

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E
SAÚDE DA CRIANÇA**

FRANCINE HARTMANN

**SURFACTANTE PULMONAR: AVALIAÇÃO E TERAPIA NA
BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA GRAVE**

**Porto Alegre
2015**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
DOUTORADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA**

**SURFACTANTE PULMONAR: AVALIAÇÃO E TERAPIA
NA BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA GRAVE**

FRANCINE HARTMANN

francine.pediatria@gmail.com

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina da PUCRS para obtenção do título de
Doutora em Saúde da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Holmer Fiori
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Celiny Ramos
Garcia

Porto Alegre

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

H333s Hartmann, Francine

Surfactante pulmonar: avaliação e terapia na bronquiolite viral aguda grave / Francine Hartmann. - Porto Alegre: PUCRS, 2015.

59 p.: gráf. il. tab. Inclui um artigo original a ser submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Holmer Fiori.

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Celiny Ramos Garcia.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina/ Pediatria e Saúde da Criança. Doutorado em Saúde da Criança.

1. SURFACTANTES PULMONARES/uso terapêutico. 2. BRONQUIOLITE VIRAL/terapia. 3. DOENÇA AGUDA/terapia. 4. LACTENTE. 5. UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA PEDIÁTRICA. 6. PEDIATRIA. 7. ESTUDOS RETROSPECTIVOS. I. Fiori, Humberto Holmer. II. Garcia, Pedro Celiny Ramos. III. Título.

C.D.D. 618.9223

N.L.M. WF 600

“O futuro não se adivinha...

... ele se constrói!”

Dedicatória

Aos meus pais Darlei e Luiza, pelo apoio, educação e exemplo.

Ao Hugo, pelo amor, companheirismo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Renato Machado Fiori**, meu mestre, pela oportunidade de aprendizado, pela paciência, amizade e dedicação, pelo apoio e incentivo constantes e, sobretudo, pelo exemplo diário de cordialidade e excelência.

Ao **Dr. Humberto Holmer Fiori**, meu orientador, pelo incentivo constante, pela amizade, disponibilidade e apoio durante as coletas e redação desta;

Ao **Dr. Pedro Celiny Ramos Garcia**, pela amizade, dedicação e disponibilidade.

Ao **CNPQ**, pela bolsa de pesquisa.

A **Dra. Rosirene Mafalda**, meus “olhos” e meu “braço direito” dentro da UTIP, obrigada por toda dedicação, pois sem tua ajuda nada seria possível.

A toda **Equipe da UTIP do HSL-PUCRS** (corpo clínico, residentes, fisioterapeutas, enfermeiras, técnicas em enfermagem), pelo convívio diário, cordialidade, e apoio nas coletas, imprescindível para o sucesso desta pesquisa.

A toda **Equipe do Laboratório de Hematologia do HSL-PUCRS**, pela atenção, dedicação e ajuda nas análises.

À **Carla Rothmann** e **Ana Cardoso**, pela amizade, gentileza, e apoio constante durante esse período.

A todos os **professores do Curso de Pós-Graduação**, que de uma forma ou de outra, contribuíram para o meu crescimento e aprendizado.

A todos meus **amigos e familiares**, por sempre me apoiarem e incentivarem.

Aos **pacientes e seus responsáveis**, pela participação neste estudo, um agradecimento especial. E mesmo em um momento difícil, ter a consciência de que pesquisar é preciso.

Ao **Par das Rosas**, em especial, **Mara Bea**, pela constante injeção de confiança e ânimo.

E por fim, agradeço as três pessoas mais importantes na minha vida, o **meu pai, Darlei**, à **minha mãe, Luíza**, e o **meu companheiro, Hugo**, pelo amor, paciência, tranquilidade e compreensão durante todo esse período.

RESUMO

Objetivos: Avaliar a resposta à administração de surfactante exógeno de pacientes com bronquiolite viral aguda (BVA) grave conforme a função e produção de surfactante, medida através do teste das microbolhas estáveis (TME) e da contagem de corpos lamelares (CCL).

Métodos: Foram estudados 24 pacientes, menores de 1 ano de idade, com diagnóstico de BVA grave, que estavam em ventilação mecânica e receberam 100mg/kg de surfactante exógeno, de acordo com a rotina estabelecida pela da unidade de tratamento intensivo pediátrico (UTIP). Previamente à administração, foi coletado uma amostra de secreção traqueal para identificação de vírus, realização da contagem de corpos lamelares e do teste das microbolhas estáveis. Foi obtido sangue arterial para gasometria. Uma hora, 6 horas e 24 horas após a administração de surfactante foi coletado novamente sangue arterial para gasometria.

Resultados: Houve aumento de 20% na PaO_2 após 24 horas da administração de surfactante em 2 (14,29%) de 14 pacientes com corpos lamelares ≤ 60.000 e em 5 (50%) de 10 pacientes com >60.000 corpos lamelares ($p=0,08$). Seis (46,15%) de 13 pacientes com ≤ 13 microbolhas e 01 (9,09%) de 11 pacientes com >13 microbolhas tiveram um aumento na $PaO_2 > 20\%$ após 24 horas da administração ($p=0,08$). Apenas 2 pacientes dos 7 que responderam ao surfactante exógeno, tinham vírus sincicial respiratório (VSR) positivo. Os pacientes com >60.000 corpos lamelares tiveram um aumento estatisticamente significativo da oxigenação após 6 horas do uso de surfactante, não associado a redução do tempo de ventilação e internação. Os pacientes sem VSR positivo tiveram um aumento substancial da PaO_2 arterial após 1 hora de administração do surfactante, que se manteve por 24 horas

Conclusão: A administração de surfactante melhora transitoriamente a oxigenação dos pacientes com BVA. Os pacientes que não tinham vírus sincicial respiratório positivo tiveram uma importante melhora imediata na oxigenação após o uso de surfactante exógeno. A CCL e o TME não se mostraram suficientemente sensíveis e específicos para predizer quem são os pacientes com bronquiolite grave que responderão à terapia com surfactante exógeno.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the response to surfactant of patients with acute bronchiolitis (AB) according the surfactant function and production, measured through the stable microbubble test and the lamellar body count.

Study Design: Twenty four patients younger than 1 year of age, with the diagnosis of AB, who were in mechanical ventilation and received 100 mg of surfactant, according with the established routine by the pediatric intensive care unit, were studied. Previously to the administration, tracheal secretion was collected for virus identification, stable microbubble test and lamellar body count. Arterial blood gases were obtained. One hour, 6 hours and 24 hours after of surfactant administration arterial blood gases were again collected.

Results: There was a 20% increase in PaO₂ 24 hours after surfactant administration in 2 (14.29%) of 14 patients with lamellar bodies \leq 60.000 and in 5 (50%) of 10 patients with >60.000 lamellar bodies ($p=0.08$). Six (46.15%) of 13 patients with ≤ 13 microbubbles and one (9.09%) of 11 patients with >13 microbubbles had an increase in PaO₂ $>20\%$ after 24 hours of administration ($p=0.08$). Only 2 patients of 7 who responded to surfactant, had respiratory syncytial virus (RSV) positive. The patients with lamellar bodies ≤ 60.000 had a statistically significant increase in oxygenation after 6 hours of surfactant administration, not associated to a reduction of mechanical ventilation time or hospitalization time. The patients without positive RSV had a substantial increase in PaO₂ after one hour after the administration of surfactant, that was maintained for 24 hours.

Conclusion: The surfactant administration transiently improved oxygenation in patients with AVB. Patients who had no positive respiratory syncytial virus had an important improvement in oxygenation after administration of exogenous surfactant. LBC and SMT are not sufficiently sensitive and specific to predict who the patients with severe bronchiolitis responding to treatment with exogenous surfactant.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1. Boxplot da contagem de corposlamelares (CCL/ μL) nos lactentes do grupo bronquiolite e do grupo controle..... 31
- Figura 2. Boxplot da contagem de microbolhas estáveis (MBE/ mm^2) nos lactentes do grupo bronquiolite e do grupo controle. 32

CAPÍTULO III

- Figura 1. Gráfico de dispersão das microbolhas em relação ao $\% \Delta \text{PaO}_2$ após 24 horas da administração de surfactante..... 48
- Figura 2. Gráfico de dispersão dos corpos lamelares em relação ao $\% \Delta \text{PaO}_2$ após 24 horas da administração de surfactante 49
- Figura 3. Resposta ao uso de surfactante exógeno na PaO_2 de pacientes com VSR + 50
- Figura 4. Resposta ao uso de surfactante exógeno na PaO_2 de pacientes com VSR - 51

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Resumo dos Estudos Usando Surfactante Pulmonar no Tratamento de Bronquiolite Viral Aguda Grave.....	16
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Características dos pacientes	30
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Características dos pacientes estudados	44
Tabela 2 - Parâmetros do ventilador, parâmetros gasométricos e de gravidade no momento da coleta de secreção.....	45
Tabela 3 - Dados relacionados à contagem de microbolhas.....	46
Tabela 4 - Dados relacionados à contagem de corpos lamelares.	47
Tabela 5 - Análise dos pacientes com VSR positivo e com VSR negativo.....	52
Tabela 6 - Características dos pacientes VSR+ e VSR –	52

LISTA DE ABREVIATURAS

CCL: Contagem dos Corpos Lamelares

CL: Corpos Lamelares

DTT®: Dithiotreitol®

FiO₂: Fração Inspirada de Oxigênio

FR: Frequência respiratória

HCO₃: Bicarbonato

HSL-PUCRS: Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

IQ: Intervalo interquartile

IV: Índice de Ventilação ($\text{PaCO}_2 \times \text{PIP} \times \text{FR}/1000$)

LBC: LamellarBodyCount

MBE: Microbolhas Estáveis

MBE/mm₂: Microbolhas Estáveis por Mililitro Quadrado

PaCO₂: Pressão parcial de gás carbônico arterial;

PaO₂: Pressão parcial de oxigênio arterial;

PEEP: Pressão positiva no final da expiração (positive endexpiratory pressure);

PIM: Índice de Mortalidade Pediátrica

PIM II: Índice de Mortalidade Pediátrica II

PIP: Pico Inspiratório de Pressão

PO: Pós operatório imediato

Sat O₂: Saturação de oxigênio

SDR: Síndrome do Desconforto Respiratório

SMT: StableMicrobubble Test

TME: Teste das Microbolhas Estáveis

UTIN: Unidades de Tratamento Intensivo Neonatais

UTIP: Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica

VM: Ventilação Mecânica

VSR: Vírus Sincicial Respiratório

% Δ FiO₂: Porcentagem da diferença da FiO₂ inicial (antes da administração de surfactante) e da FiO₂ de uma, seis ou 24 horas após a administração

% Δ PaCO₂: Porcentagem da diferença da PaCO₂ inicial (antes da administração de surfactante) e da PaCO₂ de uma, seis ou 24 horas após a administração

% Δ PaO₂: Porcentagem da diferença da PaO₂ inicial (antes da administração de surfactante) e da PaO₂ de uma, seis ou 24 horas após a administração

% Δ REL PaO₂/FiO₂: Porcentagem da diferença da relação PaO₂/FiO₂ inicial (antes da administração de surfactante) e da relação PaO₂/FiO₂ de uma, seis ou 24 horas após a administração

% Δ IV: Porcentagem da diferença do IV inicial (antes da administração de surfactante) e do IV de uma, seis ou 24 horas após a administração

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 JUSTIFICATIVA	18
1.3 OBJETIVOS	19
1.3.1 Objetivo Geral	19
1.3.2 Objetivos Específicos	19
1.4 REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO II	22
2.1 ARTIGO I	23
CAPÍTULO III	37
3.1 ARTIGO ORIGINAL	38
CAPÍTULO IV	58
4.1 CONCLUSÕES	59

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A terapia com surfactante é bem estabelecida na síndrome do desconforto respiratório (SDR) do prematuro, em que a deficiência de surfactante é um problema primário. Em outras doenças pulmonares de recém-nascidos a termo e de crianças maiores, pode haver redução da função surfactante devido à lesão pulmonar e presença de várias substâncias inibidoras derramadas nas vias aéreas terminais, porém o uso de surfactante exógeno nestas doenças tem sido pouco estudado.

A bronquiolite viral aguda (BVA) é conhecida como a infecção respiratória mais frequente em lactentes e crianças até 3 anos de idade, com o pico de incidência abaixo dos 12 meses, ocasionando inflamação e obstrução dos bronquíolos, sendo a mais frequente causa de hospitalização entre lactentes e crianças. (1-5) Taxas de internação hospitalar por bronquiolite no EUA e Europa tem sido relatadas para ser em torno de 3% para crianças com menos de 1 ano de idade. (6) Os fatores associados tipicamente com um alto risco de hospitalização são o sexo masculino, nascimento prematuro, displasia broncopulmonar, doença cardíaca congênita, imunodeficiência de células T, idade < 6 meses, nascimento durante a primeira metade da temporada influenza, e aglomeração/irmãos. (7- 9)

O principal agente etiológico é o vírus sincicial respiratório (cerca de 50 a 80% das vezes), mas a bronquiolite viral aguda também pode ser ocasionada pelo vírus da influenza, da parainfluenza, pelo adenovírus e coronavírus. (2, 5, 10-14). Além dos vírus mencionados, mais recentemente foram descritos em crianças o metapneumovírus humano (hMPV) e o bocavirus humano (HBoV). (15) Alguns estudos examinaram a epidemiologia de diferentes vírus associados com infecção aguda do trato respiratório inferior (ITRI) em crianças hospitalizadas, em emergência pediátrica e ambulatorios. A maioria dos dados indicam que o VSR e Rinovírus são os dois vírus mais comuns associados com ITRI na primeira infância. (16) Recentemente, sintomas neurológicos também têm sido associados com infecção respiratória pelo VSR e incluem convulsões, apnéia central, letargia, dificuldades de alimentação ou de deglutição, anormalidades no tônus muscular, estrabismo, entre outros. (17)

VSR é o patógeno mais comum associado com bronquiolite grave, o vírus mais intrigante, em termos de sibilância recorrente e asma, é o rinovírus. (16) Stollar et. al

revisaram os prontuários de 202 pacientes <1 ano de idade com diagnóstico de bronquiolite com o objetivo de observar a diferença clínica, terapêutica, laboratorial e radiológica dos pacientes com VSR positivo dos VSR negativo. Observaram que os pacientes com VSR positivo eram mais jovens, tinham maior taxa de hospitalização, maior tempo de internação, e duração da oxigenioterapia. (18)

A BVA inicia-se clinicamente por uma fase de coriza e febre. À medida que a doença progride podem surgir tosse, chiado e dispnéia e, com o agravamento do quadro respiratório, tornam-se evidentes sinais de dificuldade respiratória como taquipnéia, tiragem, gemido expiratório e, menos frequentemente, cianose. Lactentes nos primeiros meses de vida, crianças com antecedentes de prematuridade e/ou de baixo peso ao nascimento podem apresentar episódios de apnéia. (2, 11)

Fisiopatologicamente, ocorre a invasão e replicação viral nas células epiteliais ciliadas das vias respiratórias superiores e, posteriormente, a infecção progride pelas vias respiratórias inferiores afetando, sobretudo, os bronquíolos. Assim, a infecção viral provoca inflamação dos bronquíolos, sendo as principais características patológicas a necrose das células epiteliais ciliadas, infiltração peribrônquica por células inflamatórias de predomínio linfocítico, edema da mucosa e submucosa, aumento da secreção de muco e obstrução do lúmen dos bronquíolos.

A atividade do surfactante endógeno pode ser prejudicada, no curso da doença, por diversas razões: 1) danos no pneumócito tipo II; 2) inativação do surfactante por inibidores específicos e componentes do plasma; 3) dano na membrana alvéolo-capilar, podendo causar uma perda de surfactante para o interstício; 4) ventilação com grandes volumes correntes e altas frações inspiradas de oxigênio que podem diminuir ou destruir o surfactante alveolar e brônquico. (19, 10) A falta ou inatividade do surfactante favorece ainda mais o colapso alveolar e brônquico e a permeabilidade das vias aéreas a macromoléculas.

Em lactentes com BVA grave foram relatadas alterações na composição e função surfactante, demonstrando-se redução dos níveis de SP-A, fosfolípidios, e imaturidade no teste do click no aspirado traqueal. (2,19-21) Estas alterações podem levar a um aumento da tensão superficial nas vias aéreas terminais, causando colapso alveolar e aumento da permeabilidade capilar. A administração do surfactante exógeno poderia ser uma terapêutica potencial para estabilizar os bronquíolos terminais e alvéolos e melhorar as trocas gasosas. (22)

Apenas 3 estudos (tabela 1) testaram a administração de surfactante exógeno em lactentes com bronquiolite. Individualmente, esses estudos demonstraram modestos benefícios sobre a mecânica pulmonar e a oxigenação. Entretanto, em todos eles o tamanho amostral era pequeno e, em pelo menos dois deles, as doses de surfactante foram baixas. Em nenhum dos estudos, a avaliação do sistema surfactante nos pacientes tratados foi realizada.

Tabela 1 - Resumo dos Estudos Usando Surfactante Pulmonar no Tratamento de Bronquiolite Viral Aguda Grave

	Delineamento	Surfactante	N1	N2	Dose mg/Kg	Desfechos
Luchettiet al.(23)	Prospectivo randomizado	Curosuf (suíno)	10	10	50	<ul style="list-style-type: none"> • melhora no IO e PaCO₂ • < pressão de pico inspiratória • < tempo de VM e permanência na UTI
Tibbyet al.(22)	Prospectivo randomizado placebo controlado	Survanta (bovino)	9	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • melhora na oxigenação, ventilação e A-a O₂ • não houve diferença significativa no tempo de VM e permanência na UTI
Luchettiet al.(24)	Prospectivo multicêntrico randomizado e controlado	Curosuf (suíno)	20	20	50	<ul style="list-style-type: none"> • melhora no IO e PaCO₂ • < pressão de pico inspiratória • melhora na complacência estática • melhora no raio-X 3horas após o tratamento • < tempo de VM e permanência na UTI

N 1, tamanho amostral do grupo surfactante; **N2**, tamanho amostral do grupo controle; **IO**, índice de oxigenação; **VM**, ventilação mecânica; **UTI**, unidade de terapia intensiva; **A-a O₂**, gradiente alvéolo arterial

Entre os testes que avaliam a produção e função surfactante, a contagem de corpos lamelares (CCL) e o teste das microbolhas estáveis (TME) têm sido utilizados em Unidades de Tratamento Intensivo Neonatais (UTIN) para a avaliação da maturidade pulmonar e assim auxiliar na decisão do uso de surfactante exógeno. Podem ser realizados no líquido amniótico, no aspirado traqueal e gástrico, mostrando boa performance em todos estes fluidos. Os corpos lamelares (CL) são estruturas produzidas pelos pneumócitos II, onde são estocadas as substâncias surfactantes que serão lançadas nos alvéolos pulmonares. A contagem de corpos lamelares (CCL) é um método rápido, de baixo custo, que não é

observador-dependente, pois a contagem é feita em um contador de células utilizado rotineiramente para medidas hematimétricas. Como os CL têm o mesmo diâmetro das plaquetas, o que for contado como plaquetas pela máquina considera-se como a CCL, desde que o fluido analisado não contenha sangue. O TME desenvolvido por Pattle et al., (25) depende da capacidade das secreções que contêm surfactante, de formar bolhas estáveis com menos de 15 micrômetros. A contagem destas microbolhas estáveis (MBE) avalia a maturidade da função surfactante.

No capítulo II desta tese o leitor poderá acompanhar um recente artigo publicado, em que o nosso grupo de pesquisas de surfactante pulmonar, teve como objetivo avaliar a função e produção surfactante no aspirado traqueal de lactentes com BVA grave, tem sido observado que o grupo com bronquiolite apresentou produção e função surfactante significativamente menor do que o grupo controle. Houve uma redução significativa na contagem de corpos lamelares ($p=0,003$) e na contagem de microbolhas estáveis ($p<0,001$) nos pacientes com bronquiolite. Esses dados indicam redução na função e produção surfactante nesses pacientes. (26)

No capítulo III encontrará o artigo original de nosso presente estudo, observando a metodologia aplicada aos resultados encontrados em lactentes com a doença. Já no capítulo IV poderá acompanhar as nossas conclusões e expectativas futuras.

1.2 JUSTIFICATIVA

Em várias patologias respiratórias da criança, existem evidências de alterações do sistema surfactante com inibição e redução de sua produção. A terapia com surfactante tem sido avaliada em algumas dessas situações. Os resultados do surfactante exógeno têm sido avaliados considerando todo o grupo tratado e os resultados tem sido modestos, talvez porque em nenhum estudo tenham sido separados os pacientes com evidência de deficiência do sistema surfactante daqueles sem evidência de deficiência.

Em nenhum dos estudos realizados até agora em bronquiolite, a avaliação do sistema surfactante dos pacientes tratados com surfactante exógeno foi realizada.

A utilização da medida de produção e função surfactante através de testes simples poderia permitir identificar os grupos de pacientes com bronquiolite que se beneficiariam da utilização de surfactante exógeno, otimizando o seu uso. Acreditamos que os pacientes com pior função e produção surfactante, ou seja, com menor número de microbolhas estáveis e menor número de corpos lamelares responderiam melhor a administração de surfactante.

Consideraremos uma boa resposta ao surfactante quando houver um aumento de 20% ou mais, na PaO_2 24 horas após a intervenção.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo é avaliar a resposta à administração de surfactante exógeno em pacientes com BVA submetidos a VM, comparando a resposta de acordo com a função e produção estimada através do TME e CCL.

1.3.2 Objetivos Específicos

1) Comparar os grupos com contagem baixa e alta de microbolhas e corpos lamelares no que se refere a(o):

- Gases sanguíneos antes e após a administração de surfactante.
- Tempo de internação, de ventilação mecânica e uso de vasopressores/inotrópicos na UTIP.

2) Comparar a resposta a administração de surfactante e os desfechos clínicos de acordo com a virologia.

3) Verificar se há correlação entre os resultados dos testes com:

- Gases sanguíneos
- Necessidade de oxigênio
- Máximo pico inspiratório de pressão

1.4 REFERÊNCIAS

1. Yorita KL, Holman RC, Sejvar JJ, Steiner CA, Schonberger LB. Infectious Disease Hospitalizations Among Infants in the United States. *Pediatrics*. 2008;121(2):244-52.
2. Carvalho WB, Johnston C, Fonseca MC. [Acute bronchiolitis, an updated review]. *Rev Assoc Med Bras*. 2007 Mar-Apr;53(2):182-8.
3. Leader S, Kohlhase K. Recent trends in severe respiratory syncytial virus (RSV) among US infants, 1997 to 2000. *J Pediatr*. 2003 Nov;143(5 Suppl):S127-32.
4. Welliver RC, Checchia PA, Bauman JH, Fernandes AW, Mahadevia PJ, Hall CB. Fatality rates in published reports of RSV hospitalizations among high-risk and otherwise healthy children. *Curr Med Res Opin*. 2010 Sep;26(9):2175-81.
5. Barreira ER, Precioso AR, Bousso A. Pulmonary surfactant in respiratory syncytial virus bronchiolitis: The role in pathogenesis and clinical implications. *Pediatric Pulmonology*. 2010:n/a-n/a.
6. Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet* 2006, 368:312-22.
7. Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr* 2003, 143:S112-7.
8. Simoes EA. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *J Pediatr* 2003, 143:S118-26.
9. Pezzotty P; et al: Incidence and risk factors of hospitalization for bronchiolitis in preterm children: a retrospective longitudinal study in Italy. *BMC Pediatrics* 2009, 9:56
10. Freddi NA, Filho JO, Fiori HH. [Exogenous surfactant therapy in pediatrics]. *J Pediatr (Rio J)*. 2003 Nov;79 Suppl 2:S205-12.
11. Wright M, Piedimonte G. Respiratory syncytial virus prevention and therapy: past, present, and future. *Pediatr Pulmonol*. 2011 Apr;46(4):324-47.
12. Davison C, Ventre KM, Luchetti M, Randolph AG. Efficacy of interventions for bronchiolitis in critically ill infants: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Crit Care Med*. 2004 Sep;5(5):482-9.
13. Garcia CG, et al. Risk Factors in Children Hospitalized With RSV Bronchiolitis Versus Non-RSV Bronchiolitis. *Pediatrics*. 2010 December; 126(6): e1453–e1460.
14. Verma N, Lodha R, Kabra SK. Recent Advances in Management of Bronchiolitis. *INDIAN PEDIATRICS*. 2013 October;50.
15. Milder E, Arnold JC. Human metapneumovirus and human bocavirus in children. *Pediatr Res*. 2009;65:78R-83R.

16. Mansbach JM, Camargo CA. Respiratory viruses in bronchiolitis and their link to recurrent wheezing and asthma. *Clin Lab Med*. 2009 December ; 29(4): 741–755.
17. Bohmwald K, et al. Central nervous system alterations caused by infection with the human respiratory syncytial virus. *Rev. Med. Virol*. 2014; 24: 407–419.
18. Stollar F, et al. Virologic testing in bronchiolitis: does it change management decisions and predict outcomes?. *Eur J Pediatr*. 2014; 173:1429-1435.
19. Dargaville PA, South M, McDougall PN. Surfactant abnormalities in infants with severe viral bronchiolitis. *Arch Dis Child*. 1996 Aug;75(2):133-6.
20. Kerr MH, Paton JY. Surfactant protein levels in severe respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Apr;159(4 Pt 1):1115-8.
21. Skelton R, Holland P, Darowski M, Chetcuti PA, Morgan LW, Harwood JL. Abnormal surfactant composition and activity in severe bronchiolitis. *Acta Paediatr*. 1999 Sep;88(9):942-6.
22. Tibby SM, Hatherill M, Wright SM, Wilson P, Postle AD, Murdoch IA. Exogenous surfactant supplementation in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Oct;162(4 Pt 1):1251-6.
23. Luchetti M, Casiraghi G, Valsecchi R, Galassini E, Marraro G. Porcine-derived surfactant treatment of severe bronchiolitis. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998 Aug;42(7):805-10.
24. Luchetti M, Ferrero F, Gallini C, Natale A, Pigna A, Tortorolo L, et al. Multicenter, randomized, controlled study of porcine surfactant in severe respiratory syncytial virus-induced respiratory failure. *Pediatr Crit Care Med*. 2002 Jul;3(3):261-8.
25. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, et al. Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol*. 1979 Aug;86(8):615-22.
26. Hartmann F, Fiori HH, Garcia PCR., Piva J, Fiori RM. Surfactant Deficiency in Infants with Severe Acute Viral Bronchiolitis. *J Pediatr* 2014 Jun; 164(6):1432-5.