

# Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil

## *Vigilância de oito vírus respiratórios em amostras clínicas de pacientes pediátricos no sudeste do Brasil*

Luciano M. Thomazelli<sup>1</sup>, Sandra Vieira<sup>2</sup>, Andrea L. Leal<sup>3</sup>, Thereza S. Sousa<sup>4</sup>,  
Daniele B. L. Oliveira<sup>3</sup>, Miguel A. Golono<sup>3</sup>, Alfredo E. Gillio<sup>5</sup>, Klaus E. Stwien<sup>6</sup>,  
Dean D. Erdman<sup>7</sup>, Edison L. Durigon<sup>8</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Detecção de oito vírus respiratórios mais comuns: vírus respiratório sincicial humano (VRSH), vírus influenza tipo A e B (IA e IB), vírus da parainfluenza 1, 2 e 3 (VPIH1, 2 e 3), adenovírus (Ad) e metapneumovírus humano (MPVH), a fim de estabelecer a etiologia das infecções respiratórias agudas (IRA) e a epidemiologia desses vírus em crianças pequenas atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em São Paulo, Brasil, durante o ano de 2003.

**Métodos:** A vigilância epidemiológica foi realizada em todas as crianças menores de 5 anos hospitalizadas por causa de doenças do trato respiratório inferior (DTRI) entre 1º de janeiro de 2003 e 20 de dezembro de 2003, no hospital universitário. Amostras coletadas de nasofaringe foram analisadas quanto à presença de vírus respiratórios através da reação em cadeia da polimerase e detectadas pelo programa GeneScan.

**Resultados:** Das 336 amostras coletadas, 187 (55,6%) foram positivas para pelo menos um dos vírus respiratórios estudados. De todas as crianças, o VRSH foi identificado em 24,1%, o MPVH em 17,8%, o VPIH3 em 8,3%, o Ad em 6,8%, o IA em 5%, o VPIH1 em 0,6%, sendo que nenhum vírus foi detectado em 44,1%. Infecções virais duplas foram detectadas em 7,1% de todas as amostras (12,8% das amostras positivas). O VPIH2 e o IB não foram detectados no presente estudo.

**Conclusões:** Este estudo confirma que as crianças menores de 5 anos, e especialmente aquelas menores de 1 ano, apresentam uma alta taxa de hospitalização devido aos seguintes vírus: VRSH, MPVH, VPIH, influenza e adenovírus. Foi possível determinar a etiologia e epidemiologia da maioria das IRAs e traçar o perfil de sazonalidade dos vírus respiratórios mais comuns entre as crianças pequenas.

*J Pediatr (Rio J).* 2007;83(5):422-428: Influenza, VRSH, parainfluenza, metapneumovírus, infecções respiratórias.

### Abstract

**Objective:** Detection of the eight most common respiratory viruses: Human respiratory syncytial virus (HRSV), influenza virus A and B (IA and IB), parainfluenza viruses 1, 2 and 3 (HPIV1, 2 and 3), adenovirus (Ad) and human metapneumovirus (HMPV), in order to establish the etiology of acute respiratory infections (ARIs) and the epidemiology of these viruses in young children seen at Hospital Universitário, Universidade de São Paulo, in São Paulo, Brazil, during 2003.

**Methods:** The epidemiological surveillance was conducted in all children younger than 5 years hospitalized at the Hospital for lower respiratory tract infections (LRTI) from January 1, 2003 to December 30, 2003. Nasal and throat samples were scanned for respiratory viruses by polymerase chain reaction and detected by the GeneScan assay.

**Results:** Of 336 samples collected from 336 patients, 187 (55.6%) were positive for at least one of the respiratory viruses studied. Of all the children, HRSV was identified in 24.1%, HMPV in 17.8%, HPIV3 in 8.3%, Ad in 6.8%, IA in 5%, HPIV1 in 0.6%, but no virus could be detected in 44.1%. Dual virus infections were detected in 7.1% of all samples (12.8% of positive samples). HPIV2 and IB were not detected in the present study.

**Conclusions:** This study confirms that children younger than 5 years and particularly younger than 1 year have a high hospitalization rate due to HRSV, HMPV, HPIV, influenza and adenovirus. We were able to determine the etiology and epidemiology of most ARIs and trace the seasonal profile of the commonest respiratory viruses among young children.

*J Pediatr (Rio J).* 2007;83(5):422-428: Influenza, HRSV, parainfluenza, metapneumovirus, respiratory infections.

1. Mestre, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP. Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP.
2. Doutora. Professora, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, SP. Hospital Universitário, USP, São Paulo, SP.
3. Mestre, USP, São Paulo, SP. Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP.
4. Fisioterapeuta, Universidade de São Camilo, São Camilo, SP. Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP.
5. Doutor, Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, SP. Hospital Universitário, USP, São Paulo, SP.
6. Doutor, Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, SP. Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP.
7. PhD, University of Georgia, Atlanta, GA, USA. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.
8. Professor titular, USP, São Paulo, SP. Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP.

O projeto recebe apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 01/11747-2).

**Como citar este artigo:** Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83(5):422-428.

Artigo submetido em 05.03.07, aceito em 30.05.07.

doi 10.2223/JPED.1694

## Introdução

As infecções respiratórias agudas (IRAs) são as causas mais comuns de morbidade e mortalidade entre pacientes pediátricos no mundo todo, sendo responsáveis por aproximadamente 30% de todos os óbitos infantis nos países em desenvolvimento<sup>1</sup>. Embora raramente constituam causa de morte em países industrializados, as IRAs produzem grandes custos diretos e indiretos com assistência à saúde<sup>2,3</sup>.

Os vírus são responsáveis por 50 a 90% das infecções do trato respiratório inferior em crianças pequenas<sup>4</sup>, sendo a maioria das infecções identificadas atribuída aos vírus: vírus respiratório sincicial humano (VRSH), vírus da parainfluenza humana (VPIH) I, II, e III, influenza A e B, adenovírus, e mais recentemente, o metapneumovírus humano (MPVH)<sup>5-8</sup>.

A fim de realizar a vigilância dos principais agentes responsáveis pela IRA e traçar seu perfil etiológico e epidemiológico, utilizamos um ensaio com reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) detectado pelo programa Genescan, que oferece a possibilidade de maior sensibilidade e de diagnósticos mais oportunos das infecções virais, demonstrando a possibilidade de resultados rápidos com sensibilidade equivalente ou maior que a detecção direta de antígeno ou isolamento viral para a detecção dos mesmos<sup>9,10</sup>.

## Métodos

### População-alvo

Este é um estudo prospectivo que incluiu crianças menores de 5 anos com doenças do trato respiratório inferior (DTRI) até 7 dias de seu início, admitidos à emergência, unidade de tratamento intensivo (UTI) ou alas pediátricas do Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. O HU oferece atendimento a estudantes e à população de baixa renda (mais ou menos 500.000 pessoas) das áreas adjacentes à universidade, sendo que quase 400 lactentes são admitidos todo ano no setor da clínica pediátrica para tratamento de DTRI. O período de estudo começou no dia 1º de janeiro e se estendeu até 30 de dezembro de 2003. A inclusão dos pacientes no estudo foi feita por um dos autores, após a assinatura do termo de autorização pelos pais. Ao exame clínico, o histórico do paciente, nível socioeconômico, sinais clínicos e diagnóstico à admissão foram registrados em um formulário padrão.

Os critérios de inclusão foram os seguintes: todas as crianças menores de 5 anos com DTRI apresentando um ou mais dos seguintes sintomas físicos: dispnéia (taxa de respiração > 50), retrações torácicas, sibilância, crepitação, estridor e cianose; além de alterações pulmonares no raio X (hiperinsuflação, condensação). Os critérios de exclusão foram: doença respiratória crônica (> 7 dias do início da DTRI); e pacientes atendidos no HU entre as 18h de sexta-feira e as 8h de segunda-feira, por razões operacionais.

## Coleta das amostras

O aspirado nasal foi obtido pela lavagem das narinas com solução fisiológica e pela coleta do mesmo em um frasco estéril até no máximo 24 h após o atendimento. Os protocolos e procedimentos para coleta das amostras foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ICB-USP. Todas as amostras foram mantidas a 4 °C e levadas ao laboratório em até 2 h após a coleta, para subsequente extração.

## Prevenção de contaminação cruzada (carryover)

Para reduzir a oportunidade de contaminação do fragmento amplificado, separamos o pré e os pós-ensaios em três salas diferentes, trocamos de luvas com frequência, pré distribuímos os reagentes em alíquotas e usamos múltiplos controles em cada lote de amostras testadas. Ponteiras equipadas com filtros de vedação foram usadas para a pipetagem dos reagentes e todas as áreas e equipamentos foram descontaminados com hipoclorito de sódio antes e depois da pipetagem. Além disso, a análise pelo GeneScan reduziu ainda mais o risco de contaminação ao permitir a detecção sensível de fragmentos amplificados, sem os riscos inerentes à técnica de nested PCR<sup>11</sup>.

## Extração do ácido nucléico

As alíquotas (250 µl) de cada amostra foram colocadas em um tubo, cada um com 750 µl de trizol-LS (Invitrogen) e congeladas a -70 °C até o momento da extração. A extração total do RNA/DNA seguiu as instruções do fabricante do Trizol. Os extraídos de ácido nucléico foram diluídos com 50 µl de água livre de nuclease UltraPure (Gibco-BRL) contendo inibidor de RNase (RNA guard-Applied Biosystems) em uma concentração final de ~1 unidade/µl. Os extraídos foram imediatamente testados por RT-PCR ou armazenados a -70 °C.

## Primers

Foram utilizados primers de oligonucleotídeos previamente descritos na literatura para VRSH, VPIH I, II, e III, influenza A e B, adenovírus e MPVH<sup>9,12,13</sup> (Tabela 1). Para a análise por GeneScan, a fita (*strand*) positiva de cada conjunto de primer foi marcada no extremo 5' com fluorescência 6-carboxifluoresceína (6-FAM).

## RT-PCR

Os ensaios com RT-PCR foram desenvolvidos com o kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems). Para cada amostra, foram preparadas reações de 100 µl adicionando-se 50 µl de RNA extraído a 50 µl de água livre de nuclease contendo solução tampão RT 1 x, mistura dNTP 1 x, 2,5 U/µl de transcriptase reversa Multiscribe e Random primers 1 x, sendo as mesmas distribuídas em tubos de 0,2 mL. A ciclagem térmica foi realizada no termociclador MicroAmp 9600 (Applied Biosystems) programado para 25 °C por 10 min e 37 °C por 120 min.

**Tabela 1** - Painel do ensaio de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa com primers específicos para cada vírus respiratório

Vírus	Primer	Gene	Polaridade	Seqüências (5' > 3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
VRSH	RSVAB-F1-FAM	F	+	AACAGTTTAAACATTACCAAGTGA	380
	RSVAB-R1		-	TCATTGACTTGAGATATTGATGC	
VPIH1	HPIV1-F1-FAM	HN	+	CCGGTAATTTCTCATACTATG	317
	HPIV1-R1		-	CCTTGGAGCGGAGTTGTTAAG	
VPIH2	HPIV2-F1-FAM	HN	+	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT	203
	HPIV2-R1		-	GCCCTGTTGATTTGGAAGAGA	
VPIH3	HPIV3-F1-FAM	HN	+	ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT	102
	HPIV3-R1		-	TAAATCTTGTTGTTGAGATTGA	
Influenza A	FLUA-F1-FAM	NS1	+	CTAAGGGCTTTCACCGAAGA	192
	FLUA-R1		-	CCCATTCTCATTACTGCTTC	
Influenza B	FLUB-F1-FAM	NS1	+	ATGGCCATCGGATCCTCAAC	241
	FLUB-R1		-	TGTCAGCTATTATGGAGCTG	
Adenovírus	ADENO-F1-FAM	Hexon	+	CCC(AC)TT(CT)AACCACCACCG	167
	ADENO-R1		-	ACATCCTT(GCT)C(GT)GAAGTTCCA	
MPVH	MPVF-F1-FAM	F	+	GAGCAAATTGAAAATCCCAGACA	347
	MPVF-R1		-	GAAAAC TGCCGCACAACATTTAG	

### PCR de triagem

O ensaio de amplificação foi realizado separadamente (não multiplex). Para cada amostra, 3 µl de cDNA foram distribuídos em uma coluna da placa de 96 poços contendo solução tampão 1 x PCR, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 25 pM de cada conjunto de primers e água Ultrapure para 25 µl de volume final. Cada fileira da placa compreendia primers para um vírus diferente, sendo que a última incluiu primers para o adenovírus, entretanto em vez de cDNA, o DNA extraído foi aplicado a essa fileira. A ciclagem térmica foi 94 °C por 2 min para desnaturação; 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min e 72 °C por 1 min para a amplificação; e 5 min a 72 °C para a extensão final do fragmento amplificado. Um isolado clínico do VRSH (fornecido por Dean Erdman, CDC, Atlanta) foi usado como controle positivo de extração e reação de PCR, enquanto que o PBS estéril foi usado como controle negativo em cada placa de reação.

### Análise pelo GeneScan (GS)

Após a RT-PCR, os produtos amplificados de cada amostra (coluna da placa) foram misturados em um pool e purificados com etanol para remover o excesso de sal. Um microlitro do produto de amplificação purificado foi transferido para os tubos de seqüenciamento (Applied Biosystems) contendo 12 µl de formamida deionizada (Applied Biosystems) e 0,5 µl de DNA Ladder ROX 50-500 de tamanho interno padrão (Applied Biosystems), desnaturado a 90 °C por 5 min e resfriado em gelo. A análise do fragmento amplificado foi então realizada em um analisador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems) usando o software GeneScan (versão 3.1.2), com eletroforese em capilar de 47 cm com polímero

POP-4<sup>TM</sup>. Os eletroferogramas foram examinados e as amostras com picos de fragmentos amplificados discrepantes em ≤ 1 nt do respectivo pico de controle positivo foram consideradas positivas.

### Análise estatística

Os resultados foram comparados através do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar as medidas contínuas ou ordinais. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

### Resultados

#### Pacientes

Neste estudo, foram incluídos 336 pacientes. A distribuição dos pacientes de acordo com o local de atendimento foi de 32% para UTI, 61,2% para a emergência e de 6,8% para a ala pediátrica. A idade das crianças variou de 18 dias a 4,6 anos, com mediana de idade de 5 meses, sendo 56,5% pacientes masculinos e 43,5% pacientes femininos. Os sintomas respiratórios mais comuns foram tosse (86%), febre (69%), rinite (42,1%) e sibilância (38,9%). Os diagnósticos clínicos à admissão foram de pneumonia (64%), bronquiolite (30,9%) e otite média aguda (4,3%).

#### Amostras clínicas

Todas as 336 amostras foram testadas pela RT-PCR seguida de GeneScan, dessas, 149 (54,4%) amostras foram negativas e 187 (55,6%) amostras foram positivas para pelo menos um dos vírus respiratórios incluídos no teste. O VRSH foi detectado em 81 (24,1%) de todas as amostras, o MPVH foi detectado em 60 (17,8%), VPIH3 em 28 (8,3%), adenovírus em 23 (6,8%), o vírus influenza tipo A em 17 (5%) e o

**Tabela 2** - Resultados totais das infecções simples e coinfeções

	<b>VRSH</b>	<b>MPVH</b>	<b>VPIH3</b>	<b>Adenovírus</b>	<b>Infl A</b>	<b>VPIH 1</b>	<b>TOTAL</b>
VRSH	<b>68</b>	05	02	02	03	01	81
MPVH	05	<b>49</b>	01	04	01	-	60
VPIH3	02	01	<b>20</b>	04	01	-	28
Adenovírus	02	04	04	<b>13</b>	-	-	23
Influenza A	03	01	01	-	<b>12</b>	-	17
VPIH1	01	-	-	-	-	<b>01</b>	02

\* Número de amostras contendo cada conjunto de vírus (linha x coluna). Infecções simples em negrito. Infl A = vírus influenza A; MPVH = metapneumovírus humano; VPIH1 = parainfluenza humana I; VPIH3 = parainfluenza humana III; VRSH = vírus respiratório sincicial humano.

VPIH1 foi detectado em 2 (0,6%) amostras. O VPIH e o vírus influenza tipo B não foram detectados no presente estudo. Os resultados totais são apresentados na Tabela 2.

### **Detecção simultânea de dois vírus**

Infecção viral dupla foi detectada em 24 amostras (7,1% do total ou 12,8% das amostras positivas). A detecção do produto amplificado do VRSH ocorreu juntamente com o VPIH1 (uma vez), VPIH3 (duas vezes), adenovírus (duas vezes), vírus influenza A (três vezes) e o MPVH (cinco vezes). Infecções duplas envolvendo o MPVH foram detectadas juntamente com o VPIH3 (uma vez), com o vírus influenza A (uma vez), e com o adenovírus (quatro vezes). Além disso, o VPIH3 foi detectado com o vírus da influenza A (uma vez) e com o adenovírus (quatro vezes).

### **Dados epidemiológicos x tipo de vírus**

Quando os sintomas físicos e o diagnóstico clínico foram comparados com o tipo de vírus, não houve nenhuma associação significativa; tanto as infecções simples como as coinfeções apresentaram mais freqüentemente pneumonia, seguido de bronquiolite, sibilância e otite. O maior percentual de pneumonia ocorreu entre pacientes com adenovírus (88,9%), bronquiolite no VRSH (54%), sibilância no MPVH (16,7%) e otite nos pacientes com vírus influenza (18,2%). Quando o sexo dos pacientes foi comparado com a etiologia, nenhuma associação significativa foi encontrada; sendo 55% dos pacientes positivos do sexo masculino e 45% do sexo feminino. A análise da etiologia de acordo com a distribuição de idade demonstra que o maior número de casos positivos ocorre em lactentes com menos de 1 ano de idade (75%); as medianas das idades dos pacientes relacionadas ao tipo de vírus detectado foram: 4 meses para o VRSH; 4,5 meses para o MPVH; 5 meses para o VPIH; 7 meses para o adenovírus; 8 meses para o vírus influenza e 6,5 meses para as coinfeções.

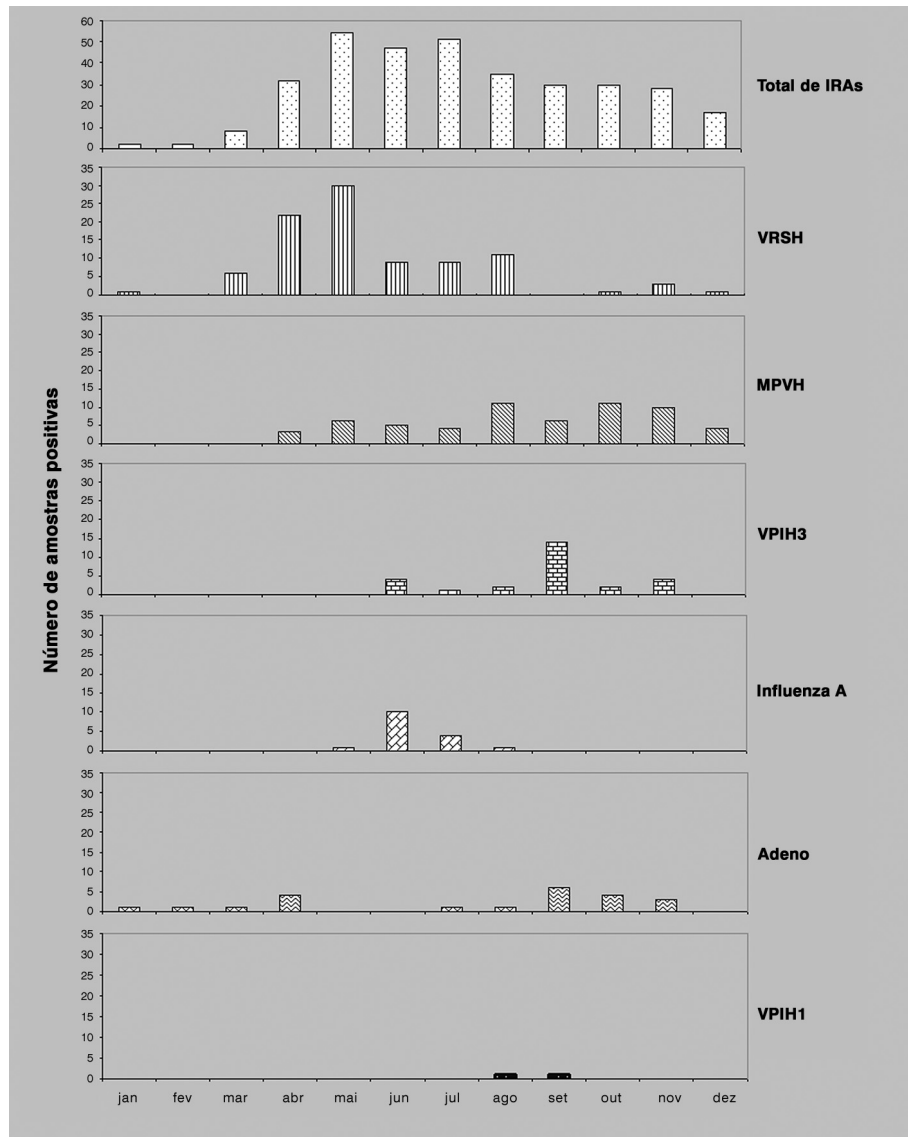
### **Sazonalidade dos vírus respiratórios**

Considerando a data de coleta das amostras, conseguimos obter um gráfico para o número de amostras positivas para cada vírus estudado de acordo com o mês do ano, mostrando a sazonalidade da maioria dos vírus respiratórios durante o ano de 2003 (Figura 1).

### **Discussão**

Este estudo apresentou um conhecimento inicial acerca da etiologia da IRA em crianças admitidas no HU. O VRSH foi a causa mais comum de IRA detectada em 43,3% das amostras positivas (68 das infecções simples e 13 das infecções duplas), seguidas do MPVH descoberto recentemente detectado em 32,1% das amostras positivas (49 das infecções simples e 11 das infecções duplas). Outros estudos revelaram que a incidência do MPVH pode variar a cada ano, às vezes competindo com ou excedendo a incidência do VRSH<sup>13,14</sup>. O VRSH tem uma distribuição mundial, com surtos anuais, com um padrão regular e geralmente previsível. Em climas temperados, o VRSH causa epidemia anual durante os meses de inverno<sup>15</sup>, enquanto que os dados epidemiológicos das regiões tropicais demonstraram uma associação entre os surtos de VRS e a época de chuvas<sup>17</sup>. O Brasil é um país muito extenso com cinco regiões geográficas, cada uma com características climáticas peculiares. São Paulo está localizado no sudeste do Brasil e apresenta clima subtropical. Nossos dados mostram que aqui, os surtos de VRSH começam no final do outono ou no início do inverno, com picos em maio e com duração de 5 meses. Nos surtos epidêmicos de VRSH foi observado um padrão dependente da temperatura e nenhuma associação com precipitação pluviométrica, com picos nos meses mais frios do ano. Esse padrão dos surtos de VRSH é semelhante àquele observado por outros autores<sup>18,19</sup> e àquele observado nos países sul-americanos do extremo sul como Chile, Uruguai e Argentina<sup>20-22</sup>. Embora os sintomas clínicos dos pacientes positivos para MPVH sejam parecidos com os sintomas provocados pelo VRSH, a distribuição do MPVH ao longo do ano foi bastante diferente daquela do VRSH. Nossos dados mostraram que os surtos de MPVH ocorreram durante o outono, inverno e primavera, com a maioria dos casos positivos na primavera. Esses achados são semelhantes àqueles obtidos por Galiano et al.<sup>23</sup>, que detectaram uma freqüência maior de MPVH durante a primavera, mas nossas conclusões são limitadas pelo período de coleta de dados (1 ano). O verdadeiro padrão temporal da infecção por MPVH precisa ser determinado em estudos realizados em períodos mais longos de tempo.

Dentre os vírus de parainfluenza, os mais detectados foram o tipo 3, encontrados em 28 amostras (8,3% do total



Adeno = adenovírus; DTRI = doenças do trato respiratório inferior; IRAs = infecções respiratórias agudas; MPVH = metapneumovírus humano; RT-PCR = reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa; VPIH1 = parainfluenza humana I; VPIH3 = parainfluenza humana III; VRSH = vírus respiratório sincicial humano.

**Figura 1** - Número total de pacientes com DTRI atendidos no Hospital Universitário durante o ano de 2003 e o número de amostras positivas pela RT-PCR seguida pelo GeneScan, provenientes destes, de acordo com o mês do ano

de amostras). O VPIH tipo 2 não foi detectado e o tipo 1 foi detectado em apenas duas amostras. Na literatura, o tipo 3 é o mais freqüente dentre os VPIHs e o tipo 1 e 2 não foram detectados ou foram detectados em apenas algumas amostras<sup>24,25</sup>. As duas amostras positivas de VPIH1 foram coletadas no inverno, bem como as amostras positivas de VPIH3, que tiveram seu pico de incidência no final do inverno, imediatamente após o valor baixo dos picos de VRSH e MPVH.

O vírus influenza B não foi detectado e o vírus influenza A foi detectado em 17 amostras, a maioria coletada no final do outono/início do inverno. Esses resultados estão de acordo com os estudos de vigilância feitos pelo Centro de Controle e

Prevenção de Doenças (CDC), que indicaram que 99,8% dos vírus influenza isolados foi do tipo A e 0,2% foi do tipo B<sup>26</sup>.

Para concluir o perfil epidemiológico dos principais vírus respiratórios em 2003, o adenovírus foi observado ao longo de todo o ano em 23 amostras (6,8% do total de amostras), com pequenos picos no início do outono e da primavera.

Os resultados apresentados aqui indicam a viabilidade de se utilizar um painel de RT-PCR para a detecção do RNA contido nos patógenos virais, em estudos de monitoramento. Por meio dessa técnica, conseguimos detectar os oito patógenos mais comuns do trato respiratório em um dia de trabalho,

demonstrando que esse método é bastante adequado para estudos epidemiológicos, bem como para estudos microbiológicos rápidos na prática clínica.

Um dos objetivos do nosso estudo foi fornecer dados basais, que as autoridades sanitárias podem considerar para planejamentos de vigilância de longo prazo. Além disso, uma outra possível vantagem da utilização desse método consiste em sua habilidade de detectar infecção dupla. Atualmente, a frequência relatada das infecções respiratórias duplas varia consideravelmente e a importância de tal infecção permanece sem resolução<sup>27,28</sup>. Neste estudo, as infecções múltiplas foram observadas em 24 pacientes, ou seja, as infecções virais duplas foram detectadas em 7,1% do total de amostras ou 12,8% das amostras positivas. A taxa de infecções múltiplas está acima daquela observada na literatura, podendo ser justificada pela maior sensibilidade do painel de PCR baseado em técnicas fluorescentes quando comparadas com a detecção direta de antígeno ou isolamento do vírus<sup>10,29</sup> e pelo maior número de vírus respiratórios incluídos nesse teste. A análise de distribuição das idades de acordo com a infecção viral mostra que o maior número de casos positivos, sejam infecções simples ou coinfeções, ocorre em lactentes menores de 1 ano, confirmando os achados da literatura internacional<sup>2,5</sup>.

Quando os sintomas físicos e o diagnóstico clínico foram comparados com a etiologia, nenhuma associação foi estabelecida; portanto, é impossível saber o tipo de vírus com base apenas nos sinais clínicos; entretanto, uma taxa relativamente maior de pneumonia foi encontrada em pacientes com adenovírus e VPIH (88,9% e 75% respectivamente), bem como bronquiolite em pacientes com VRSH e MPVH (54% e 27,8% respectivamente). Além disso, não houve uma associação significativa entre o sexo dos pacientes e etiologia viral. O principal objetivo deste estudo não foi a análise clínica das infecções; portanto, o diagnóstico considerado foi aquele feito à admissão e não o definitivo, sendo inadequado para a associação entre o diagnóstico definitivo e etiologia viral.

Nossos resultados corroboram os dados que indicam que o VRS e o MPVH encontram-se entre os agentes mais importantes da IRA em pediatria. O período epidêmico das infecções respiratórias observadas em São Paulo pode ser útil para o planejamento e implementação de algumas estratégias de prevenção. Estudos longitudinais devem ser realizados a fim de confirmar os resultados obtidos nesse estudo de curta duração. Estratégias eficientes, tais como controle de infecções hospitalares por vírus respiratórios, o uso de terapia antiviral e o uso mais racional de antibióticos na IRA viral, podem ser um entre vários benefícios gerados por estudos longitudinais dos aspectos clínicos e epidemiológicos dessas infecções.

## Referências

- Hinman AR. [Global progress in infectious disease control](#). *Vaccine*. 1998;16: 1116-21.
- Girard MP, Cherian T, Pervikov Y, Kieny MP. [A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections](#). *Vaccine*. 2005;23: 5708-24.
- United Nations Children's Fund. *Pneumonia: 3.5 million deaths. The state of the world's children*. United Nations Children's Fund, 1993. Oxford: Oxford University; 1992.
- Glezen WP, Loda FA, Clyde WA, Senior RJ, Sheaffer CI, Conley WG, et al. [Epidemiologic patterns of acute lower respiratory disease of children in a pediatric group practice](#). *J Pediatr*. 1971;78: 397-406.
- Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. [Epidemiological and clinical features of HMPV, RSV and RVs infections in young children](#). *J Clin Virol*. 2007;38: 221-6.
- Miyao CR, Gilio AE, Vieira SE, Hein N, Pahl MM, Betta SL, et al. [Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior](#). *J Pediatr (Rio J)*. 1999;75: 334-44.
- Pitrez PM, Stein R, Stuermer L, Macedo IS, Schmitt VM, Jones MH, et al. [Bronquiolite aguda por rinovírus em lactentes jovens](#). *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81: 417-20.
- Fan J, Henrickson KJ, Savatski LL. [Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay \(Hexaplex\)](#). *Clin Infect Dis*. 1998;26: 1397-402.
- Erdman DD, Weinberg GA, Edwards KM, Walker FJ, Anderson BC, Winter J, et al. [GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness](#). *J Clin Microbiol*. 2003;41: 4298-303.
- Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, et al. [Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children](#). *J Infect Dis*. 2004; 189: 706-10.
- Garenne M, Ronsmans C, Campbell H. [The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries](#). *World Health Stat Q*. 1992; 45: 180-91.
- Xu W, Erdman DD. [Type-specific identification of human adenovirus 3, 7, and 21 by a multiplex PCR assay](#). *J Med Virol*. 2001;64:537-42.
- Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. [Human metapneumovirus infections in young and elderly adults](#). *J Infect Dis*. 2003;187: 785-90.
- Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, et al. [Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy](#). *J Clin Microbiol*. 2003;41: 2987-91.
- Collins PL, McIntosh K, Chanock RM. *Respiratory syncytial virus*. In: Fields BN, editor. *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 1313-52.
- Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. [Respiratory syncytial virus infection in developing countries](#). *Trop Med Int Health*. 1998;3: 268-80.
- Loscertales MP, Roca A, Ventura PJ, Abacassamo F, Dos Santos F, Siatube M, et al. [Epidemiology and clinical presentation of respiratory syncytial virus infection in a rural area of Southern Mozambique](#). *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21: 148-55.

18. Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Török TJ, Anderson LJ, et al. [Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil](#). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001;43:125-31.
19. Riccetto AG, Ribeiro JD, Silva MT, de 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*. 2006;10: 357-61.
20. Russi JC, Delfraro A, Arbiza JR, Chiparelli H, Orvell C, Grandien M, et al. [Antigenic characterization of respiratory syncytial virus associated with acute respiratory infection in Uruguayan children from 1985 to 1987](#). *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 1464-6.
21. Avendaño LF, Larrañaga C, Palomino MA, Gaggero A, Montaldo G, Suarez M, et al. [Community-and hospital-acquired respiratory syncytial virus infections in Chile](#). *Pediatr Infect Dis J*. 1991; 10:564-8.
22. [Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina](#). *J Med Virol*. 2000;61:76-80.
23. Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarría M, Carballal G. [Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina](#). *J Med Virol*. 2004;72:299-303.
24. Gröndahl B, Puppe W, Hoppe A, Kuhne I, Weigl JA, Schmitt HJ. [Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study](#). *J Clin Microbiol*. 1999; 37:1-7.
25. Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J. [Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children](#). *J Clin Microbiol*. 2001;39: 1696-701.
26. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Update: Influenza Activity: United States, 1999-2000 season](#). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2000;49:173-7.
27. König B, König W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. [Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age](#). *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 4632-5.
28. Osioy C. [Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay](#). *J Clin Microbiol*. 1998;36: 3149-54.
29. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. [Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses](#). *J Virol Methods*. 2005;126:53-63.

Correspondência:

Luciano Matsumiya Thomazelli  
Av. Professor Lineu Prestes, 1374, ICB2, Laboratório de Virologia  
CEP 05508-000 – São Paulo, SP  
Tel.: (11) 3091.7293  
Fax: (11) 3091.7354  
E-mail: lucmt@usp.br