communityacquired pneumonia: inpatient and outpatient. **Chest.**;131:1205-15, 2007.

NYATI MK, SREEKUMAR A, LI S, ZHANG M, RYNKIEWICZ SD, CHINNAIYAN AM. High and selective expression of yeast cytosine deaminase under a carcinoembryonic antigen promoter-enhancer. **Cancer Res.**;62(8):2337-42, 2002.

OGRA PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Pediatric Respir Rev.**;5:119-26, 2004.

OIEN NL, BRIDEAU RJ, WALSH EE, WATHEN MW. Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric FG glycoprotein and cholera toxin B subunit. **Vaccine**, 12: 731-735, 1994.

OLIVEIRA TFM, FREITAS GRO, RIBEIRO LZG, YOKOSAWA J, SIQUEIRA MM, PORTES SAR, SILVEIRA HL, CALEGARI T, COSTA LF, MANTESE OC, QUEIRÓZ DAO, 2008. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol. 103(5): 417-422, 2008.

ONG GM, WYATT DE, O'NEILL HJ, MCCAUGHEY C, COYLE PV. A comparison of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for the diagnosis of

respiratory infections in children with bronchiolitis, and the implications for a cohorting strategy. **J Hosp Infect.**;49(2):122-8, 2001.

OPENSHAW PJ, CULLEY FJ, OLSZEWSKA W. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. **Vaccine.**;20:S27-31, 2001.

OTTOLINI MG, HEMMING VG. Prevention and treatment recommendations for respiratory syncytial virus infection – background and clinical experience 40 years after discover. **Drugs.** 54: 867-884, 1997.

PAPADOPOULOS NG, GOURGIOTIS D, JAVADYAN A, BOSSIOS A, KALLERGI K, PSARRAS S, TSOLIA MN, KAFETZIS D. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? **Respir Med.** 98: 879-882, 2004.

PECCHINI R, BEREZIN EN, FELICIO MC, PASSOS SD, DE SOUZA MC, DE LIMA LR. Incidence and Clinical Characteristics of the Infection by the respiratory Syncytial Virus in Children Admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. **Braz J Infect Dis.**, 12:476-9, 2008.

PIEDRA PA, GRACE S, JEWELL A, SPINELLI S, HOGERMAN DA, MALINOSKI F. Sequential annual administration of purified fusion protein vaccine against respiratory syncytial virus in children with cystic fibrosis. **Pediatric. Infect. Dis.** 17: 217-24, 1998.

PITREZ PMC. Bronquiolite aguda por rinovírus em lactentes jovens. **J Ped**, 81(5) : 417-20, 2005.

POLACK FP, TENG MN, COLLINS PL, PRINCE GA, EXNER M, KARRON RA. A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. **J Exp Med.** Sep 16;196(6):859-65, 2002.

POLAK MJ. Respiratory syncytial virus (RSV): overview, treatment and prevention strategies. **Newborn and Infant Nursing Reviews.**;14(1):15-23, 2004.

PRINCE GA, HORSWOOD RL, CHANOCK RM. Quantitative aspects of passive immunity to respiratory syncytial virus infection in infant cotton rats. **J Virol.** 55:517-520. 1985.

QUEIROZ DA, DURIGON, EL, BOTOSSO VF, EJZEMBERG B, VIEIRA SE, MINEO JR, YAMASHITA, C, HEIN N, LOPES CL, CACHARO AL STEWIEN KE. Immune response to respiratory syncytial virus in Young Brazilian children. **Braz J Med Biol Res.**;35(10):1183-93, 2002.

RANDOLPH AG, REDER L, ENGLUND JA. Risk of bacterial infection in previously healthy respiratory syncytial virus-infected young children admitted to the intensive care unit. **Pediatr Infect Dis J.** 23(11):990-4, 2004

RANDOLPH VB, KANDIS M, STEMLER-HIGGINS P, KENNELLY MS, MCMULLEN YM, SPEELMAN DJ, WEEKS-LEVY C. Attenuated temperature sensitive respiratory syncytial virus mutants generated by cold adaptation. **Virus Res.**, 33: 241-259, 1994.

REIS AD, FINK MCD, MACHADO CM, PAZ JP, OLIVEIRA RR, TATENO AF, MACHADO AF, CARDOSO MR, PANNUT CS. Comparison of direct immunofluorescence, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** 50(1):37-40, 2008.

RICCETTO AGL, RIBEIRO JD, DA SILVA MTN, ALMEIDA RS, ARNS CW, BARACAT EC. Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Infants Hospitalized for Acute Lower Respiratory Tract Disease: Incidence and Associated Risks. **Braz J Infect Dis.**, 10(5):357-36, 2006.

RIXON HWM, BROWN G, SUGRUE RJ. Multiple glycosylated forms of the respiratory syncytial virus fusion protein are expressed in virus-infected cell. **J. Gen. Virol.** 83: 61-66, 2002.

RIXON HW, BROWN G, AITKEN J, MCDONALD T, GRAHAM S, SUGRUE RJ. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. **J Gen Virol.**;(5):1153-65, 2004.

RODRIGUES JC, FILHO LVFS, BUSH A. Diagnóstico etiológico das pneumonias – uma visão crítica. **J Pediatr.**;78:129-40, 2002.

RUIZ-ARGÜELLO MB, MARTÍN D, WHARTON SA. Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism. **J Gen Virol.**;85(Pt 12):3677-87, 2004.

SALOMÃO JUNIOR JB, GARDINASSI LG, SIMAS PV, BITTAR CO, SOUZA FP, RAHAL P, ZANETTA DM. Human respiratory syncytial virus in children hospitalized for acute lower respiratory infection. **J Pediatr (Rio J).** 8;87(3):219-24, 2011.

SANTOS MC. **Caracterização molecular de cepas do vírus respiratório sincicial isoladas de casos de infecção respiratória aguda na cidade de Belém, Pará, Brasil entre os anos de 2000 a 2006.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará, 2006.

SANTOS NSO. **Viroses Respiratórias**. In: Introdução a Virologia Humana. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro., 264-269, 2008.

SASTRE P, MELERO JA, BARRENO-GARCÍA B, PALOMO C. Comparison of antibodies directed against human respiratory syncytial virus antigens present in two commercial preparations of human immunoglobulins with different neutralizing activities. **Vaccine**, 23: 435-443, 2004.

SATO MR, SAITO T, SAKAI Y, SANO M, NISHIKAWA A, SUZUKI H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. **J Clin Microbiol.**;43:36-40, 2005.

SCHLENDER J, ZIMMER G, HERRLER G, CONZELMANN KK. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. **J Virol.** Apr;77(8):4609-16, 2003.

SCOTT PD, OCHOLA R, NGAMA M, OKIRO EA, NOKES DJ, MEDLEY GF, CANE PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. **J Med Virol.**;74(2):344-54, 2004.

SHAY D, HOLMAN RC, ROOSEVELT GE, CLARK MJ, ANDERSON LJ. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus – associated deaths among US children, 1979-1997. **J Infect Dis.**;183:16-22, 2001.

SHIN SH, CHOI CW, LEE J-A, KIM E-K, CHOI EH, KIM H-S, KIM, B, CHOI J-H. Risk factors for serious bacterial infection in febrile young infants in a community referral hospital. **J Korean Med Sci.**; 24: 844-8, 2009.

SILVA LHA, SPILKI FR, RICCETTO AGL, BARACAT ECE, ARNS CW. Vírus Respiratório Sincicial Humano e Metapneumovírus Humano. **Rev HCPA**;29(2):139-146, 2009.

SILVA AK, SANTOS MC, MELLO WA, SOUZA RCM. Occurrence of Human Bocavirus associated with acute respiratory infections in children up to 2 years old in the city of Belém, Pará State, Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude** 1(1):87-92, 2010.

SIMABUCO FM. **Expressão das proteínas N e P do Vírus Respiratório Sincicial Humano: estudos funcionais e de imunização**. Tese de doutorado – Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, 2008.

SIMÕES EAF, SONDHEIMER HM, MEISSNER HC. Respiratory syncytial virus immunoglobulin as prophylaxis against respiratory syncytial virus in children with congenital heart disease. **Pediatr. Res.**, 39: 113A, 1996.

SISTEMA NERVOSO, 2004/2005. Versão eletrônica disponível em: <http://www.sistemanervoso.com/pagina>, acessado em 20 de julho de 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, Brasil 2010. Versão eletrônica disponível em: http://www.sbp.com.br/show_item2.cfm?id_categoria=89&id_detalhe=2223&tipo_detalhe=s, acessado em 20 de julho de 2011.

SPANN KM, TRAN KC, CHI B, RABIN RL, COLLINS PL. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. **J Virol.** Apr;78(8):4363-9, 2004.

STENSBALLE LG, DEVASUNDARAM JK, SIMOES EAF. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. **Pediatr Infect Dis J.**;22(2):S21-32, 2003.

STRALIOTTO SM, NESTOR SM, SIQUEIRA MM. Respiratory Vírus Groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 92(2):155-58, 2001.

STRALIOTTO SM, SIQUEIRA MM, MULLER RL, FISCHER GB, CUNHA MLT, NESTOR SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**;(4):283-291, 2002.

SULLENDER WM. Respiratory syncytial vírus genetic and antigenic diversity. **Clin Microbiol Rev.**;(1):1-15, 2000.

SUWANJUTHA S, SUNAKORN P, CHANTAROJANASIRI T, SIRITANTIKORN S, NAWANOPARATKUL S, RATTANADILOK, *et al.* Respiratory syncytial virus-associated lower respiratory tract infection in under-5-year-old children in a rural community of central Thailand, a population-based study. **J Med Assoc Thai,** 85 suppl 4:S1111-9, 2002.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, 2009. Versão eletrônica disponível em: http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/90.html, acessado em 03 de julho de 2011.

TANG RS, NGUYEN N, CHENG X, JIN H. Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. **J. Virol.** 75: 11328-11335, 2001.

TAWAR RG, DUQUERROY S, VONRHEIN C, VARELA PF, DAMIER-PIOLLE L, CASTAGNÉ N, MACLELLAN K, BEDOUELLE H, BRICOGNE G, BHELLA D, ELÉOUËT JF, REY FA. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. **Science.** Nov 27;326(5957):1279-83, 2009.

TECHAARPORNKUL S, COLLINS PL, PEEPLES ME. Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. **Virology**.;294(2):296-304, 2002.

THOMAZELLI LM. **Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pela técnica de GeneScan-RT-PCR**. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, 2004.

THORBURN K, HARIGOPAL S, REDDY V. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. **Thorax**. 61:611–5, 2006.

TITUS MO, WRIGHT SW. Prevalence of serious bacterial infections in febrile infants with respiratory syncytial virus infection. **Pediatrics** 112(2):282-4, 2003.

TRAN TL, CASTAGNÉ N, BHELLA D, VARELA PF, BERNARD J, CHILMONCZYK S, *et al*. The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprote in complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein promoter. **J Gen Virol.**; (1):196-206, 2007.

TREANOR JJ. **Respiratory infections**. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG. Clinical Virology. Washington: ASM Press;. p.7-26, 2002.

TRENTO A, GALIANO M, VIDELA C, CARBALLAL G, GARCÍA-BARRENO B, MELERO JA, PALOMO C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. **J Gen Virol.**;(11):3115-20, 2003.

TRENTO A, VIEGAS M, GALIANO M, VIDELA C, CARBALLAL G, MISTCHENKO AS, MELERO J.A. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication, **J. Virol.**;p975–984, 2006.

TRISTAM DA, WELLIVER RC. **Respiratory syncytial virus**. In: Diagnostic Procedure for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7th ed. American Public Health Association, 1996.

UNIVERSITY OF CAPE TOWN, 2011. Versão eletrônica disponível em: [HTTP://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/syncytia.html](http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/syncytia.html), acessado em 03 de julho de 2011.

VALDIVIA A, GONZALEZ G, CHACON D, SAVON C, OTERO A, VALDES O *et al*. Antigenic and genetic characterization of twenty six strains of human respiratory

syncytial vírus (subgroup A) isolated during three consecutive outbreaks in Havana city, Cuba. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**; 94(4):469-475, 1999.

VAN DEN HOOGEN BG, JONG JC, GROEN J, KUIKEN T, GROOT R, FOUCHIER RA, OSTERHAUS AD. A newly discovered hum pneumovirus isolated in young children with respiratory tract disease. **Nat Med.**, 7:719-724, 2001.

VAN ELDEN LJ, VAN KRAAIJ MG, NIJHUIS M, HENDRIKSEN KA, DEKKER AW, ROZENBERG-ARSKA M, VAN LOON AM. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory víruses in adults with hematological cancer and pneumonia. **Clin Infect Dis.**;34(2):177-183, 2002.

VAN ELDEN LJR, VAN LOON AM, VAN DER BEEK A, HENDRIKSEN AW, HOEPELMAN AIM, VAN KRAAIJ MGJ, SCHIPPER P, NIJHUIS M. Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial vírus infection in immunocompromised adults. **J Clin Microbiol.**;41(9):4378-4381, 2003.

VAN REGENMORTELM MHV, FAUQUET CM, BISHOP DHL, CARTENS EB, ESTES MK, LEMON SM, MANILOFF, J, MAYO MA, MCGEOCH DJ, PRINGLE CR, WICKNER RB. **Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses.** 7th report of the international committee on Taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego; 529-59, 2000.

VENTER M, MADHI SA, TIEMESSEN CT, SCHOUB BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial vírus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. **J Gen Virol.**;82(9):2117-24, 2001.

VIEGAS M & MISTCHENKO AS. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004). **J Med Virol.**; 77:302-310, 2005.

VIEIRA SE, STEWIEN KE, QUEIROZ DA, DURIGON EL, TÖRÖK TJ, ANDERSON LJ, *et al.* Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial vírus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**;43(3):125-31, 2001.

VIEIRA SE, GILIO AE, MIYAO CR, PAHL MMC, LOTUFO JPB, HEIN N. Infecção nosocomial pelo vírus respiratório sincicial em enfermaria de pediatria. **Pediatrics (São Paulo).**; 24(1/2):17-24, 2002.

VIEIRA RA, DINIZ EMA, VAZ FAC. Clinical and laboratory study of newborns with lower respiratory tract infection due to respiratory viruses. **J Matern Fetal Neonatal Med.**;13:341-50, 2003.

VISUAL PHOTOS, 2011. Foto cedida pelo CDC. Versão eletrônica disponível em: http://www.visualphotos.com/photo/2x4139508/respiratory_syncytial_virus_coloured_transmission_f0010580.jpg, acessado em 03 de julho de 2011.

WADSWORTH CENTER – New York state department of health, 2011. Versão eletrônica disponível em: <http://www.wadsworth.org/images/virology/RSV.jpg>, acessado em 10 de julho de 2011.

WELLIVER RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. **Pediatr Infect Dis J.**;2):S6-S12, 2003.

WERTZ GW, COLLINS PL, HUANG Y, GRUBER C, LEVINE S, BALL LA. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.**;82(12):4075-9, 1985.

WHO - World Health Organization in “Development of a Global Action Plan for Prevention and Control of Pneumonia (GAPP)”. Report of an informal consultation, Chavannes de Bogis, Switzerland, 25-27 February 2008. Publication date: 2009.

WILSON SD, ROBERT K, HAMMOND K, AYRES JG, CANE PC. Estimation of incidence of respiratory syncytial virus infection in schoolchildren using salivary antibodies. **J. Med. Virol.**, 61: 81-4, 2000.

WINTHER B, HAYDEN FG, ARRUDA E, DUTKOWSKI R, WARD P, HENDLEY JO. Viral respiratory infection in schoolchildren: effects on middle ear pressure. **Pediatrics.** May;109(5):826-32, 2002.

WRIGHT PF, KARRON RA, BELSHE RB, THOMPSON J, CROWE JE JR, BOYCE TG, HALBURNT LL, REED GW, WHITEHEAD SS, ANDERSON EL, WITTEK AE, CASEY R, EICHELBERGER M, THUMAR B, RANDOLPH VB, UDEM SA, CHANOCK RM, MURPHY BR. Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. **J. Infect. Dis.** 182(5): 1331-42, 2000.

WU H, PFARR DS, TANG Y, AN LL, PATEL NK, WATKINS JD, HUSE WD, KIENER PA, YOUNG JFH. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. **J. Mol. Biol.**1;350(1):126-44 2005.

WULFF H, KIDD P, WENNWE HA. Respiratory syncytial virus: Observations on antigenic heterogeneity. **Proc Soc Exp Biol Med.**;115: 240-3, 1964.

XU Z, KUANG M, OKICKI JR, CRAMER H, CHAUDHARY N. Potent inhibition of respiratory syncytial virus by combination treatment with 2-5A antisense and ribavirin. **Antiviral Res.** Mar;61(3):195-206, 2004.

YU Q, HARDY RW, WERTZ GW. Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. **J. Virol.**;69(4):2412-9, 1995.

ZELAYA EA, PETTERSON CA, FORSGREN M, ORVELL C, STRANNEGARD O. Respiratory syncytial virus infection in hospitalized patients and healthy children in El Salvador. **Am J Trop Med Hyg.**;51:577-84, 1994.

ZENG RH, GONG W, FAN CF, WANG YF, MEI XG. Induction of balanced immunity in BALB/c mice by vaccination with a recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment and a CTL epitope. **Vaccine.** Feb 13;24(7):941-7. Epub 2005 Aug 30, 2006.

ZHANG HY, LI ZM, ZHANG GL, DIAO TT, CAO CX, SUN HQ. Respiratory Viruses in Hospitalized Children with Acute Lower Respiratory Tract Infection in Harbin, China. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 62,458-460, 2009.

ZHAO X, SINGH M, MALASHKEVICH VN, KIM PS. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Dec 19;97(26):14172-7, 2000.

ZHAO X, CHEN FP, SULLENDER WM. Respiratory syncytial virus escape mutant derived *in vitro* resists palivizumab prophylaxis in cotton rats. **Virology.**;318(2):608-612, 2004.

ZHENG H, PERET TC, RANDOLPH VB, CROWLEY JC, ANDERSON LJ. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strains of respiratory syncytial virus. **J Clin Microbiol.**; 34: 334-7, 1996.

ZLATEVA KT, LEMEY P, MOËS E, VANDAMME AM, VAN RANST M. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup A: positively selected sites in the attachment G glycoprotein. **J. Virol.**;4675-83, 2004.

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1 – Anexo I – Termo de Consentimento

Termo de consentimento livre e esclarecido – grupo PAC

Protocolo 106086 Epi Strep

Versão 3.2 baseado no modelo da versão 3.0 para o Brasil de Rixensart

CONFIDENCIAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Identificação do Estudo: 106086 Epi Strep

Título do estudo: Vigilância prospectiva, com base populacional, da doença invasiva e da otite média aguda, causadas por *S. pneumoniae* ou por *H. influenzae* e da pneumonia adquirida na comunidade em crianças de 1 mês (> 28 dias) até 35 meses de idade, inclusive.

Número da Versão: Versão 3.2 baseado no modelo da versão 3.0 para o Brasil de Rixensart para Pneumonia adquirida na comunidade, de 26 de outubro de 2006.

Data: 17 de agosto de 2007

País: Brasil

Nome da empresa patrocinadora: GlaxoSmithKline Biológicos S.A.

Número do Indivíduo: _____

Este documento deve ser apresentado ao Representante Legalmente Aceito em sua totalidade; nenhuma página ou seção deve ser omitida. O conteúdo do documento deve ser explicado verbalmente ao Representante Legalmente Aceito.

O principal objetivo deste documento é fornecer para você a informação necessária para ajudá-lo(la) a decidir sobre a participação de seu filho/tutelado(a) neste estudo. Antes de decidir, por favor, reserve um tempo para ler este documento cuidadosamente e sinta-se à vontade para fazer quaisquer questionamentos se houver algo que não esteja claro ou se você necessitar de maiores informações.

Finalidade/descrição do estudo:

As infecções respiratórias agudas assim como a pneumonia são responsáveis por um número importante de mortes e hospitalizações em crianças com menos de 5 anos. Entre os casos numerosos, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* são as bactérias mais comumente ligadas a essas doenças.

Uma das finalidades deste estudo é obter informações sobre pneumonia em crianças da região em que você vive. Este estudo está sendo realizado em três países: Argentina, Brasil e Panamá.

CONFIDENCIAL

Estas informações nos darão a base para elaborar futuros estudos para avaliar a eficácia de vacinas para prevenir as doenças causadas por estas duas bactérias (micróbios)

Aprovação do protocolo

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas.

Procedimentos do estudo

O médico solicitou uma chapa de raio-X do pulmão de seu filho/tutelado para avaliar se ele tem pneumonia.

Gostaríamos se solicitar seu consentimento para que seu filho/tutelado participe deste estudo, no qual teremos informações sobre a doença dele, incluindo os testes realizados durante a avaliação médica.

Se você concordar em participar, tiraremos uma cópia do raio-X para ser avaliado posteriormente por outros especialistas.

Em caso de suspeita de pneumonia, um dos resultados de testes que necessitamos analisar é da chamada “Proteína C-reativa”, que é feito no sangue. Caso este teste não tenha sido realizado, pedimos o seu consentimento para coletar uma amostra de sangue do seu filho/tutelado (cerca de 2 ml), para realizá-lo.

Caso o seu filho/tutelado seja hospitalizado e a pneumonia confirmado, será realizado outro teste para verificar se ele “pegou” outro micróbio, um vírus chamado Vírus Sincicial Respiratório. Para isso também precisaremos coletar material (muco) da nasofaringe (nariz e garganta), que será feito com uma espécie de cotonete mais comprido, por alguém da equipe de enfermagem.

Caso a pneumonia de seu filho/tutelado evolua para uma doença invasiva grave, como meningite e doença febril, vamos pedir uma amostra de cerca de 5 ml de sangue ou líquido corporal estéril (flúidos do corpo que normalmente não contém micróbios). *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* são as bactérias mais comumente causam doenças invasivas graves. Ela é chamada invasiva porque a bactéria invade o sangue e pode afetar órgãos como os pulmões e as meninges (uma capa de tecido fino que cobre o cérebro). Apesar de contar com vários tipos de antibióticos para tratar estas infecções, às vezes tais doenças tornam-se muito graves e difíceis de tratar, podendo resultar em morte ou danos diversos, como: retardo mental, defeitos no corpo, na fala, surdez, cegueira, etc.

Uma vez que foi confirmada a presença da bactéria *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* no sangue ou líquido corporal estéril de seu filho/tutelado, a bactéria será enviada para um laboratório central em outro país a ser definido pela GlaxoSmithKline, para que sejam feitos outros testes mais específicos para a identificação desta bactéria. Além disso, a amostra coletada será guardada por um laboratório central apontado pela empresa, para fins específicos determinados neste estudo. Cabe a esse laboratório observar rigorosamente as normas relacionadas à guarda desse material, no que se refere, aos aspectos da biossegurança e regras que regem a guarda de material biológico. Essa

CONFIDENCIAL

guarda se restringirá ao período necessário para a conclusão da pesquisa, após o qual esse material será descartado.

Um dos outros objetivos deste estudo é obter informações sobre doenças invasivas em crianças com menos de 3 anos na região em que seu filho/tutelado mora.

Essas informações serão importantes para ajudar a planejar futuros estudos sobre a eficácia das vacinas de prevenção das doenças causadas pelas duas bactérias.

Além disso, faremos algumas perguntas gerais sobre as condições de saúde do seu filho/tutelado, incluindo a doença.

Este estudo será realizado em três países: Argentina, Brasil e Panamá.

A participação do seu filho/tutelado neste estudo só ocorrerá enquanto a doença propriamente dita durar.

Número de indivíduos

Não existe nenhum limite quanto ao número de indivíduos.

Participação voluntária e direito de interromper a participação

A participação de seu filho/tutelado neste estudo é voluntária. Se você decidir permitir que seu filho/tutelado participe, será pedido que assine este termo de consentimento livre e esclarecido.

Se você não quiser que seu filho/tutelado participe, isso não prejudicará o atendimento ou os benefícios que ele geralmente recebe neste centro de saúde. Se você decidir permitir que seu filho/tutelado participe, será possível desistir do estudo a qualquer momento, sem prejudicar o atendimento que ele geralmente recebe neste centro de saúde.

Riscos

Praticamente não há riscos diretos associados a este estudo, com exceção da coleta de uma amostra de sangue ou líquido corporal estéril (líquidos do corpo que normalmente não contém micróbios) do seu filho/tutelado. Esse procedimento pode ser desconfortável, mas raramente resulta em quaisquer problemas significativos. Os riscos incluem desconforto temporário da entrada da agulha, sensação de tontura, leve ferida e, muito raramente, infecção no local da picada da agulha. Médicos da equipe do estudo juntamente com a patrocinadora (GlaxoSmithKline) darão toda a assistência necessária caso ocorra algum evento decorrente de algum procedimento deste estudo.

Benefícios da participação no estudo

Com a participação neste estudo, serão colocadas a sua disposição mais informações sobre a doença de seu filho/tutelado. Estas informações serão muito úteis para conhecer o impacto da doença em crianças com até 3 anos de idade nos países participantes.

Pagamento para participantes

Você não receberá pagamento por participar desta pesquisa.

Termo de consentimento livre e esclarecido – grupo PAC
Versão 3.2 baseado no modelo da versão 3.0 para o Brasil de Rixensart

Protocolo 106086 Epi Strep

CONFIDENCIAL

**Contato para dúvidas referentes ao estudo
Se houver qualquer dúvida em relação ao estudo, contate:**

Nome do pesquisador: Francisco Lúzio de Paula Ramos.

Endereço do pesquisador: Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Av. Almirante Barroso 492, 66.090-000, Belém, Pará, Brasil.

Números de telefone do pesquisador: 3217-3189, 3217-3178, 3217-3141.

Número do fax do pesquisador: 3246-7230

Contato na Comissão de Ética em Pesquisas do Instituto Evandro Chagas (CEP-IEC)

Nome do Coordenador: Manoel do Carmo Soares

Endereço do CEP-IEC: Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Av. Almirante Barroso 492, 66.090-000, Belém, Pará, Brasil.

Números do telefone do CEP-IEC: 3202-4661, 3202-4618, 3202-4670.

Confidencialidade quanto às informações médicas e pessoais fornecidas.

Se você decidir permitir que seu filho/tutelado participe do estudo, o médico e a equipe do estudo irão coletar informações médicas pessoais sobre ele, como parte da realização do estudo. As pessoas que trabalham na GSK ou em seu nome, e outras como o comitê de ética em pesquisa (CEP) do estudo ou as autoridades responsáveis pela aprovação de medicamentos, terão acesso a estas informações na clínica, a fim de verificar se o estudo está sendo realizado adequadamente. Estas pessoas manterão confidencialidade/sigilo das suas informações, pois estão cientes que devem respeitar as disposições legais do Brasil e do Conselho Federal de Medicina.

A equipe do estudo transmitirá para a GSK algumas das informações que coletar, em forma de código. As informações transmitidas não incluirão o nome, as iniciais, o endereço e outros identificadores diretos do seu filho/tutelado. Um código numérico será dado a essas informações; apenas a equipe do estudo pode vinculá-lo ao nome de seu filho/tutelado.

A sua permissão para que o médico e a equipe do estudo utilizem estas informações ou as compartilhem com a GSK e outros, conforme descrito abaixo, não termina automaticamente em qualquer momento específico.

Enquanto o seu filho/tutelado estiver no estudo, a equipe do estudo não compartilhará certas informações médicas novas sobre ele, que sejam criadas como parte do estudo (como os resultados de determinados testes), a menos que o médico do estudo decida ser clinicamente importante fazê-lo. Este procedimento impede que os resultados do estudo

CONFIDENCIAL

sejam distorcidos. Você sempre terá direito de acesso às informações médicas sobre o seu filho/tutelado, as quais queira ver. A qualquer momento, é possível solicitar ao médico do estudo permissão para ver as informações pessoais do seu filho/tutelado, como nome e endereço e corrigi-las se necessário.

Privacidade de dados

A GSK pode utilizar, das seguintes formas, as informações que receber do médico do estudo (isto é, os dados codificados):

- Armazenamento e análise eletrônica, para descobrir o que este estudo está nos informando;
- Compartilhamento do estudo com as autoridades reguladoras que aprovam novos medicamentos ou com grupos que verificam se a pesquisa esta sendo executada adequadamente;
- Publicação dos resultados do estudo (isso não inclui qualquer informação que o identifique diretamente);
- Compartilhamento do estudo, como parte de uma pesquisa, com outras empresas ou universidades com a finalidade de entender ou desenvolver novas vacinas, e com outros escritórios da GSK neste ou em outros países. Se as informações forem enviadas para outro país, a GSK aplicará o mesmo nível de proteção, de acordo com as permissões da legislação local;
- Utilização do estudo para planejar novos estudos ou outros tipos de pesquisa, ou para outras finalidades clínicas associadas ao desenvolvimento da vacina.

Função do patrocinador

A GSK transfere recursos financeiros à instituição para realizar este estudo, para pagamento de alguns médicos do estudo e da sua equipe.

As informações e materiais referentes ao estudo, que você está recebendo, são dados confidenciais que pertencem a GSK e devem ser mantidos em sigilo.

É permitido discutir estas informações em sigilo com seu médico, seus amigos e familiares para decidir se irá participar do estudo e conversar sobre o tratamento.

A GSK poderá interromper o estudo após análise e aceitação das justificativas pelo Comitê de Ética em Pesquisa local.

CONFIDENCIAL**Declaração de consentimento**

Eu, _____
(nome por extenso do pai ou representante legal)

- confirmo que li as informações escritas sobre o estudo 106086 Epi Strep, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 3.1 de 05 de fevereiro de 2007 para pneumonia adquirida na comunidade, de 6 páginas. Os procedimentos do estudo referentes ao grupo da pneumonia me foram explicados pela equipe da pesquisa, durante o processo de consentimento para este estudo.
- confirmo que tive a oportunidade de fazer perguntas sobre este estudo e que estou satisfeito com as respostas e explicações que recebi.
- entendo que permito o acesso aos dados, para as pessoas autorizadas descritas na folha de informações.
- tive tempo e oportunidade para considerar a participação neste estudo.

Concordo em permitir que meu filho/tutelado participe deste estudo.

• **Assinatura do pai ou representante legal:** _____

• **Data:** _____

• **Nome por extenso do pai ou representante legal:**

Declaração do médico/enfermeiro que aplicou o termo de consentimento livre e esclarecido:

Expliquei cuidadosamente a natureza, as exigências, os riscos e os benefícios previsíveis do estudo para a pessoa descrita acima e testemunhei o preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido por escrito.

• **Assinatura da pessoa que aplicou o termo:** _____

• **Data:** _____

• **Nome por extenso da pessoa que aplicou o termo:**

10.2 – Anexo II - Ficha de investigação clínico-laboratorial

PROJETO PNEUMOCOCOS

FICHA DE INFORMAÇÕES CLÍNICA E LABORATORIAL
PESQUISA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

Registro: _____

Nome: _____

Sexo: F M Data de nascimento: ____/____/____

Data da coleta: ____/____/____

Data de início dos sintomas: ____/____/____

Bairro / Residência: _____ UF

Sintomas clínicos presentes:

Febre Dor de garganta Coriza Obstrução nasal Artralgia Dores musculares Tosse Dor de cabeça Dor de ouvido Dor de garganta Outros

Especificar: _____

Coleta enviada por: _____

RESERVADO AO LABORATÓRIO

Registro Laboratorial: ____/____/____

Qualidade do material: Boa Razoável Não aproveitável **Resultado para VRS:**Positivo Negativo Inconclusível

Data do resultado: ____/____/____

Responsável: _____

10.3 – Anexo III – Artigo científico submetido**BMC Infectious Diseases****Prevalence and clinical features of Respiratory Syncytial Virus in children hospitalized for community-acquired pneumonia in northern Brazil.**

Letícia Martins Lamarão¹, Francisco Luzio Ramos², Wyller Alencar de Mello², Mirleide Cordeiro Santos², Luana Soares Barbagelata², Maria Cleonice Aguiar Justino², Alexandre Ferreira da Silva³, Ana Judith Pires Garcia Quaresma², Veronilce Borges da Silva², Rommel Rodríguez Burbano^{1*}, Alexandre da Costa Linhares².

Address: ¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Avenida Augusto Correa 01, 66075-900, Belém, PA, Brasil. ²Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Belém, PA, Brasil. ³Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

Abstract

Background: Childhood pneumonia and bronchiolitis is a leading cause of illness and death in young children worldwide with Respiratory Syncytial Virus (RSV) as the main viral cause. RSV has been associated with annual respiratory disease outbreaks and bacterial co-infection has also been reported. This study is the first RSV epidemiological study in young children hospitalized with community-acquired pneumonia (CAP) in Belém city, Pará (Northern Brazil). **Methods:** With the objective of determining the prevalence of RSV infection and evaluating the patients' clinical and epidemiological features, we conducted a prospective study across eight hospitals from November 2006 to October 2007. In this study, 1,050 nasopharyngeal aspirate samples were obtained from hospitalized children up to the age of three years with CAP, and tested for RSV antigen by direct immunofluorescence assay and by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for RSV Group identification. **Results:** RSV infection was detected in 243 (23.1%) children. The mean age of the RSV-positive group was lower than the RSV-negative group (12.1 months vs 15.5 months, $p < 0.001$) whereas gender distribution was similar. The RSV-positive group showed lower C-reactive protein (CRP) mean levels when compared to the RSV-negative group (15.3 vs 24.0mg/dL, $p < 0.05$). Radiological findings showed that 54.2% of RSV-positive group and 50.3% of RSV-negative group had interstitial infiltrate. Bacterial infection was identified predominantly in the RSV-positive group (10% vs 4.5%, $p < 0.05$). Rhinorrhea and nasal obstruction were predominantly observed in the RSV-positive group. A co-circulation of RSV Groups A and B was identified, with a predominance of Group B (209/227). Multivariate analysis revealed that age under 1 year ($p < 0.015$), CRP levels under 48mg/dL ($p < 0.001$) and bacterial co-infection ($p < 0.032$) were independently associated with the presence of RSV and in analyze of symptoms, nasal obstruction were independently associated with RSV-positive group ($p < 0.001$). **Conclusion:** The present study highlights the relevance of RSV infection in hospitalized cases of CAP in our region; our findings warrant the conduct of further investigations which can help design strategies for controlling the disease.

Background

Globally, RSV is the most common cause of childhood acute lower respiratory infection and is responsible for annual outbreaks worldwide [1-4]. RSV infection usually results in upper respiratory tract illness characterized by profuse rhinorrhea, however 25 – 40% of children experiencing infections in their first year of life may develop severe respiratory disease requiring hospitalization [1, 5, 6]. This may result in long-term respiratory disorders such as abnormal pulmonary function, asthma, recurrent cough, and bronchitis [7, 8]. RSV has two Groups, A and B, which are distinguished largely by antigenic and genetic characteristics. During epidemics, either Group A or B may predominate, or both Groups may circulate concurrently [7, 9]. Evidence for RSV infection has been found in every geographic area studied and the predominant occurrence changes according to the region's climates. In temperate countries RSV outbreaks coincide with winter and in tropical climates the pattern varying with most literature associating RSV with rainy season [10-13].

Pneumonia is among the main causes of illness and death in younger children throughout the world [14 -16]. There is a need for better assessing the epidemiology of viral CAP in developing countries where RSV infections substantially account for epidemics and are associated with a more severe clinical presentation of pneumonia [4]. Some retrospective studies investigated the occurrence of bacterial coinfection in children hospitalized with severe RSV infection and found the incidence of pulmonary bacterial coinfection to vary between 17.5 and 44% [15, 17, 18].

To our knowledge, this is the first RSV epidemiological study in children hospitalized with CAP in Belém city, Pará, Northern Brazil, to assess the epidemiological, clinical, and laboratory features of RSV infections among infants and young children. Moreover we sought to characterize the circulating RSV Groups in our region.

Methods

Study Population

Patients' clinical and epidemiological data were obtained during a cross-sectional study across eight hospitals carried out between November 2006 and October 2007, in Belém, Pará, located in the Northern tropical area of Brazil. We investigated for RSV infection in hospitalized children with CAP. This condition was as defined by medical practitioners of the project based on (A), (B) and (C). (A) Two clinical findings: cough, history of fever, pleuritic pain, crackles or bronchial breath sounds; (B) Chest radiographic findings consistent with pneumonia (focal airspace consolidation, patchy increased interstitial markings), and (C) patients admitted with less than 48 hours. Patients were included in this study if the following criteria were met: children up to the three years old, hospitalized, diagnosed with CAP and with a signed consent form obtained from parents or legal guardians at enrolment. This study was approved by the Ethics and Research Committee of Evandro Chagas Institute (IEC) in the context of a large prospective study that investigates the etiology of CAP in different countries.

Sample Collection

Nasopharyngeal aspirate samples were collected by vacuum suction through a plastic catheter and refrigerated at 4°C until transported on ice to the Respiratory Virus Laboratory at IEC. At the institute, the samples were processed within two hours for RSV antigen detection using the Direct Immunofluorescence Assay (DFA). RSV-positive samples were subsequently subjected to RT-PCR for the detection of the RSV Group.

Demographic data and clinical symptoms were also obtained. A questionnaire was filled by a trained technician including age, onset of symptoms, gender, blood bacterial culture, chest radiography, C-Reactive Protein (CRP) levels, and signs or symptoms of cough, rhinorrhea, fever, nasal obstruction, vomiting, and diarrhea were analyzed at the time of hospitalization.

Direct Immunofluorescence Assay (DFA)

DFA was carried out using specific monoclonal antibodies for the detection and identification of RSV in direct respiratory specimen cell preparation with Light Diagnostics™ Respiratory Syncytial Virus DFA kit, cat. 3125 (Chemicon® International, Inc. Temecula, CA), in accordance with the manufacturer's instructions.

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR was performed to detect RSV RNA sequence and identify RSV Groups in samples that were positive by DFA. Primers were adopted from Canducci et al. [19]. Total RNA was extracted directly from supernatant specimens with the QIAamp® Viral RNA Mini Kit, cat. 52904 (Qiagen) and the amplification and detection were performed with SuperScript™ One-step RT-PCR and the Platinum *Taq*® comercial Kit, cat. 10928-034 (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). The primers used for group determination were generated against the F regions of the RSV genome. Positive control and water as a negative control were run together in each RT-PCR assay to validate the amplification process and to exclude the presence of contaminants.

C-Reactive Protein (CRP)

CRP levels were determined from serum samples of patients and stored up to 4 days at about 4°C, until the completion of qualitative and semi-quantitative survey, by agglutination of latex particles using the Serolatest PCR kit, cat. 56 (Labtest Diagnóstica S.A., Brazil), in accordance with the manufacturer's instructions.

Radiographs

The radiological assessment was performed by three independent physicians blinded to the patient's condition, with reading of the radiographs standardized for all. Radiological typical for CAP included interstitial infiltrate, alveolar infiltrate, and lobar pneumonia.

Statistical Analyses

Patients were divided into two groups according to DFA results and the analysis was performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 17.0, Inc., Chicago, IL), for Windows, using the chi-squared test. Fisher's exact test was used adjunctively if the expected values were less than 5. The student's t test was applied to compare means.

Multivariate analysis was performed using logistic regression models. Variables with a p value <0.1 in univariate analysis were entered in the multivariate analysis. The level of significance was set at <0.05. The both analyses (1 and 2) including pneumonia positive and negative for RSV as the dependent variable. (1) was a comparison of pneumonia by RSV positive and negative group included the following independents variables: age, gender, CRP levels and bacterial culture; (2) was a comparison of pneumonia positive and negative for RSV and the signs and symptoms reported at hospitalization included the following variables: cough, rhinorrhea, fever, nasal obstruction, vomiting and diarrhea.

Results

The inclusion criteria were met by 1,214 patients with CAP during the period of study, of whom 1,050 (86.49%) had consent from parents or legal guardians to participate. The differences in distribution of demographic characteristics and admission diagnoses were not statistically significant for those who declined relative to those who participate in the study (data not shown). RSV DFA results were available for all 1,050 patients included in the study. The prevalence of RSV infection was 23.1% (243/1,050 patients). Demographic and clinical features of RSV- positive and RSV-negative children are shown in Table 1. In terms of age, the average of RSV-positive group (12.1 months) was lower than that of the RSV-negative group (15.5 months) ($p < 0.001$). There was no statistically significant difference between the groups in relation to gender (51.8% male and 48.2% female). Among the patients who had CRP levels analyzed (810/1,050, 77.1%), the RSV-positive group showed a lower mean level when

compared to the RSV-negative group ($p < 0.001$). The chest radiological findings have shown that 54.2% of RSV-positive and 50.3% of RSV-negative patients developed interstitial infiltrate. Bacterial culture were available for 46.7% of study participants (490/1.050). Although the 90.0% of RSV-positive patients yielded negative bacteriological culture, bacterial co-infection was identified in this group with 10.0% of culture growth, while the RSV-negative group showed only 4.5% growth ($p < 0.05$) (Table 1).

Table 1: Epidemiologic, clinical, and laboratory characteristics of RSV-positive and RSV-negative children hospitalized for community-acquired pneumonia in Belém, Para, Brazil.

Characteristics	RSV- positive 243 (23.1%)		RSV-negative 807 (76.9%)		p	Groups (n)		p
	n	%	n	%		A	B	
Age (years) 0 - 1	152/241	62.5	340/805	42.1	<0.001	10/18	135/207	0.282
Gender Male	126/243	51.8	449/807	55.6	0.113	9/18	108/207	0.542
C-Reactive protein ≤48 mg/dL	155/178	87.0	469/632	74.2	<0.001	9/13	133/151	<0.001
Radiographs								
Interstitial infiltrate	117	54.2	366	50.3	0.085	9	102	0.235
Alveolar infiltrate	49	22.7	164	22.5		1	45	
Lobar pneumonia	50	23.1	198	27.2		5	39	
Bacterial culture Positive	11 ^A /109	10.0	17 [*] /381	04.5	0.043	1/8	10/92	0.342

^A *S. epidermidis* (3 patients), *A. baumannii* (2), *S. pneumoniae* (1), *Com. acidovorans* (1), *K. pneumoniae* (1), Gram Positive (1), *Candida spp* (1) and other fungi (1).

^{*} *S. pneumoniae* (4 patients), *S. epidermidis* (3), Tetrads (3), Gram Positive (3), *K. pneumoniae* (2), *S. viridians* (1) and *A. baumannii* (1).

It was possible to determine the RSV Group in 227 (93.4%) out of 243 RSV-positive samples. RSV Group B infections predominated RSV Group A (209 vs 18 patients, respectively). Group B infection was associated with a lower age than Group A (11.0 vs 13.0 months; $p < 0.03$). With regards to the CRP levels, Group B infection showed a CRP mean level lower when compared to Group A (11.0 vs 19.0 mg/dL, $p < 0.05$). Gender, radiological pattern, bacterial culture and the onset of symptoms denoted a similar distribution in both Groups.

We described the signs and symptoms in Table 2 for RSV-positive and RSV-negative groups. Approximately 98% of RSV-positive children had a cough at admission but no statistically significant difference was observed when compared to the RSV-negative group (96.1%; $p>0.05$). Five clinical parameters showed significant difference ($p<0.05$) in rates when comparing both groups: fever, vomiting, and diarrhea were detected predominantly in the RSV-negative group (80.2% vs 72.4%, 12.2% vs 4.9% and 8.1% vs 4.1%, respectively), while rhinorrhea and nasal obstruction were predominantly observed in RSV-positive group (78.2% vs 71.5% and 59.2% vs 32.8%, respectively, both comparisons yielding a $p<0.05$). Patients infected with either A or B Groups did not significantly differ in terms of signs and symptoms.

Table 2: Signs and symptoms reported at hospitalization in RSV-positive and RSV-negative patients with community-acquired pneumonia and detected subtypes.

	RSV-positive 243 (23.1%)		RSV-negative 807 (76.9%)		p	Groups		p
	n	%	n	%		A	B	
Cough	238	97.9	714	96.1	0.056	100%	98.5%	0.779
Rhinorrhea	190	78.2	531	71.5	0.002	83.3%	77.8%	0.443
Fever	176	72.4	596	80.2	0.009	83.3%	71.8%	0.323
Nasal obstruction	144	59.2	244	32.8	0.001	66.6%	58.7%	0.359
Vomiting	12	04.9	91	12.2	0.001	0	4.8%	0.428
Diarrhea	10	04.1	60	08.1	0.023	0	14.8%	0.428

Figure 1 shows that RSV infection was detected from January to July 2007, with higher prevalence rates observed from April (48.6%) to June 2007 (52.4%).

The Multivariate Analysis of Risk Factors for RSV CAP showed in analyze (1) the age under 1 year (OR 1.36; 95% CI; 1.06 – 1.74; $p<0.015$), CRP levels under 48mg/dL (OR 3.49; 95% CI; 1.80 – 6.77; $p<0.001$) and bacterial co-infection (OR 2.57; 95% CI; 1.08 - 6.09; $p<0.032$) were independently associated with the presence of RSV as opposed to RSV-negative

group. In analyze (2) only nasal obstruction were independently associated with presence of RSV (OR 3.07; 95% CI; 2.24 – 4.21; $p < 0.001$) (Table 3).

Figure 1: Monthly prevalence of Respiratory Syncytial Virus (RSV) in children up to three years old, hospitalized with community-acquired pneumonia (CAP), from November 2006 to October 2007.

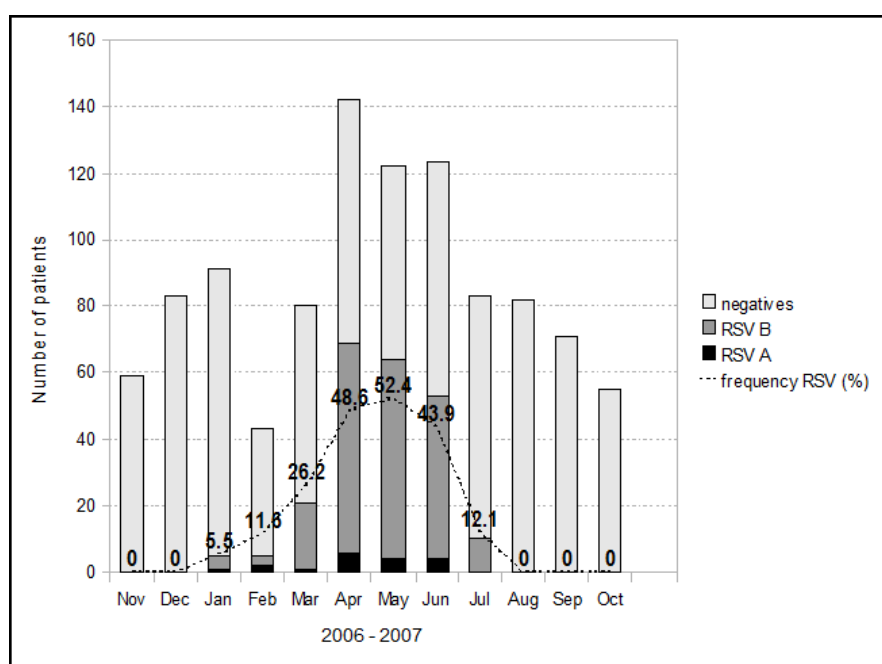


Table 3: The Multivariate Analysis of Risk Factors for RSV infection in patients hospitalized with community-acquired pneumonia.

Analyzes	<i>p</i>	OR	95% CI		
			Lower	Upper	
Signs and symptoms					
(1)	Fever	0.109	0.754	0.535	1.065
	Rhinorrhea	0.798	0.952	0.654	1.386
	Nasal obstruction	<0.001	3.075	2.244	4.215
	Cough	0.107	2.428	0.825	7.146
	Diarrhea	0.646	0.836	0.390	1.794
	Vomiting	0.078	0.551	0.283	1.069
Characteristics					
(2)	CRP <48mg/dL	<0.001	3.498	1.807	6.772
	Bacterial co-infection	0.032	2.570	1.081	6.094
	Age <1 year	0.015	1.361	1.062	1.745
	Male gender	0.476	1.186	0.742	1.895

(1) (2) pneumonia positive and negative for RSV as the dependent variable.

Discussion

The detection of RSV in 23.1% of the samples in our study denoted a prevalence rate similar to those observed in other studies on the occurrence of lower respiratory tract infection, ranging from 23% to 61% [6, 20, 21]. The possible limitation of the study was the use of a less sensitive method (IF) as compared to RT-PCR that has shown improved sensitivity in the detection of RSV infection [14, 22]. However, the large number of samples analyzed in this study minimizes the bias and did not alter the statistical significance of our results.

RSV has been referred to in the literature as the main agent responsible for bronchiolitis and pneumonia during the first year of life. According to our study, 62.5% of children were younger than one year old, suggesting that illnesses caused by RSV can be severe in this age group, thus requiring hospitalization with prompt and effective medical intervention [5, 23].

Gender was not identified as a significant risk factor for RSV infection in our study in agreement with other published studies [21, 25]. Nevertheless, some findings in the literature have shown a male predominance, as reported by D'Elia et al. [5], particularly between 0 and 2 months.

Evaluation of CRP is very useful for clinicians because it may help differentiate between bacterial and viral etiologies. Shin et al. [24] used levels of CRP (≥ 1.87 mg/dL) as criteria to rule out serious bacterial infection in infants from self-limiting viral illness in febrile infants younger than three months. Diniz et al. [25] also found a statistically significant difference between nosocomial viral lower respiratory tract infection and levels of CRP less than or equal to 40 mg/L. In our study, the RSV-positive group showed a lower CRP mean level when compared to the RSV-negative group. Thus, low CRP levels may suggest a viral infection and, depending upon the clinical and radiological findings, enables the suspension of antibiotic therapy and helps considerably in the reduction of the hospital stay.

The radiological findings in our study have shown that the 54.2% of RSV-positive patients developed interstitial infiltrate. Diniz et al. [25] found a significant correlation between nosocomial viral lower respiratory tract infection and interstitial infiltrate and it was observed that all patients with confirmed bacterial, fungal, or mixed infection presented alveolar infiltrate.

We found a predominance of RSV infection without bacterial co-infection in our study, in agreement with Duttweiler et al. [26] who found that concomitant bacterial sepsis was a rare event in 127 hospitalized RSV infected infants. However, when we compared the groups, positive culture was predominantly observed in the RSV-positive group than the RSV-negative group (10.0% vs 4.5%, $p < 0.028$). Thorburn et al. [15] reported on pulmonary bacterial co-infection in children with severe RSV bronchiolitis showing that 40% of children with severe RSV infection were infected with bacteria in their lower airways. Unfortunately, we were unable to demonstrate if these infections would be either secondary or concurrent to viral infection.

It was possible to determine the RSV Group in 227 (93.4%) samples, and 6.6% were untypable probably due to problems in processing samples or RNA extraction. This study reports predominance of RSV Group B infection in children hospitalized with CAP, which is not unusual in other regions [9, 27]. Unfortunately, our data have a limitation of only one year of study and annual RSV Group epidemic may change. Suwanjutha et al. [27] identified in the first year of study the predominance of Group B, in contrast to the second year when Group A was more predominate.

Due to the high number of RSV Group B infection, comparison with Group A (only 18 children) epidemiological data is not conclusive. However, in our findings, Group B was found among children with a mean age lower than that for Group A (11.0 vs 13.0; $p < 0.03$), a finding similar to that of Papadopoulos et al. [28] who reported a predominance of RSV B infection in the youngest children, but the reasons are still unknown. Mlinaric-Galinovic et al. [9] and Oliveira et al. [8] did not find age differences between Groups, even though Mlinaric-

Galinovic et al. [9] found that Group B infections occurred more frequently in males less than 12 months of age than in females. Oliveira et al. [8] on the other hand, found that the 57.8% of RSV A-infected children were male. Unfortunately, there is no plausible explanation for this variation.

We were able to determine that the CRP mean level in Group B was lower than Group A (13.0 vs 19.0; $p < 0.05$) but the reasons for this remain unknown. Further research with an adequate number of samples needs to be conducted in an attempt to better understand RSV Groups in cases of CAP and their association with the epidemiological data of patients.

We have evaluated the signs and symptoms and approximately 98% of RSV-positive cases had cough at admission, but no statistically significant difference was observed when compared with RSV-negative group (96.1%) ($p > 0.05$). Rhinorrhea and nasal obstruction were predominantly observed in the RSV-positive group ($p < 0.05$). Regarding the clinical signs and symptoms observed by Diniz et al. [25] in São Paulo city, in the preterm infants infected with RSV, wheezing, rhinorrhea, vomiting, and diarrhea were significantly more frequent while in our study vomiting and diarrhea were detected predominantly in RSV-negative group. In addition, the clinical symptoms do not predict the viral etiology because there are difficulties in establishing the general etiologic diagnoses of pneumonia by clinical profiles, which are quite varied in literature and depend on the infectious agent as well as the age and immune state of the host.

With regards to the seasonality, our study showed that RSV activity in hospitalized children during January to July 2007, with a peak during April to June, coincided with a heavy rainfall period in the region. Outbreaks occurring mainly during the months with low temperatures were reported in Uberlandia (Midwestern Brazil) by Costa et al. [29]. This seasonal pattern was also observed in other Brazilian settings where RSV occurrence is not uniform. This has been noted in several Brazilian geographic regions and even among different

states in the same region [10]. In Campinas (São Paulo) [21] and in Vitória (Espírito Santo) [30], South-eastern region, the annual highest incidence of RSV-infections occurred between January and June, the same period of months observed in our study.

A greater understanding of the factors that determine RSV activity would make this timing even more precise. However, such studies are important as they are expected to delineate the clinical and epidemiological behavior of RSV in this age range and in this region. Monitoring RSV activity is necessary in order to restrict antibiotic use to the infants in real need of it and to provide better prophylactic therapies.

Conclusion

In conclusion, to our knowledge this is the first report of RSV infection in hospitalized children with CAP in our region. We highlighted that the RSV infection prevalence associated with CAP in Northern Brazil is similar to those found in other regions and other countries. However, according to current findings and those reported in the literature, it may be concluded that the lower mean of age as well as the lower levels of CRP are characteristics found in viral infections of these cases in Belém city. The signs and symptoms associated with RSV in our study were rhinorrhea and nasal obstruction, even though divergent in the literature, and the predominant RSV Group identified was B. Furthermore, the data provided by the study indicate that there is a need for continuous efforts in order to broaden our knowledge on the epidemiological aspects of RSV infection and CAP.

Abbreviations:

RSV: Respiratory syncytial virus; CAP: community-acquired pneumonia, RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; IEC: Evandro Chagas Institute; DFA: Direct Immunofluorescence Assay; CRP: C-Reactive Protein; CI: Confidence interval.

Competing Interest:

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions:

LML, FLR, WAM and ACL designed the study. LML, AFS, FLR, MCAJ, AJPGQ and VBS collected the data. LML, MSC and LSB performed the technique. LML, WAM, ACL made the interpretation of statistical analyses. LML, WAM, RRB and ACL wrote the paper with input from all the authors who each approved the final version.

Acknowledgements:

This study has been supported by Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N et al.: **Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet* 2010, 375: 1545-1555.
2. Buckley BC, Roylance D, Mitchell MP, Patel SM, Cannon HE, Dunn JD: **Description of the outcomes of prior authorization of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infection in a managed care organization.** *J Manag Care Pharm* 2010, 16:15-22.
3. Figueiredo LTM: **Viral pneumonia: epidemiological, clinical, pathophysiological and therapeutic aspects.** *J Bras Pneumol* 2009, 35:899-906.
4. Mathisen M, Strand TA, Sharma BN, Chandyo RK, Valentiner-Branth P, Basnet S, Adhikari RK, Hvidsten D, Shrestha PS, Sommerfelt H: **Clinical presentation and severity of viral community-acquired pneumonia in young Nepalese children.** *Pediatr Infect Dis J* 2010, 29:e1-6.

5. D'Elia C, Siqueira MM, Portes SA, Sant'Anna CC: **Respiratory syncytial vírus – associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2005, 38:7-10.
6. Pecchini R, Berezin EN, Felicio MC, Passos SD, de Souza MC, de Lima LR, Ueda M, Matsumoto TK, Durigon EL: **Incidence and Clinical Characteristics of the Infection by the respiratory Syncytial Virus in Children Admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital.** *Braz J Infect Dis* 2008, 12:476-479.
7. Mohapatra SS, Boyapalle S: **Epidemiologic, Experimental, and Clinical Links between Respiratory Syncytial Virus Infection and Asthma.** *Clin Microbiol Rev* 2008, 21:495-504.
8. Oliveira TFM, Freitas GRO, Ribeiro LZG, Yokosawa J, Siqueira MM, Portes SAR, Silveira HL, Calegari T, Costa LF, Mantese OC, et al.: **Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, 103:417-422.
9. Mlinaric-Galinovic G, Vojnovic G, Cepin-Bogovic J, Bace A, Bozikov J, Welliver RC, Wahn U, Cebalo L: **Does the viral subtype influence the biennial cycle of respiratory syncytial virus?.** *Virol J* 2009, 6:133.
10. Moura FEA, Nunes IFS, Silva GB, Siqueira MM: **Respiratory Syncytial Virus infection in Northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, 74:165-167.
11. Goddard NL, Cooke MC, Gupta RK, Nguyen-Van-Tam JS: **Timing of monoclonal antibody for seasonal RSV prophylaxis in the United Kingdom.** *Epidemiol Infect* 2007, 135:159-162.
12. Robertson SE, Roca A, Alonso P, Simoes EA, Kartasasmita CB, Olaleye DO, Odaibo GN, Collinson M, Venter M, Zhu Y, Wright PF. **Respiratory syncytial virus infection: denominator-based studies in Indonesia, Mozambique, Nigeria and South Africa.** *Bull World Health Organ* 2004, 82: 914-22.
13. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, Szilagyi P: **The burden of respiratory syncytial virus infection in young children.** *N Engl J Med* 2009, 360:588-598.
14. Marcos MA, Esperatti M, Torres A: **Viral pneumonia.** *Curr Opin Infect Dis* 2009, 22:143-147.
15. Thorburn K, Harigopal S, Reddy V, Taylor N, van Saene HK: **High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis.** *Thorax* 2006, 61:611-615.

16. Zhang HY, Li ZM, Zhang GL, Diao TT, Cao CX, Sun HQ: **Respiratory Viruses in Hospitalized Children with Acute Lower Respiratory Tract Infection in Harbin, China.** *Jpn J Infect Dis* 2009, 62:458-460.
17. Kneyber MC, Blusse van Oud-Alblas H, van Vliet M, Uiterwaal CS, Kimpen JL, van Vught AJ: **Concurrent bacterial infection and prolonged mechanical ventilation in infants with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection.** *Intensive Care Med* 2005, 31:680-685.
18. Randolph AG, Reder L, Englund JA: **Risk of bacterial infection in previously healthy respiratory syncytial virus-infected young children admitted to the intensive care unit.** *Pediatr Infect Dis J* 2004, 23:990-994.
19. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berrè S, Terulla C, Gargantini G, Cambieri P, Romero E, Clementi M: **Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease.** *J Med Virol* 2008, 80:716-723.
20. Calegari T, Queiroz DA, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TF, Luiz LN, Oliveira RC, Diniz FC, Rossi LM, et al.: **Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil.** *Braz J Infect Dis* 2005, 9:156-161.
21. Riccetto AGL, Ribeiro JD, da 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, 10:357-361.
22. Reis AD, Fink MCD, Machado CM, Paz JP, Oliveira RR, Tateno AF, Machado AF, Cardoso MR, Pannut CS. **Comparison of direct immunofluorescence, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus.** *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 2008, 50:37-40.
23. Lee JT, Chang LY, Wang LC, Kao CL, Shao PL, Lu CY, Lee PI, Chen JM, Lee CY, Huang LM: **Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in northern Taiwan, 2001-2005 -- seasonality, clinical characteristics, and disease burden.** *J Microbiol Immunol Infect* 2007, 40:293-301.
24. Shin SH, Choi CW, Lee J-A, Kim E-K, Choi EH, Kim H-S, Kim, B, Choi J-H: **Risk factors for serious bacterial infection in febrile young infants in a community referral hospital.** *J Korean Med Sci* 2009, 24:844-848.
25. Diniz EMA, Vieira RA, Ceccon MEJ, Ishida MA, Vaz FAC: **Incidence of respiratory viruses in preterm infants submitted to mechanical ventilation.** *Rev Inst Med Trop* 2005, 47:37-44.

-
26. Duttweiler L, Nadal D, Frey B: **Pulmonary and systemic bacterial co-infections in severe RSV bronchiolitis.** *Arch Dis Child* 2004, 89:1155–1157.
 27. Suwanjutha S, Sunakorn P, Chantarojanasiri T, Siritantikorn S, Nawanoparatkul S, Rattanadilok Na Bhuket T, Teeyapaiboonsilpa P, Preutthipan A, Sareebutr W, Puthavathana P. **Respiratory syncytial virus-associated lower respiratory tract infection in under-5-year-old children in a rural community of central Thailand, a population-based study.** *J Med Assoc Thai* 2002, 85 suppl 4:S1111-9.
 28. Papadopoulos NG, Gourgiotis D, Javadyan A, Bossios A, Kallergi K, Psarras S, Tsolia MN, Kafetzis D. **Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants?** *Respir Med* 2004, 98:879-882.
 29. Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TFM, Silveira HL, Nepomuceno LL, Moreira LS, Dyonisio G, Rossi LMG, Oliveira RC, et al.: **Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, 101:301-306.
 30. 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, 67:490-491.