

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA
PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA
MESTRADO

SANDRA EUGENIA COUTINHO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE COINFECÇÃO VIRAL E
O TEMPO DE INTERNAÇÃO EM LACTENTES
COM CRISE DE SIBILÂNCIA**

Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto

Orientador

Porto Alegre
2013

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL – PUCRS

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE COINFEÇÃO VIRAL E O TEMPO DE INTERNAÇÃO
EM LACTENTES COM CRISE DE SIBILÂNCIA**

SANDRA EUGENIA COUTINHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina /Pediatría e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto

Porto Alegre, 2013.

FICHA CATALOGRÁFICA

C871a Coutinho, Sandra Eugenia

Associação entre coinfeção viral e o tempo de internação em lactentes com crise de sibilância / Sandra Eugenia Coutinho. – Porto Alegre, 2013.

47f.: tab. Inclui artigo científico para submissão à publicação

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde da Criança. Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança.

Orientador: Prof. Leonardo Araújo Pinto

Co-orientadora: Prof^a Rita Mattiello

1. Coinfeção. 2. Vírus. 3. Infecções Respiratórias. 4. Bronquiolite. 5. Criança Hospitalizada. 6. Estudos Transversais. I. Myskiw, Jociane de Carvalho. II. Título.

CDD 618.9223

Bibliotecária Responsável:
Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa de incentivo a pesquisa.

RESUMO

Introdução: as principais causas de internações de lactentes são as crises de sibilância causadas por vírus sazonais. O impacto da infecção por dois ou mais vírus não está bem esclarecida na literatura, especialmente a relação entre a coinfeção e a gravidade clínica da doença.

Métodos: no presente estudo, foram avaliadas a ocorrência de infecções e coinfeções por vírus respiratórios em lactentes com sibilância, bem como a associação entre coinfeção e desfechos relacionados à gravidade da doença. Este foi um estudo transversal, com lactentes de até 12 meses de idade, com crise de sibilância, que estavam internados em uma unidade pediátrica. O estudo foi realizado no período entre setembro de 2009 e setembro de 2011. Para identificação dos vírus respiratórios foi coletada secreção de nasofaringe e após o período de coleta as amostras foram analisadas através da técnica do imunofluorescência e PCR em tempo real para vírus respiratórios.

Resultados: No presente estudo foram selecionados 127 pacientes, sendo que 122 completaram todos os critérios de inclusão. A média de idade foi de 2,9 meses, sendo 54,9% (67/122) dos pacientes do sexo masculino. Com relação às variáveis clínicas, observamos que 99,2% (121/122) necessitaram oxigenioterapia, com tempo de duração médio de 5,3 dias de tratamento com O₂. O tempo médio de internação foi de 5,9 dias e o tempo de sibilância durante a internação hospitalar foi de 4,0 dias. A identificação dos vírus por imunofluorescência demonstrou 42 (34%) amostras negativas e positividade de 101 (71,7%). O VSR foi o vírus mais frequente com 65 (51,2%) da amostra positivas, seguido por influenza 15 (11,8%), parainfluenza 10 (7,9%) e adenovírus 3 (2,4%). Os pacientes infectados com um maior número de vírus tiveram um maior tempo de internação e de uso de oxigenioterapia.

Conclusão: Neste estudo, a coinfeção com vírus respiratórios nos lactentes com sibilância foi um fator de risco relacionado com a gravidade do quadro clínico dos pacientes. Em adição, as taxas de coinfeção em lactentes internados na emergência deste hospital sugerem que a aglomeração de pessoas no mesmo ambiente, bem como a pequena distância entre os leitos na emergência podem ser fatores importantes para as elevadas taxas de coinfeção por vírus respiratórios.

Palavras chaves: bronquiolite, coinfeção, hospitalização, vírus sincicial respiratório.

ABSTRACT

Introduction: the main causes of hospitalization in infants are wheezing episodes caused by seasonal viruses. The impact of infection by two or more viruses is not well established in the literature, especially the relationship between coinfection and clinical severity of the disease.

Methods: In the present study, we evaluated the occurrence of infections and coinfections by respiratory viruses in infants with wheezing, as well as the association between coinfection and outcomes related to disease severity. This was a cross-sectional study with infants up to 12 months of age with acute wheezing, who were admitted to a pediatric unit. The study was conducted between September 2009 and September 2011. For identification of respiratory viruses, nasopharyngeal secretions were collected and, the samples were analyzed using the immunofluorescence and PCR for respiratory viruses.

Results: 35.3% (42/119) of patients were negative for virus; 48.7% (58/119) were positive for one virus and 11.8% (14/119) for two viruses. The association of coinfection and severity measured by different periods of hospitalization, use of oxygen therapy and wheezing showed significant results. The higher were the number of virus identified; the higher the markers of severity.

Conclusion: In this study, the coinfection with respiratory viruses in infants with wheezing influenced the severity of the clinical condition. In addition, rates of coinfection in infants admitted to the emergency hospital suggests that crowding of people in the same environment as well as the short distance between beds in emergency can be factors contributing to coinfection with respiratory viruses.

Keywords: bronchiolitis, coinfection, hospitalization, respiratory syncytial.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. coinfeção associada à gravidade de acordo com estudos prévios. 26

CAPÍTULO III

Tabela 1. Características dos pacientes de acordo com o questionário aplicado na admissão hospitalar. 38

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes no período da internação hospitalar..... 39

Tabela 3. Historia médica pregressa dos pacientes de acordo com o questionário aplicado na admissão..... 40

Tabela 4. Identificação dos vírus respiratórios através da imunofluorescência e PCR em tempo real..... 41

Tabela 5. Gravidade associada ao número de vírus respiratórios. 42

SUPLEMENTO ONLINE 43

Tabela S1. *Primers* e condições da reação de PCR em tempo real. 43

LISTA DE ABREVIATURAS

ADV	Adenovírus
BVA	Bronquiolite viral aguda
CP	<i>Clamídia pneumoniae</i>
IFD	Imunofluorescência direta
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
MP	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
MPVH	Metapneumovírus humano
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIV	Parainfluenza vírus
RVH	Rinovírus humano
UCEP	Unidade de Cuidados Especiais Pediátrica
UTIP	Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica
VSR	Vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

CAPITULO I	10
1.1 APRESENTAÇÃO.....	11
1.2 JUSTIFICATIVA.....	12
1.3 OBJETIVOS.....	13
1.3.1 Objetivo geral.....	13
1.3.2 Objetivo específico.....	13
1.4 REFERENCIAS.....	14
CAPITULO II	15
2.1 ARTIGO DE REVISÃO	16
CAPITULO III	27
3.1 ARTIGO ORIGINAL	28
CAPITULO IV	46
4.1 CONCLUSÕES	47

CAPITULO I

1.1 APRESENTAÇÃO

A bronquiolite viral aguda (BVA) e os episódios de sibilância são as maiores causas de morbidade e mortalidade que acomete crianças na primeira infância. Estudos sobre coinfeção viral na (BVA), em crianças hospitalizadas mostram que, os vírus mais frequentes são o vírus sincicial respiratório (VSR) e o rinovírus humano (RVH), sendo que 1 em cada 3 apresentam múltiplas infecções por vírus (1). BVA presença de mais de um patógeno parece influenciar na historia natural das crises de sibilância (2). No entanto a significância do quadro clínico associado à coinfeção viral em lactentes com infecção respiratória ainda não está clara (3).

As múltiplas infecções ocorrem com maior frequência e de forma mais grave em crianças com doenças crônicas (2). Todavia, um estudo importante demonstrou que a prematuridade está associada a um risco aumentado de coinfeção (4). Existem muitos outros fatores associados à gravidade da bronquiolite. Um estudo recente sugere que O risco de infecção por RVH associado à internação é maior nas crianças com displasia broncopulmonar e também nas crianças que não foram amamentadas (5).

Dessa forma, a identificação dos diferentes agentes causadores da infecção, e das taxas de coinfeção, pode contribuir para medidas preventivas e terapêuticas mais específicas.

1.2 JUSTIFICATIVA

O impacto da infecção por dois ou mais vírus não está bem documentado na literatura, principalmente tratando-se da relação entre a coinfeção e a gravidade da doença em crianças. Considerando que as infecções respiratórias de vias aéreas inferiores no lactente apresentam elevada morbidade, torna-se importante estudar a identificação e associação dos diferentes agentes virais com a gravidade da doença, para um melhor entendimento e tratamento.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Verificar a associação entre a coinfeção viral e a gravidade da doença em lactentes hospitalizados com crise de sibilância.

1.3.2 Objetivo específico

Identificar os principais agentes virais nas amostras coletadas mediante técnicas de imunofluorescência e PCR.

1.4 REFERENCIAS

1. Mansbach JM, Piedra PA, Stevenson MD, Sullivan AF, Forgey TF, Clark S, et al. Prospective multicenter study of children with bronchiolitis requiring mechanical ventilation. *Pediatrics*. 2012 Sep;130(3):e492-500.
 2. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Mar;27(3):213-7.
 3. Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol*. 2010 Aug;48(4):239-45.
 4. De Paulis M, Gilio AE, Ferraro AA, Ferronato AE, do Sacramento PR, Botosso VF, et al. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 Jul-Aug;87(4):307-13.
 5. Miller EK, Williams JV, Gebretsadik T, Carroll KN, Dupont WD, Mohamed YA, et al. Host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Apr;127(4):883-91.
-

CAPITULO II

2.1 ARTIGO DE REVISÃO

Os múltiplos agentes associados com bronquiolite viral aguda, gravidade da doença.

Autores

Sandra Eugenia Coutinho (1), Leonardo Araújo Pinto (2)

1 Enfermeira, mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

2 Professor da Faculdade de Medicina da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

Fonte financiadora: não se aplica neste artigo de revisão.

Currículo dos autores está disponível na Plataforma Lattes do CNPq.

E-mail: leonardo.pinto@pucrs.br.

Autor para correspondência: Leonardo A. Pinto, Avenida Ipiranga, 6690, 2º andar, Instituto de Pesquisas Biomédicas. Cep 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

Objetivo: Apresentar uma revisão da literatura sobre a coinfeção e a gravidade da bronquiolite viral aguda.

Métodos: Os artigos incluídos na presente pesquisa foram publicados nas bases de dados MEDLINE/Pubmed (NIH), e a busca utilizou os seguintes termos em inglês: “bronchiolitis”; “coinfection”. Todas as buscas foram realizadas em janeiro e dezembro 2012. Além disto, foram utilizados os seguintes filtros: estudos clínicos em humanos, ou meta-análises, ou *guidelines*, publicados em inglês e português.

Resultados: Foram incluídos 21 artigos sobre coinfeção na BVA. Muitos trabalhos relataram uma associação positiva entre a coinfeção viral e a gravidade, no entanto vários estudos não observaram essa relação. A associação entre vírus sincicial respiratório (VSR) e rinovírus humano (RVH) tem se mostrado bastante prevalente na literatura com taxas de 14% a 69% das coinfeções. Entretanto, a relação dessa associação com a gravidade da bronquiolite viral aguda (BVA) mostra dados bastante conflitantes. Alguns estudos demonstram maior gravidade devido à associação viral, enquanto outros pesquisadores não observaram nenhum efeito adicional da coinfeção.

Conclusões: Nesse estudo foi possível perceber que há muitos agentes causadores da BVA. A coinfeção por diferentes agentes foi identificada também em muitos estudos, bem como a relação da apresentação clínica associada com os agentes estudados. Todavia a evidência atual não suporta a hipótese que existe uma associação entre a coinfeção viral e a gravidade da doença.

Introdução

Os agentes etiológicos mais importantes das infecções em bronquiolite aguda são o vírus sincicial respiratório (VSR), adenovírus (ADV), vírus influenza tipo A e B, vírus parainfluenza (PIV) tipos 1, 2 e 3, rinovírus humano (RVH); metapneumovírus (MPVH), além da clamídia pneumoniae (CP) e micoplasma pneumoniae (MP) (1).

As múltiplas infecções ocorrem com maior frequência e com maior gravidade em crianças com doenças crônicas (2). Todavia, existem muitos outros fatores associados à gravidade da bronquiolite. O risco de infecção por RVH associado internação foi maior nas crianças com displasia broncopulmonar e também nas crianças que não foram amamentadas (3).

Um estudo importante demonstrou que a prematuridade está associada a um risco aumentado de coinfeção (4). Dessa forma, é difícil estabelecer esta associação devido aos possíveis fatores de confusão associados.

Estudo prévio com lactentes abaixo de 24 meses de idade demonstrou pelo menos um vírus em 65% dos casos de bronquiolite, e o VSR foi detectado em 76% de todos os casos positivos. Dois ou mais agentes foram identificados em 17% pacientes de todas as amostras positivas (5). Estudos recentes apresentam dados inconsistentes em relação à associação entre coinfeção e gravidade da BVA. Esse estudo tem como objetivo revisar a literatura sobre a relação entre a coinfeção e gravidade da doença.

Metodologia

O presente estudo caracterizou-se por uma busca sistemática envolvendo estudos que descreveram os agentes de infecção de bronquiolite aguda em crianças avaliando a associação entre a coinfeção e a gravidade da doença. Os artigos incluídos na presente pesquisa foram publicados na base de dados MEDLINE/Pubmed (NIH), e a busca utilizou os seguintes termos em inglês:

“bronchiolitis”; “coinfection”. Todas as buscas foram realizadas em janeiro e dezembro 2012. Além disto, foram utilizados os seguintes filtros: estudos clínicos em humanos, ou meta-análises, ou *guidelines*, publicados em inglês e português.

Critérios de inclusão: estudos realizados com crianças “do nascimento até 2 anos”, que identificaram os agentes virais na BVA, artigos que relacionavam co-infecção, com a gravidade da doença.

Critérios de exclusão: estudos que avaliavam especificamente o tratamento da bronquiolite aguda, sem descrição do agente.

Os artigos foram avaliados de maneira independente pelos autores. Primeiramente foram selecionados 150 artigos, nas quais os autores avaliaram através do resumo, extraíndo estudos que não preencheram os critérios de inclusão e exclusão.

Resultados e discussão

Estudo prévio com lactentes demonstrou pelo menos um vírus em 65% dos casos. Dois ou mais agentes foram identificados em 17% pacientes de todas as amostras positivas (5).

A associação mais frequentemente descrita é VSR e RVH sendo a idade média destes pacientes de 4 meses (intervalo interquartil: 2-8 meses). A mediana do tempo de internação foi de 2 dias (intervalo interquartil: 1-4 dias). Além disso, 1.075 crianças (58%) tinham apenas VSR, 167 (9%) tiveram apenas RVH, 287 (15%) tinham VSR mais RVH (6). A análise investigando a associação com gravidade evidencia uma relação entre coinfecção e o risco de hospitalização (3). Entretanto, as múltiplas infecções parecem ocorrer com maior frequência em crianças com doenças crônicas, o que poderia ser considerado como um possível fator de confusão (2).

Em um estudo brasileiro, crianças infectadas por dois patógenos representaram 31% dos casos, e as coinfeções por três patógenos 8%. Ainda nesse mesmo estudo houve freqüentes combinações entre o VSR/bocavírus (16%) e VSR/ADV (11%) (7).

Em comparação com crianças com VSR, aqueles com apenas RVH mais qualquer patógeno não/VSR eram menos propensos a ter tempo de internação prolongado, enquanto que as crianças com VSR mais infecções por RVH foram mais propensas a ter uma internação de 3 ou mais dias, sendo esta diferença estatisticamente significativa (6)

Em relação ao MPVH associado a outros vírus na bronquiolite, um estudo demonstrou que 33% dos pacientes tinham uma infecção mista e houve uma associação entre MPVH e RV representando 7% (8). Em relação à gravidade, crianças menores de 3 meses de idade foram mais propensas a ter hipóxia grave independente do vírus que foram infectados. Tratando a gravidade associada aos agentes de infecção, um estudo mostra que não houve um impacto significativo no tempo de internação da criança, bem como a oxigenioterapia e o uso de broncodilatador (9).

Em relação a infecção por diferentes agentes, em um estudo de coorte prospectivo, os autores procederam a uma análise de sensibilidade limitada ao grupo de rinovírus sem coinfeção e avaliou os fatores da gravidade da bronquiolite somente a este grupo. O estudo permitiu a percepção de que as características clínicas do lactente com rinovírus e coinfeção por VSR foram semelhantes aos lactentes infectados somente pelo VSR (3).

Em um trabalho com 316 crianças, foram detectados agentes em 164 (52%). Um agente único foi identificado em 50 (16%); e dois ou mais agentes foram identificados em 114 (36%). Ressaltamos que nesse mesmo estudo as crianças que apresentaram sinais de infecção bacteriana foram excluídas (1).

Associação entre rinovírus humano e vírus sincicial respiratório

O VSR é a causa mais associada a BVA. Porém, o rinovírus humano (RVH) é uma causa bem estabelecida de infecções de via aérea superior em todas as idades. Está associado ao resfriado comum, além de ter um papel na exacerbação da asma e na bronquite crônica e aguda (10). Com a possibilidade de melhor identificação viral devido à reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), o RVH vem sendo, cada vez mais, comprovado como um importante agente de infecções de via aérea inferior em crianças (10, 11) e tem sido demonstrado nas vias aéreas de lactentes com sibilância em uma prevalência entre 9-30%.

A associação entre vírus sincicial respiratório (VSR) e RVH tem se mostrado bastante prevalente na literatura (12, 13). Entretanto, a relação dessa associação com a gravidade da bronquiolite viral aguda (BVA) também mostra dados bastante conflitantes. Há estudos que demonstram maior gravidade devido à associação viral, (14), estudos que não notaram nenhum efeito adicional (13), e os que indicam, controversamente, menor gravidade nesse grupo (15). Assim, o RVH tem sido associado tanto a um maior risco de doença severa (16) e também como causador de quadros mais leves em relação a outro vírus (17).

Marguet et al demonstraram que lactentes entre 1 mês e 1 ano de idade com bronquiolite apresentavam menor chance de ter doença severa e hospitalização maior que 5 dias na doença por RVH comparada ao VSR e a VSR/RV (17). O VSR foi associado a maior tempo de quando comparada com VSR/RV, essa combinação viral teve uma tendência a ser clinicamente mais moderada.

A associação do RVH com outros vírus tem se mostrado bastante prevalente, chegando a 47% em um estudo onde esse foi o agente mais prevalente em infecções de via aérea inferior. Entretanto os coinfectados tiveram apresentação clínica semelhante aos infectados por apenas RVH. Richard et al mostraram um risco quase 3 vezes maior para admissão em unidades de tratamento intensivo pediátrica (UTIP) dos coinfectados em relação aos não infectados. Porém, a população do estudo inclui muitos prematuros e crianças com doenças crônicas de base.

Outro trabalho sugeriu que a presença de rinovírus ou enterovírus preexistente em infecções respiratórias assintomáticas pode aumentar o risco para bronquiolite por VSR em lactentes, mas mais estudos clínicos que incluam pacientes assintomáticos e sintomáticos precisariam ser realizados (13).

Cheuk et al encontrou maior tempo de duração da febre em crianças (entre 1 mês e 18 anos) infectadas por RVH e outro vírus, além de mais casos de convulsão febril, mas a severidade geral do quadro e o tempo de hospitalização não apresentaram diferença significativa no grupo com coinfeção. O RVH foi o vírus mais detectado (35%) seguido do VSR (29%). Aqueles com doença cardiopulmonar crônica foram mais suscetíveis a desenvolver bronquiolite associado ao RVH (18).

Controversamente, um recente estudo com significativa presença de coinfeção RSV/RV demonstrou infecções por dois ou mais vírus relacionadas, com maior prevalência, a quadros leves (sem hipóxia ou dificuldade de alimentação) e moderados do que a doença severa (15). Crianças com monoinfeção por VSR eram mais novas e sofreram de quadro mais severo do que crianças com infecção múltipla associada ao VSR. Nas crianças com menos de 3 meses a gravidade da doença não estava associada ao número de agentes detectados, enquanto que, peculiarmente, nas maiores de 3 meses houve menos infecções múltiplas no grupo mais severo do que no leve. Os autores sugerem inclusive um potencial efeito protetor do RV quando associado ao VSR (19).

Aberle et al demonstraram que crianças com VSR e RVH apresentaram hipóxia e maior tempo hospitalizadas (60% e média de 7,4 dias, respectivamente) quando comparados ao grupo do RVH (36% e média de 5,9 dias). Mas nenhuma diferença foi observada quando o grupo da infecção VSR/RV foi comparado à infecção por VSR. A presença de VSR independente da coinfeção demonstrou maior prevalência de severidade e menor resposta com interferon- γ de células mononucleares periféricas (20).

A coinfeção pode representar infecções simultâneas, sequenciais ou portadores assintomáticos de agentes infecciosos. Se um vírus facilita, tem efeito sinérgico ou antagoniza a ação de outros ainda não existe evidências na literatura. Com o aumento da sensibilidade de detecção por RT-PCR mais

diagnósticos etiológicos puderam ser feitos e a importância do RVH na bronquiolite vem sendo mais bem comprovada. Entretanto entre 12-41% das crianças são portadoras assintomáticas do RVH (21), sugerindo que um PCR positivo pode não indicar relação causal. Além disso, mesmo após 5-6 semanas do início dos sintomas da infecção respiratória, o RVH pode ser detectado no muco nasal devido à sensibilidade alta do PCR (20). Isso dificulta atribuir os achados clínicos à coinfeção, pois podem refletir as consequências clínicas do outro agente. Para isso, mais estudos são necessários onde possam ser avaliadas as apresentações clínicas de infecções respiratórias e, especialmente, entre a comum associação de RV e VSR.

Nesse estudo foi possível perceber que há muitos agentes causadores da BVA e foi possível associar os diferentes fatores de risco nos diversos estudos que foram incluídos nessa revisão. A coinfeção por diferentes agentes foi percebida também em muitos estudos, bem como a relação de apresentação clínica e associações com os agentes estudados. A maior parte dos estudos foi realizada em hospitais, alguns com crianças já hospitalizadas e outros em sala de pronto atendimento. Acreditamos que serão relevantes mais estudos com crianças em atendimento pré-hospitalar, a fim de contribuir para prevenção da BVA.

Referências bibliográficas:

1. Peng D, Zhao D, Liu J, Wang X, Yang K, Xicheng H, et al. Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *Viol J*. 2009;6:155.
 2. Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Richard N, Vernet G, Lina B, Floret D. Mixed respiratory virus infections. *J Clin Virol*. 2008 Dec;43(4):407-10.
 3. Miller EK, Williams JV, Gebretsadik T, Carroll KN, Dupont WD, Mohamed YA, et al. Host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Apr;127(4):883-91.
 4. De Paulis M, Gilio AE, Ferraro AA, Ferronato AE, do Sacramento PR, Botosso VF, et al. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 Jul-Aug;87(4):307-13.
 5. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Vazquez MC, Frias ME, Perez-Brena P, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol*. 2008 Jul;42(3):268-72.
 6. Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, Sullivan AF, Forgey T, Clark S, et al. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2012 Aug;166(8):700-6.
 7. Bezerra PG, Duarte Mdo C, Britto MC, Correia JB. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 Sep-Oct;87(5):461; author reply 2.
 8. Duchamp MB, Casalegno JS, Gillet Y, Frobert E, Bernard E, Escuret V, et al. Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect*. 2010 Apr;16(4):317-21.
 9. Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol*. 2010 Aug;48(4):239-45.
 10. Hayden FG. Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Rev Med Virol*. 2004 Jan-Feb;14(1):17-31.
 11. Louie JK, Roy-Burman A, Guardia-Labar L, Boston EJ, Kiang D, Padilla T, et al. Rhinovirus associated with severe lower respiratory tract infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Apr;28(4):337-9.
-

12. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterback R, van den Hoogen B, Osterhaus AD, et al. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis*. 2004 Jun;10(6):1095-101.
 13. Andreoletti L, Lesay M, Deschildre A, Lambert V, Dewilde A, Wattre P. Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J Med Virol*. 2000 Jul;61(3):341-6.
 14. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Mar;27(3):213-7.
 15. Brand HK, de Groot R, Galama JM, Brouwer ML, Teuwen K, Hermans PW, et al. Infection with multiple viruses is not associated with increased disease severity in children with bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol*. 2012 Apr;47(4):393-400.
 16. Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsofia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May 1;165(9):1285-9.
 17. Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le Roux P, Deschildre A, Forget C, et al. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One*. 2009;4(2):e4596.
 18. Cheuk DK, Tang IW, Chan KH, Woo PC, Peiris MJ, Chiu SS. Rhinovirus infection in hospitalized children in Hong Kong: a prospective study. *Pediatr Infect Dis J*. 2007 Nov;26(11):995-1000.
 19. Greer RM, McErlean P, Arden KE, Faux CE, Nitsche A, Lambert SB, et al. Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? *J Clin Virol*. 2009 May;45(1):10-5.
 20. Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HP, Kundi M, Popow-Kraupp T. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Jul;24(7):605-10.
 21. Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Nov;23(11):1003-7.
-

Tabela 1. coinfeção associada à gravidade de acordo com estudos prévios.

População	Co-infecção	Coinfectados RSV/RV	Efeito da coinfeção na gravidade
Lactentes < 1 a, BVA em unidade de permanência curta (n =92) ou UTIP (88)	24,4% (44/180)	29,5% (13/44)	8 dos 13 com RSV+RV necessitaram de UTIP Risco maior de UTIP nos coinfectados. 1
Crianças <18 anos em UTIP com infecção respiratória	23,2% estavam coinfectados por RV + outro agente (10/43)	0% (0/10)	Apresentação clínica semelhante ao infectados apenas com RV. 2
Diagnostico clínico de BVA, <18 meses	13,5%(16/118)	69%(10/16)	O escore de severidade não teve diferença significativa (A infecção por RV aumentou a gravidade em 5 vezes). 3
Lactentes hospitalizado com BVA	21,4% (18/84)	33% (6/18)	Não houve efeito na severidade da doença nem no tempo de hospitalização. 4
Crianças entre 1 mes e 18 anos (2,34) com infecção aguda	33,1% das amostras positivas para RV (50/151)	12% (6/50)	A severidade da doença no geral foi similar para aqueles com ou sem coinfeção. 5
Crianças <2 anos com sintomas clínicos de BVA	41% (58/142)	41% (24/58)	A co-deteção não foi associada a aumento de gravidade. Nas crianças >3 meses mais de um vírus foi associado a sintomas leves. 6
Criança hospitalizada por doença respiratória.	20% (153/772)	36% (55/153)	Diminuição da resposta de INF-γ e maior severidade associadas ao VSR, mas não à coinfeção. 7
Crianças < 2 anos com doença respiratória febril	25,8% (52/201)	RV ou enterovirus + VSR: 42,3% (22/52)	Não houve diferença entre os grupos em relação ao tempo de hospitalização, chance para admissão em UTIP ou necessidade de oxigênio suplementar. 8
Crianças <2anos com infecção respiratória aguda	11,4% (86/749)	8,1% (7/86)	Febre, uso de antibiótico e tempo de hospitalização foi maior no grupo coinfectados comparado às infecções só por VSR. 9
Crianças <1ano hospitalizadas por BVA.	23,4% (49/209)	61,2% (30/49)	VSR/RV mostrou ser mais moderada que a por VSR. O VSR mostrou mais grave e o RV mais leve. 10
<2 anos com inicio de sintomas de B	44% (34/77)	46,9% dos VSR foi associado a coinfeção e 80,7%RV dos RV.	Não/associação entre coinfeção com admissão hospitalar ou em UTIP. 11

Legenda dos autores referenciados na tabela: 1=Richard et al. 2=Louie et al. 3=Papadopoulos et al. 4=Andréoletti et al. 5=Cheuk et al. 6=Brand et al. 7=Aberle et al. 8=Suryadevara et al. 9=Calvo et al. 10=Marguet et al. 11=Nascimento et al.

CAPITULO III

3.1 ARTIGO ORIGINAL

ASSOCIAÇÃO ENTRE COINFECÇÃO VIRAL E O TEMPO DE INTERNAÇÃO EM LACTENTES COM CRISE DE SIBILÂNCIA

Autores

Sandra Eugenia Coutinho (1), Lidiane Leitão (1), Rita Mattiello (2), Ana Paula Duarte de Souza (2), Leonardo Araújo Pinto (2)

1. Enfermeira, mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.
2. Professor da Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

Fonte financiadora: não se aplica neste artigo de revisão.

Currículo dos autores está disponível na Plataforma Lattes do CNPq.

E-mail: leonardo.pinto@pucls.br.

Autor para correspondência: Leonardo A. Pinto, Avenida Ipiranga, 6690, 2º andar, Instituto de Pesquisas Biomédicas. Cep 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

INTRODUÇÃO

Tosse e sibilância são sintomas respiratórios muito comuns em crianças e podem ser a expressão clínica de uma grande variedade de problemas localizados nas vias respiratórias. Independentemente da causa, a sibilância é motivo de procura por atendimento médico em serviços de urgência, sobretudo por lactentes durante o primeiro ano de vida (1). As principais causas de sibilância em lactentes são as infecções virais e a asma atópica. Entre as principais infecções virais causadoras de sibilância, se destaca a bronquiolite viral aguda.

Um artigo recente documentou que 44% das crianças menores de um ano atendidas em unidades de emergência tinham sintomas respiratórios (2). Outros trabalhos demonstraram taxas elevadas de hospitalização para crianças menores de um ano com sintomas respiratórios, além de verificarem taxas de hospitalização até três vezes maiores que as de crianças que não apresentavam sibilância (3). Estas manifestações determinam custos elevados ao sistema de saúde, bem como o sofrimento para o lactente e seus familiares.

Um estudo prévio demonstrou que a média de idade para o início dos episódios de sibilância foi de 5,1 meses. E em relação a sua gravidade, mais de 40% das crianças que procuraram serviços de urgência, consultaram em função do quadro de sibilância, e deste, 17% tiveram pelo menos uma hospitalização por essa causa no primeiro ano de vida (4).

As principais causas de internações de lactentes são as crises de sibilância causada por vírus sazonais, sendo o mais comum o vírus sincicial respiratório (VSR). Outros agentes associados a esta síndrome clínica (lactente sibilante) foram: adenovírus (ADV), rinovírus (RVH), parainfluenza (VP) tipos 1, 2 e 3, influenza (VI) e metapneumovírus humano (MPVH).

Em relação à coinfeção no lactente sibilante, estudo prévio mostrou que infecções por VSR ocorreram como infecções simples em 121 crianças (68,8%) e coinfeções ocorreram em 55 crianças (31,2%). Os vírus mais frequentes associados com VSR foram ADV (43,6%) e MPVH (29,1%) (5).

Considerando que as infecções respiratórias de vias aéreas inferiores no lactente apresentam elevada morbidade, a avaliação da prevalência de vírus respiratórios é importante para o melhor entendimento das características epidemiológicas destas infecções em países em desenvolvimento. Com a utilização rotineira das técnicas de investigação etiológica tornou-se freqüente a identificação de mais de um agente viral numa mesma amostra.

O impacto da infecção por dois ou mais vírus não está bem esclarecida na literatura, especialmente a relação entre a coinfeção e a gravidade clínica da doença (6). No presente estudo, foram avaliadas a ocorrência de infecções e coinfeções por vírus respiratórios em lactentes com sibilância, bem como a associação entre coinfeção e desfechos relacionados à gravidade da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Este foi um estudo transversal, com lactentes de até 12 meses de idade, com crise de sibilância, que estavam internados pelo Sistema Único de Saúde nas unidades pediátricas do Hospital São Lucas da PUCRS – Emergência, Unidade de Cuidados Especiais Pediátrica (UCEP), Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) e Internação – e que haviam iniciado com sintomas de vias aéreas inferiores até 72 horas antes da inclusão. O estudo foi realizado no período entre setembro de 2009 e setembro de 2011.

Protocolo

Este estudo foi realizado em associação a um ensaio clínico randomizado para avaliar a eficácia da azitromicina no tratamento da bronquiolite aguda (7). Foram observados os seguintes critérios de exclusão: histórico de doenças pulmonares relacionadas à prematuridade (como displasia broncopulmonar); cardiopatias; pneumopatias crônicas (em especial fibrose cística); pacientes com suspeita clínica de coqueluche ou que haviam feito uso de antibiótico macrolídeo

previamente; pacientes de difícil seguimento (filhos de mães usuárias de drogas ou com histórico de doenças psiquiátricas); e pacientes cujos responsáveis recusaram-se a participar da pesquisa.

Os pacientes que se adequaram aos critérios de inclusão foram arrolados para o estudo e submetidos à coleta de dados e do lavado nasofaríngeo para pesquisa de vírus respiratórios por pesquisadores devidamente treinados.

Foi realizado exame físico dirigido para avaliação do quadro clínico de cada paciente (incluindo padrão respiratório, tiragem) e discutido com a equipe médica da emergência o grau de gravidade.

Aspirado Nasofaríngeo / Coleta de secreção

Para realização da coleta de secreção foi utilizado o seguinte material: 1 par de luvas de procedimento; 3 mL Soro fisiológico 0,9%; sonda para aspiração traqueal nº06; máscara com elástico; seringa de 5 mL; 1 tubo tipo Falcon de 15 mL com tampa e 03 tubos de 1,5 mL eppendorf®. Para identificação dos vírus respiratórios foi coletada secreção de nasofaringe obtida através de aparato a vácuo, composto de coletor de muco acoplado a sonda de aspiração nasal. Este procedimento era executado rotineiramente na coleta de secreção de nasofaringe de lactentes, sendo um método conhecido e seguro. BVA para o VSR, adenovírus, parainfluenza, e influenza foram realizados testes de Imunofluorescência Direta (IFD) para detecção de antígenos na secreção de nasofaringe no laboratório que tem como objetivo a pesquisa de antígenos em células ou tecidos através de um anticorpo específico marcado com fluorocromo (conjugado). Foi utilizado o kit *Respiratory Virus Panel* da Biotrin® (Dublin, Ireland) para a pesquisa de anticorpos monoclonais grupo-específico e tipo-específico para detecção direta e confirmação de cultura. Parte deste material foi congelada em freezer a uma temperatura de - 80°C e armazenadas no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) para pesquisas com PCR incluindo pesquisa para outros vírus respiratórios.

Extração do RNA

A extração do RNA total das amostras foi realizado pelo método de TRIzol™ (*Life Technologies*), de acordo com as instruções do fabricante, retirando as amostras do freezer -80°C e anotando na planilha, em seguida limpado a bancada com RNase zap e as pipetas e mantidas por 7 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200µl de clorofórmio nas amostras, homogeneizando por 15 segundos e mantidas em repouso de 2 a 3 min em temperatura ambiente e então centrifugadas a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e adicionado 500µl de álcool isopropílico, agitado por inversão gentilmente a temperatura ambiente durante 10 min e centrifugadas a 12 000rpm por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1ml de álcool etílico 70%. Em seguida centrifugado a 12 000rpm por 5 min à 4°C, removendo o sobrenadante e deixado secar o pellet por 20 min, acrescentando 10µl de Nuclease-Free Water. E quantificado o RNA no qubit e se não estiver maior que 14ug/ml continuar e fazer a síntese de cDNA.

Identificação dos vírus respiratórios por PCR em tempo real

O cDNA foi sintetizado utilizando o kit Superscript III (*Invitrogen*). Em seguida o cDNA foi quantificado utilizando o Qubit com o kit DNA HS. A qualidade do cDNA de cada paciente foi testada realizando amplificação do gene endógeno da b-actina por PCR em tempo real utilizando equipamento StepOne (*Applied Biosystem*), TaqMan Master Mix (*Applied Biosystem*) e iniciadores específicos (*Applied Biosystem*). Amostras que não amplificaram para b-actina foram excluídas do estudo. Foram realizadas as reações de PCR em tempo real para Metapneumovirus RSV e Rhino vírus utilizando 4ng de cDNA de cada paciente. Na Tabela está descrita as condições das reações de PCR e os iniciadores e sondas utilizados. Foram considerados positivos pacientes que amplificaram em triplicata com um CT médio inferior a 40 (tabela S1).

Ética

O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (registro 09/04678). Um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos responsáveis pelos pacientes, manifestando pleno acordo com sua realização. A identidade dos participantes foi mantida em sigilo.

Desfechos avaliados

Foram considerados como desfechos primários associados a gravidade da BVA: tempo de sibilância, tempo de internação hospitalar e tempo de uso de oxigenioterapia.

Análise estatística

Para a análise estatística foram consideradas as seguintes variáveis: prevalência de infecções por vírus respiratórios, tempo de sibilância, tempo de internação hospitalar e tempo de uso de oxigenioterapia, bem como as variáveis demográficas coletadas através do questionário. Para descrição dos dados foram utilizadas médias e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil conforme a simetria das variáveis. As variáveis categóricas foram descritas mediante frequência absoluta e relativa, para comparação das médias das variáveis contínuas entre dois grupos foi utilizado teste t de *Student* para amostras independentes; e teste de kruskal-wallis para comparar as diferenças (variâncias) entre três grupos independentes. O nível de significância foi de $p \leq 0,05$. A análise dos dados foi realizada com o programa SPSS versão 17.0.

RESULTADOS

No presente estudo foram selecionados 127 pacientes, sendo que 122 completaram todos os critérios de inclusão. A média de idade foi de 2,9 meses, sendo 54,9% (67/122) dos pacientes do sexo masculino (tabela 1). Com relação às variáveis clínicas, observamos que 97,5% (119/122) das crianças apresentavam tiragem (retrações costais, subcostais e intercostais); e que 99,2% (121/122) necessitaram oxigenioterapia, com tempo de duração médio de 5,3 dias de tratamento com O₂. O tempo médio de internação foi de 5,9 dias e o tempo de sibilância durante a internação hospitalar foi de 4,0 dias. Verificamos que 5,7% dos pacientes foram encaminhados para a unidade de cuidados especiais e dois lactentes foram submetidos à ventilação mecânica (tabela 2). Os dados referentes a história progressiva dos lactentes demonstrou que 18 (14,2%) já tinham apresentado sibilância e 19 (15%) apresentaram internação prévia. Observamos que 29,9% (19) das mães destes pacientes tinham história de rinite alérgica e 30 (23,6%) diagnóstico de asma (tabela 3).

Foram coletadas amostras de secreção nasal para pesquisa de vírus em 122 pacientes, e 3 pacientes tiveram amostras insuficientes ou inadequadas para análise. A identificação dos vírus por imunofluorescência demonstrou 42 (34%) amostras negativas e positividade de 101 (71,7%). O VSR foi o vírus mais freqüente com 65 (51,2%) da amostra positivas, seguido por influenza 15 (11,8%), parainfluenza 10 (7,9%) e adenovírus 3 (2,4%). O PCR foi utilizado no segundo ano do estudo, sendo testado em 56 amostras. Este método identificou o metapneumovírus positivo para 3 amostras (5,4%), rinovírus 5 (8,9%) e VSR 22 (39,3%). Os resultados da virologia são apresentados na tabela 4.

Quando analisamos a coinfeção, 35,3% (42/119) apresentaram resultados negativos; 48,7% (58/119) foram positivos para 1 vírus e 11,8% (14/119) para dois vírus. Os pacientes infectados com um maior número de vírus tiveram um maior tempo de internação e de uso de oxigenioterapia. (tabela 5).

DISCUSSÃO

A presença de mais de um patógeno parece influenciar na história natural da bronquiolite (8). Entretanto o quadro clínico associado à coinfeção viral em lactentes com infecção respiratória, ainda não está claro (9). A prática clínica pressupõe que a presença de mais um agente viral gera incertezas em relação ao prognóstico das infecções (5). O presente estudo foi realizado com lactentes até um ano de idade com crise de sibilância. As características clínicas contribuíram para o elevado índice de detecção de vírus respiratórios na secreção de nasofaringe desses pacientes.

A média do tempo de internação encontrada entre coinfectados e monoinfectados foi de 7,0 e 5,8 dias, respectivamente. Quanto à análise dos outros desfechos envolvidos em relação à gravidade, a mediana do tempo de internação e uso de oxigenioterapia foi superior nos pacientes com um maior número de agentes identificados na amostra (tabela 5).

Nesta pesquisa foram investigados agentes respiratórios tais como: influenza, parainfluenza, adenovírus e VSR através da técnica IFD que conferiu positividade de 71,7% do total das amostras coletadas; e através do PCR para detecção dos seguintes vírus: VSR, rinovírus e metapneumovírus. A taxa de positividade para o PCR foi de 53% da amostra analisada. Este último resultado contraria a maior parte dos dados de literatura, e pode ser explicado pelas dificuldades para aplicação de uma nova técnica de diagnóstico, em comparação com a IFD, que já é aplicada na instituição há cerca de 10 anos.

Os resultados da IFD estão de acordo com a literatura, que refere uma taxa de identificação viral de 45 a 70%, com esta técnica (10). Este estudo contribui para confirmar os resultados em nossos achados que identificaram infecção por VSR em 51,2% das amostras estudadas. Nossos resultados mostraram que o VSR esteve presente tanto em lactentes com infecção por um único agente viral, como também foi freqüente nos casos de coinfeção.

A detecção de agentes virais múltiplos em secreção de nasofaringe ainda é um assunto mundialmente estudado e relevante. Geralmente, consideramos um quadro de coinfeção, quando os agentes virais envolvidos são conhecidamente patogênicos (11-13). A literatura nos mostra que a ocorrência de co-infecções por

vírus respiratórios é variável (15 a 30%) (11-13). Os resultados deste estudo mostram que 11,5% apresentaram coinfeção viral, confirmando dados dos estudos citados anteriormente.

O significado clínico da codetecção entre dois ou mais agentes virais ainda é motivo de estudos na literatura científica, principalmente no que diz respeito às formas mais graves da doença. Por outro lado, um estudo realizado em uma população brasileira (14) encontrou um índice de 40% de co-infecções, porém não encontrou relação entre a gravidade da doença e infecção por mais de um agente viral.

Atualmente, os efeitos da coinfeção sobre o organismo das crianças ainda são pouco conhecidos. Muitos são os fatores estudados como os possíveis determinantes da gravidade das infecções respiratórias virais, bem como a variação da resposta imunológica frente à presença de um único ou mais agentes virais (15, 16).

Alguns estudos já haviam descrito uma relação positiva entre co-infecção e gravidade. Grensill (17) estudou durante um ano, crianças com BVA por VSR, em ventilação mecânica (VM) e constatou que 70% destas apresentaram co-infecção especialmente com metapneumovírus humano (MPVH), sugerindo que a associação entre VSR e MPVH possa ser um determinante na gravidade da doença. Semple (18) também sugeriram que coinfeção entre MPVH e VSR foi indicativo de gravidade da doença, aumentando a necessidade de internação em UTI e uso de ventilação mecânica. Nos estudos de Richard também foram encontradas relações entre co-infecção e gravidade da doença, visto que a necessidade de internação em UTI foi maior nas crianças coinfectadas do que nas que tiveram infecção por um único agente viral. Outro estudo de Paranhos-Baccala (19) avaliou a associação do VSR ao MPVH e/ou ao rinovírus (RVH) também determinou maior severidade na doença.

Por outro lado, Canducci (11) relata maior gravidade de infecções únicas por VSR quando comparadas às infecções por VSR e MPV-h em crianças hospitalizadas. As infecções únicas por VSR foram associadas à maior tempo de hospitalização e hipóxia (11, 20).

Em trabalho publicado recentemente, nosso grupo não observou diferença significativa com relação à gravidade da doença entre crianças coinfectadas, em comparação as monoinfectadas (*Sparremberg et al. Scientia Medica 2010*). Porém, este estudo mostrou resultados preliminares com número limitado de pacientes incluídos.

O presente estudo tem algumas limitações como amostras insuficientes para análise por PCR e a coleta de secreção nasofaríngea que é dependente de muitos fatores para o sucesso da coleta. Podemos citar a presença dos pais e fatores emocionais como choro do lactente, que podem gerar ansiedade no momento do procedimento. Além disso, alguns pacientes apresentaram pouca secreção nasofaríngea no momento da coleta. Todos esses fatores fazem parte da dinâmica hospitalar em que a criança está inserida. Desta forma, os pesquisadores devem se adaptar e ter flexibilidade para a efetividade das ações a serem realizadas.

A detecção simultânea de um amplo espectro de vírus possibilita o diagnóstico e avaliação da codetecção viral em casos de infecções respiratórias agudas (IRA) (21). Através dos dados da IFD e PCR encontramos amostras com coinfecção e conseguimos demonstrar que a coinfecção entre os vírus pesquisados foi associada a gravidade da doença. É importante considerar que a técnica de PCR também possui limitações, como as taxas de co-detecção, mesmo sem associação de infecção para mais de um vírus.

Neste estudo, a relação da coinfecção com vírus respiratórios nos lactentes com sibilância influenciou a gravidade do quadro clínico dos pacientes. Em adição, as taxas de coinfecção em lactentes internados na emergência deste hospital sugerem que a condição sócio-econômica, a aglomeração de pessoas no mesmo ambiente, bem como a pequena distância entre os leitos na emergência podem ser fatores importantes para o achado de co-infecção por vírus respiratórios.

Tabela 1. Características dos pacientes de acordo com o questionário aplicado na admissão hospitalar (N=122).

Idade (meses), média±DP	2,9 ± 2,6
Sexo(masculino), n (%)	67/122 (54,8%)
Peso atual,(kg), média±DP	5,31± 2,18
Frequenta creche atual n (%)	6/122 (4,9%)
Frequenta creche anterior n (%)	6/122 (4,9%)
Irmão em casa n (%)	78/122 (63,9%)

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes no período da internação hospitalar.

Característica clínica	Média e desvio padrão
Tempo de internação hospitalar (dias)	5,91 ± 3,24
Frequência respiratória (MRM)	48,24 ±14,82
Frequência cardíaca (BCPM)	141,6 ± 35,21
Saturação de oxigênio na admissão	91,51 ± 18,56
Tiragem, n (%)	119 (97,5)
Unidade de cuidados especiais*, n (%)	7 (5,7)
Ventilação mecânica, n (%)	2 (1,6)
Uso de antibiótico, n (%)	40 (32,7)
Uso de CO, n (%)	2 (1,6)

* Pacientes com dificuldade respiratória importante e necessidade de monitorização contínua com saturação de O₂.

Tabela 3. História médica progressa dos pacientes de acordo com o questionário aplicado na admissão.

Características	Pacientes = n (%)
Internação hospitalar prévia, n (%)	19 (15,0)
Sibilância, n (%)	18 (14,2)
Rinite alérgica (materna), n (%)	38 (29,9)
Rinite alérgica (paterna), n (%)	28 (22,0)
Asma (materna), n (%)	30 (23,6)
Asma (paterna), n (%)	14 (11,0)

Tabela 4. Identificação dos vírus respiratórios através da imunofluorescência e PCR em tempo real.

Imunofluorescência	N	%	PCR	N	%
Negativo	42	28			
Positivo	101	71,7			
VSR	65	51,2	VSR	22	17,3
Adenovírus	03	2,4	Rinovírus	5	3,9
Parainfluenza	10	7,9	Metapneumovírus	3	2,4
Influenza	15	11,8			

Tabela 5. Gravidade associada ao número de vírus respiratórios.

Virus /n	0 n(42)	1 n(58)	2 n(14)	p
(t) Uso O2 /dias	4,36 ±3,62	5,79 ±2,76	7,07 ±3,36	0,001*
(t) Internação /dias	5,00 ±3,19	6,48 ±3,03	7,57 ±3,67	0,013*
(t) Sibilancia /dias	3,33 ±2,33	4,45 ±2,85	4,43 ±3,06	0,131

t = tempo; NPar Tests/ Kruskal-Wallis Test

SUPLEMENTO ONLINE

Tabela S1. *Primers* e condições da reação de PCR em tempo real.

	Rhino	MPV	RSV
Forward (5'-3')	GCACTTCTGTTTCCCC	CATAYAARCATGCTATATTTAAAAGAGTCTC	AACAGATGTAAGCAGCTCCGTTATC
Reverse (5'-3')	GGCAGCCACGCAGGCT	CCTATYTCWGCAGCATATTTGTAATCAG	CGATTTTTATTGGATGCTGTACATTT
Sonda (5'-3')	FAM-AGCCTCATCTGCCAGGTCTA-TAMRA FAM-AGCCTCATCGACCAAACTA-TAMRA	FAM-CAACHGCAGTRACCCYTCATCATTRCA-TAMRA	FAM-TGCCATAGCATGACACAATGGTCCT-TAMRA
Ciclagem	45 ciclos	40 ciclos	50 ciclos
TM	55°C	55°C	60°C

TM: temperatura média

REFERÊNCIAS

1. Sole D. [Childhood wheezing]. *J Bras Pneumol*. 2008 Jun;34(6):337-9.
 2. Kotaniemi JT, Pallasaho P, Sovijarvi AR, Laitinen LA, Lundback B. Respiratory symptoms and asthma in relation to cold climate, inhaled allergens, and irritants: a comparison between northern and southern Finland. *J Asthma*. 2002 Oct;39(7):649-58.
 3. Akinbami LJ, Schoendorf KC. Trends in childhood asthma: prevalence, health care utilization, and mortality. *Pediatrics*. 2002 Aug;110(2 Pt 1):315-22.
 4. Lima JA, Fischer GB, Sarria EE, Mattiello R, Sole D. Prevalence of and risk factors for wheezing in the first year of life. *J Bras Pneumol*. 2010 Oct;36(5):525-31.
 5. De Paulis M, Gilio AE, Ferraro AA, Ferronato AE, do Sacramento PR, Botosso VF, et al. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 Jul-Aug;87(4):307-13.
 6. Miron D, Srugo I, Kra-Oz Z, Keness Y, Wolf D, Amirav I, et al. Sole pathogen in acute bronchiolitis: is there a role for other organisms apart from respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Jan;29(1):e7-e10.
 7. Pinto LA, Pitrez PM, Luisi F, de Mello PP, Gerhardt M, Ferlini R, et al. Azithromycin therapy in hospitalized infants with acute bronchiolitis is not associated with better clinical outcomes: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical trial. *J Pediatr*. 2012 Dec;161(6):1104-8.
 8. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Mar;27(3):213-7.
 9. Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol*. 2010 Aug;48(4):239-45.
 10. Calegari T, Queiroz DA, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TF, et al. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005 Apr;9(2):156-61.
 11. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berre S, Terulla C, et al. 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 Apr;80(4):716-23.
12. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr*. 2009 Jan;98(1):123-6.
 13. Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Nov;23(11):1003-7.
 14. Nascimento MS, Souza AV, Ferreira AV, Rodrigues JC, Abramovici S, Silva Filho LV. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(11):1133-7.
 15. DeVincenzo JP. Factors predicting childhood respiratory syncytial virus severity: what they indicate about pathogenesis. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Nov;24(11 Suppl):S177-83, discussion S82.
 16. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza Other Respi Viruses*. 2012 Jan;6(1):71-7.
 17. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis*. 2003 Mar;9(3):372-5.
 18. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2005 Feb 1;191(3):382-6.
 19. Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Richard N, Vernet G, Lina B, Floret D. Mixed respiratory virus infections. *J Clin Virol*. 2008 Dec;43(4):407-10.
 20. Gerna G, Campanini G, Rognoni V, Marchi A, Rovida F, Piralla A, et al. Correlation of viral load as determined by real-time RT-PCR and clinical characteristics of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections in early infancy. *J Clin Virol*. 2008 Jan;41(1):45-8.
 21. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Jul;27(7):589-94.
-

CAPITULO IV

4.1 CONCLUSÕES

Neste estudo, a relação da coinfeção com vírus respiratórios nos lactentes com sibilância influenciou a gravidade do quadro clínico dos pacientes. Em adição, as taxas de coinfeção em lactentes internados na emergência deste hospital sugerem que a condição socioeconômica, a aglomeração de pessoas no mesmo ambiente, bem como a pequena distância entre os leitos podem ser fatores importantes para o achado freqüente de coinfeção por vírus respiratórios.
