



UNICAMP

EMERSON RODRIGUES DA SILVA

**INFECÇÃO GRAVE DO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR EM
CRIANÇAS MENORES DE 3 ANOS: ETIOLOGIA VIRAL E
CODETECÇÃO COMO FATORES DE RISCO**

CAMPINAS

2013

EMERSON RODRIGUES DA SILVA

**INFECÇÃO GRAVE DO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR EM
CRIANÇAS MENORES DE 3 ANOS: ETIOLOGIA VIRAL E
CODETECÇÃO COMO FATORES DE RISCO**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente na área de concentração em Pediatria.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ DIRCEU RIBEIRO
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO TETELBOM STEIN

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO EMERSON RODRIGUES
DA SILVA E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ DIRCEU
RIBEIRO

Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38i Silva, Emerson Rodrigues da, 1972-
Infecção grave do trato respiratório inferior em
crianças menores de 3 anos : etiologia viral e co-
detecção como fatores de risco / Emerson Rodrigues da
Silva. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : José Dirceu Ribeiro.
Coorientador : Renato Tetelbom Stein.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sistema respiratório. 2. Virologia. 3. Infectologia. I.
Ribeiro, José Dirceu, 1952-. II. Stein, Renato Tetelbom.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers :
viral etiology and co-detection as risk factors

Palavras-chave em inglês:

Respiratory system

Virology

Infectious disease medicine

Área de concentração: Pediatria

Titulação: Doutor em Saúde da Criança e Adolescente

Banca examinadora:

José Dirceu Ribeiro [Orientador]

Adyléia Aparecida Dalbo Contrera Toro

Paulo Augusto Moreira Camargos

Paulo José Cauduro Maróstica

Lessandra Michelim

Data de defesa: 22-11-2013

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

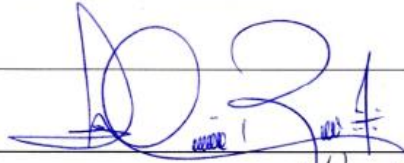
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

EMERSON RODRIGUES DA SILVA

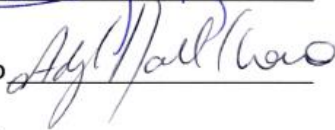
Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOSÉ DIRCEU RIBEIRO

MEMBROS:

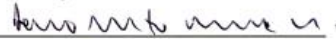
1. PROF(A). DR(A). JOSÉ DIRCEU RIBEIRO



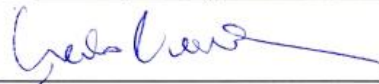
2. PROF(A). DR(A). ADYLÉIA APARECIDA DALBO CONTRERA TORO



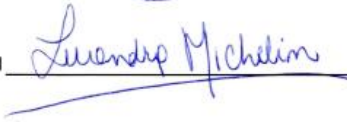
3. PROF(A). DR(A). PAULO AUGUSTO MOREIRA CAMARGOS



4. PROF(A).DR(A). PAULO JOSÉ CAUDURO MAROSTICA



5. PROF(A).DR(A). LESSANDRA MICHELIM



Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 22 de novembro de 2013

RESUMO

Introdução: A infecção do trato respiratório inferior (ITRI) é uma das principais causas de morbimortalidade em crianças, principalmente em países em desenvolvimento e em crianças menores de 3 anos de idade. Os vírus estão entre os principais agentes etiológicos das ITRI em crianças. No entanto, poucos estudos até o momento investigaram o impacto dos vírus respiratórios em populações de crianças de países em desenvolvimento e de que maneira as codeteccões de dois ou mais vírus modificam a gravidade das infecções.

Objetivo: identificar quais vírus respiratórios causam ITRI em lactentes e crianças até 3 anos de idade hospitalizadas e qual o impacto das codeteccões virais sobre a gravidade destes episódios.

Métodos: crianças de até 3 anos de idade internados em um hospital terciário no Brasil durante os meses de alta prevalência de vírus respiratórios tiveram amostras coletadas de aspiração nasofaríngea. Estas amostras foram testadas para 13 diferentes vírus respiratórios através de PCR em tempo real (RT-PCR). Os pacientes foram acompanhados durante a internação, e dados clínicos e das características da população foram registradas durante esse período e na alta para avaliar marcadores de gravidade, como tempo de internação e uso de oxigênio. Foi usada análise univariada para identificar potenciais fatores de risco e a regressão logística multivariada para determinar o impacto de detecções virais específicas sobre os

desfechos, bem como para avaliar o efeito das codeteccões sobre estes mesmos desfechos.

Resultados: Foram analisados 260 episódios de ITRI com uma taxa de detecção viral de 85% (n = 222). Codeteccão foi observada em 65% de todos os episódios de vírus-positivos. O vírus foi mais prevalente Vírus Sincicial Respiratório (RSV) (54%), seguido por Metapneumovirus humano (hMPV) (32%) e Rinovírus humano (HRV) (21%). Nos modelos multivariados, lactentes com codeteccão de HRV + RSV permaneceram 4,5 dias a mais no hospital ($p = 0,004$), quando comparados ao grupo sem a codeteccão. A mesma tendência foi observada para o número de dias de uso de oxigênio suplementar.

Conclusões: Embora RSV permaneça como a principal causa da ITRI em crianças, mostrou-se um aumento no tempo de internação e uso de oxigênio em crianças com RSV e HRV codetectados por RT-PCR em comparação com aqueles com RSV mas sem HRV em codeteccão. Além disso, nosso estudo identificou um número significativo de crianças infectadas por vírus recentemente identificados, tais como hMPV e bocavirus Humano (HBoV), e este é um achado relevante para comunidades pobres de países em desenvolvimento.

ABSTRACT

Introduction: lower respiratory tract infection (LRTI) is a major cause of morbidity and mortality in infants and children, especially in developing countries and in children under 3 years old. Viruses are among the major etiologic agents of LRTI in children. However, few studies to date have investigated the impact of respiratory viruses in populations of children in developing countries and how the co-detections of two or more viruses modify the severity of infections.

Objective: To identify respiratory viruses in infants and children up to 3 years of age hospitalized due to LRTI and verify the impact of viral co-detections on the severity of these episodes.

Methods: Children less than 3 years of age admitted to a tertiary hospital in Brazil during the months of high prevalence of respiratory viruses had collected samples of nasopharyngeal aspirate. These samples were tested for 13 different respiratory viruses by real-time PCR (RT-PCR). Patients were followed during hospitalization, and clinical and population characteristics were recorded during this period and at discharge to assess markers of severity, such as length of stay and use of oxygen. Univariate analysis was used to identify potential risk factors and multivariate logistic regression was used to determine the impact of specific viral detections on outcomes and to evaluate the effect of co-detections on these same outcomes.

Results: We analyzed 260 episodes of LRTI with an overall viral detection rate of 85% (n = 222). Co-detection was observed in 65% of all virus-positive episodes. The most prevalent virus was Respiratory Syncytial Virus (RSV) (54%), followed by human metapneumovirus (hMPV) (32%) and human rhinovirus (HRV) (21%). In multivariate models, infants with co-detection of HRV + RSV stayed 4.5 days longer in the hospital (p = 0.004), when compared to the group without this co-detection. The same trend was observed for the number of days using supplemental oxygen.

Conclusions: Although RSV remains the leading cause of LRTI in children, our study has shown an increase in the length of stay and use of oxygen in children with RSV and HRV co-detected by RT-PCR in comparison with those with RSV alone. Furthermore, our study identified a significant number of children infected by viruses recently identified, such as hMPV and Human bocavirus (HBoV), and this is an important finding for poor communities in developing countries.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
AGRADECIMENTOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	35
MÉTODOS	37
RESULTADOS.....	44
CONCLUSÕES	48
PERSPECTIVAS.....	50
ANEXOS	53
Anexo 1- Artigo publicado no periódico BMC Infectious Diseases.....	54
Anexo 2- Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido	63
Anexo 3 - Primers e probes usados na identificação viral.....	65
Anexo 4 - Questionário do Estudo	68
Anexo 5 - Questionário Pós-Alta Hospitalar	71
Anexo 6 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUC/RS	72
Anexo 7 - Licença de Publicação.....	73
BIBLIOGRAFIA	79

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Stein, por seus múltiplos papéis assumidos ao longo dos anos: *expert*, idealizador, tutor, amigo. Mas, sobretudo, por sua generosidade ao mostrar que o verdadeiro mestre é aquele que não põe limites ao desenvolvimento (e à felicidade) do aluno.

Ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro por sua ajuda, orientação e paciência. Sempre acreditando nos seus orientandos com estímulos precisos e fundamentais.

Ao Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez, que além de referência como pesquisador e cientista, é ao mesmo tempo modelo inspirador e grande amigo.

A Prof^a. Dr^a. Rita Mattiello e ao Dr. Edgar Sarria pelo esforço renitente que empreenderam na minuciosa análise dos dados.

Aos Profs. Dr. Otávio Cintra e Eurico Arruda pela ajuda e conhecimento que colocaram neste projeto.

A todas as pessoas que trabalharam no estudo, desde os bolsistas de iniciação científica, enfermeiras, técnicas de enfermagem, auxiliares de bancada e colegas médicos, sem os quais o projeto não haveria sido executado.

À FAPESP por viabilizar meu crescimento em uma Universidade como a UNICAMP.

Aos pacientes sujeitos da pesquisa e seus familiares por confiarem e compreenderem que a ciência só avança com desprendimento e altruísmo.

LISTA DE ABREVIATURAS

CO₂	Dióxido de Carbono
HAI	Teste de inibição da hemoaglutinação
HBoV	Bocavírus Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
hMPV	Metapneumovírus Humano
HRV	Rinovírus Humano
IRTI	Infecção Respiratória do Trato Inferior
O₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR-RT	Reação da Polimerase em Cadeia - Transcriptase Reversa
RSV	Vírus Respiratório Sincicial
FR	Frequência respiratória

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

As infecções do trato respiratório inferior (ITRI) são uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo entre crianças até 3 anos de idade. Estima-se que cerca de um quinto das mortes em crianças abaixo dos 5 anos de idade se deva à IRTI e que o impacto da doença seja maior em países em desenvolvimento, com maior letalidade nas crianças acometidas destes países.(1) Segundo dados publicados em 2010, no ano de 2005 ocorreram 33,8 milhões de mortes em crianças menores de 5 anos de idade por ITRI causadas pelo RSV.(2) As ITRI são caracterizadas pelos sinais de infecção do trato respiratório superior mais outros sinais específicos do acometimento do trato respiratório inferior. Assim, a definição na maioria dos trabalhos encontrados se dá pela presença de coriza, obstrução nasal, tosse, espirros, hiperemia de orofaringe (com ou sem febre) associados à dispneia, taquipneia, batimento de aleta nasal, retrações intercostais, prolongamento do tempo expiratório, estertores e/ou sibilos.(3) Outros sinais descritos na literatura, mas menos frequentemente usados para definição de ITRI são retrações cervicais e subcostais, cianose e tórax silencioso, que ocorre devido à redução marcada da entrada de ar nos pulmões.(3) Embora a caracterização sindrômica de ITRI seja relativamente fácil, mais complicada é a classificação específica adotada por muitos serviços, que fazem a distinção entre os termos "bronquite", "bronquiolite" e "pneumonia viral". Essa distinção se baseia principalmente no segmento de via aérea mais acometida pela infecção (se predominantemente proximal – vias aéreas calibrosas; predominantemente distal – porção condutora; e predominantemente alveolar). No entanto, na maioria dos casos clínicos essa distinção acaba sendo arbitrária e, em certo

sentido, irrelevante, uma vez que as opções terapêuticas disponíveis são basicamente as mesmas em todos os tipos de definição.(4)

O tratamento das ITRI depende do grau de acometimento causado pelo agente etiológico. Vários fatores concorrem para determinar a gravidade. Fatores específicos do sorotipo do agente infectante, a resposta inflamatória (e variáveis anatômicas) de cada paciente e a maturidade do trato respiratório são os principais fatores que determinam o grau de comprometimento da infecção. Geralmente, a gravidade das ITRI é maior em pacientes menores de 6 meses de vida.(5) O tratamento das ITRI depende diretamente do grau de comprometimento das vias aéreas e do pulmão afetado. A grande maioria dos pacientes com infecção viral de vias aéreas apresentam apenas sinais de comprometimento de via aérea alta e geralmente não necessitam mais do que medicação sintomática e medidas de higiene nasal, hidratação e repouso. No entanto, aqueles pacientes que apresentam comprometimento de via aérea baixa irão demandar mais ou menos cuidado na medida em que as avaliações da saturação de O₂, dos gases arteriais e dos sinais clínicos indicarem sofrimento ventilatório e exaustão, que são sugeridos por aumento da pressão arterial de CO₂, acidose respiratória e redução do esforço ventilatório. Uma vez que poucas drogas antivirais são usadas no combate a infecções respiratórias comuns, o tratamento da maioria destas infecções é sintomática, à semelhança das infecções respiratórias do trato respiratório superior. Nos casos onde a internação é necessária, a principal medida instituída é o uso de oxigênio suplementar, que é administrado de várias formas, dependendo da gravidade e do grau de hipoxemia. Outras medidas como suplementação hídrica e correção dos desequilíbrios eletrolíticos são necessárias em uma parcela menor dos casos. Alguns poucos pacientes necessitam

de suporte ventilatório mais agressivo, com uso de altas concentrações de oxigênio, inalação com solução salina hipertônica(6) e até ventilação mecânica.(7)

Vários fatores de risco são classicamente associados ao aumento da gravidade das IRTI: pouca idade, baixo peso ao nascer, prematuridade, tabagismo passivo, restrição ao aleitamento materno, imunizações incompletas, baixo nível socioeconômico e grande aglomeração.(2, 8) Além destes fatores de risco clássicos, também vem sendo estudado o papel da poluição ambiental sobre as IRTI. Vários estudos epidemiológicos mostram um aumento na incidência de infecções respiratórias, tanto em ambientes com níveis constantes de poluição(9), quanto em locais sujeitos a picos de poluição do ar.(10) Uma metanálise que incluiu 8 estudos mostrou um aumento de até três vezes no número de infecções respiratórias em crianças expostas a queima de biomassa.(11) Várias hipóteses são levantadas para explicar a relação entre poluição e infecção respiratória: aumento do estresse oxidativo, redução da atividade de macrófagos, redução da expressão e alteração da função de proteínas surfactantes.(12) Embora o estudo destes fatores de risco tenham sido estudados mais extensivamente em países desenvolvidos, vários destes fatores ocorrem também em países em desenvolvimento como o Brasil, o que justifica a busca pela melhor compreensão destas infecções também em um cenário local.

Além dos fatores de risco já conhecidos, várias comorbidades pioram o prognóstico das ITRI, como desnutrição, doença cardiovascular, infecção pelo vírus HIV e infecções nosocomiais.(13) Dentre as comorbidades conhecidas, atualmente vem sendo dada muita atenção à diminuição da resposta imune na infecção viral, que parece ser também determinante do quadro clínico e do grau de severidade da infecção. Em 2012, Garcia et al mostraram uma redução na concentração de interferon- γ no lavado nasal nas

crianças infectadas com RSV que apresentavam maior gravidade. Houve também uma relação inversa na concentração de citocinas no mesmo aspirado com a gravidade tanto da infecção com RSV quanto com HRV.(14) O mesmo foi verificado quando se avaliou amostras de sangue para determinar a produção de citocinas em pacientes infectados com RSV. Aqueles internados em unidades de tratamento intensivo, portanto mais graves, apresentavam menores níveis séricos de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-8 (IL-8) quando comparados a crianças infectadas, mas internadas em unidades não-intensivas ou ao grupo controle de crianças hígdas.(15)

Além disso, a melhor compreensão do problema e o estudo dos agentes etiológicos permitem que se direcionem recursos e esforços para o desenvolvimento de tecnologias (como vacinas) que reduzam o número de infecções ao ano, reduzindo morbidade e mortalidade. Atualmente várias vacinas vêm sendo estudadas a fim de que se mostrem suficientemente atenuadas e ao mesmo tempo imunogênicas para que sejam usadas em larga escala.(2) Até que estas medidas de imunização ativa estejam largamente disponíveis, o estudo de cada agente etiológico e seu impacto torna-se fundamental para o entendimento da doença.

AGENTES ETIOLÓGICOS:

A grande parte das ITRI em crianças é causada por vírus. Embora muitas vezes não se possa definir com certeza qual agente envolvido, vários estudos no mundo todo apontam para o maior impacto das infecções virais. (1, 16-18) Sabe-se que a relação custo-benefício dos diagnósticos etiológicos de infecções respiratórias do trato respiratório

superior é bastante desfavorável à realização de exames complementares. A maioria destas infecções são autolimitadas e com taxas relativamente baixas de complicações. Nas IRTI, no entanto, muito tem se investigado acerca dos agentes envolvidos nas infecções, pois nesses casos os desfechos podem ser mais graves e as comorbidades mais frequentes. Além disso, há evidências que demonstram a redução no uso de medicamentos antimicrobianos após o diagnóstico de tipo viral.(19, 20)

Essa detecção viral é especialmente importante em lactentes pequenos, abaixo de 6 meses, em prematuros ou em pacientes que apresentam outras comorbidades, como doença cardíaca de base, por exemplo. Esses pacientes, além de apresentarem maior risco de comorbidades, em alguns casos apresentam também indicação de terapêutica antiviral específica, como no caso do Influenza-A, por exemplo, que pode ser tratado com inibidores da neuraminidase em casos específicos.(21) A detecção viral também pode ser importante para planejar o controle das infecções nosocomiais. Um artigo recente não mostrou aumento na infecção viral hospitalar em pacientes mantidos em quarto com crianças detectadas com outros vírus. No entanto, este estudo, embora bem desenhado, conseguiu recrutar apenas 48 pacientes e a codetecção viral aconteceu em apenas 11 casos. O hRV, que parece aumentar a gravidade das IRTI, foi isolado em apenas 3 casos, limitando muito os achados.(22) Estudos clássicos mostram que a separação dos pacientes de acordo com o vírus respiratório isolado nas vias aéreas reduz a taxa de infecções nosocomiais, justificando, também assim, a realização destes estudos. (23, 24)

Além dos impactos evidentes sobre as ITRI, os vírus respiratórios são também a principal causa de várias condições do trato respiratório superior, como laringite, laringotraqueobronquite, bronquiolite e pneumonia, especialmente em crianças menores

de dois anos de idade.(21) Certas condições clínicas como a presença de cardiopatia (25), pneumopatia(25, 26) ou imunodepressão(27, 28) têm sido associadas com maior gravidade de infecções por vírus respiratórios comuns, como RSV, parainfluenza, influenza ou adenovírus.

As coinfeções bacterianas por germes atípicos como o *Mycoplasma pneumoniae* são postulados por alguns autores como sendo um fator de piora no prognóstico e na gravidade dos casos de ITRI. No entanto, a maioria dos artigos que mostram um percentual significativo de detecção de *Mycoplasma* incluem pacientes acima de 36 meses de idade.(29, 30) Um estudo realizado no Brasil com 190 crianças, mostrou que a idade média de crianças infectadas com micoplasma era significativamente mais alta do que a idade média das crianças infectadas com outros agentes e essa diferença era mais acentuada em crianças abaixo dos 9 meses de idade.(31) Esses dados são corroborados por um estudo de 2000, feito por um grupo de pesquisadores da Holanda que demonstraram que, quando tomados anos consecutivos, o impacto das infecções por *Mycoplasma* e *Chlamydia pneumoniae* em crianças abaixo de 4 anos era muito pequeno.(32) Como as crianças que fazem quadros respiratórios mais graves são aquelas com menos de 2 anos de idade, esses agentes parecem não ser tão importantes para mais análises nesta revisão. Já as infecções por *Streptococcus pneumoniae* parecem ser mais relevantes. Parece haver uma associação entre a detecção de HRV nas vias aéreas altas com doença invasiva pneumocócica.(33) Do mesmo modo, mais de 40% das crianças detectadas com RSV podem apresentar codetecção de bactérias como o pneumococo, o *Haemophilus influenzae* e a *Moraxella catarrhalis*.(34) Essas associações podem ser explicadas por evidências que mostram que a infecção viral

quebra barreiras naturais do epitélio respiratório, aumentando a entrada de bactérias.(35) Além disso, parecem haver alterações imunológicas que também contribuem para esse aumento nas coinfeções bacterianas. O vírus influenza, por exemplo, inibe a resposta neutrofílica, facilitando a proliferação bacteriana.(36) Outro dado importante é que a coinfeção bacteriana ocorre geralmente nos estágios finais da infecção viral, onde a resposta imune é mais fraca e o reconhecimento de patógenos é menor.(37)

Os agentes virais mais frequentemente envolvidos e detectados nas IRTI em crianças são o RSV, o Metapneumovírus Humano (hMPV), Influenza A e B e Rinovírus Humano (HRV).(4, 8, 16)

ESTUDOS DE VIROLOGIA

MÉTODOS

O isolamento dos tipos virais nas IRTI fornecem informações úteis não só no manejo agudo do paciente grave e exposto a comorbidades, mas também a atividades de planejamento e controle epidemiológico por parte de gestores da saúde. Até hoje, quatro modos diferentes de investigar a etiologia viral das IRTI foram usadas: a cultura viral, sorologias, a detecção antigênica ou imunofluorescência e os testes baseados na detecção de ácidos nucleicos virais. Contudo, essa investigação é limitada por vários aspectos. Em primeiro lugar, os modernos métodos de detecção viral são caros para execução em um grande número de pacientes. A maior parte dos estudos publicados até

hoje usou métodos mais baratos como a imunofluorescência.(38) Em segundo lugar, há a limitação de reagentes sorológicos capazes de identificar agentes etiológicos específicos ou marcadores como anticorpos que sejam confiáveis e passíveis de serem usados em larga escala.(38) Por fim, a maioria dos estudos atualmente baseia-se em coleta de secreção do trato respiratório para isolamento e detecção de DNA e RNA viral. Ocorre que essa secreção na maioria das vezes é obtida de lavado ou aspirado nasal simples. Em alguns poucos casos esse material é obtido de porções mais inferiores do trato respiratório, mas geralmente esta coleta é limitada a pacientes com comorbidades e que são submetidos a procedimentos invasivos como fibrobroncoscopia. Nos casos de coleta de material de vias aéreas superiores, é praticamente impossível determinar com razoável margem de certeza, se o agente etiológico isolado nas vias aéreas superiores é o mesmo que causa doença no trato respiratório inferior. Embora exista alguma dúvida a respeito do melhor método de coleta da secreção de vias aéreas, dois deles se destacam na literatura: o aspirado nasofaríngeo e o swab nasal e de garganta. Embora pareça haver alguma vantagem para o primeiro método, em especial em relação à sensibilidade da detecção do RSV em pacientes mais graves(39), estudos atuais e consistentes mostram que não há uma marcada superioridade de nenhum dos métodos que seja mais relevante.(40)

A cultura viral se baseia em infectar linhagens celulares com espécimes obtidos clinicamente. Tradicionalmente, infectavam-se ovos de galinha embrionados com três ou quatro linhagens celulares e aguardava-se o crescimento de novos vírus, que geralmente eram de influenza.(41) O grande inconveniente do método era a demora em apresentar resultado. Na maior parte dos casos, a cura completa acontecia antes mesmo de o

resultado ficar disponível para a equipe assistencial, o que se tornava um limitador para seu uso.

A seguir, foram desenvolvidos métodos de sorologia que procuravam identificar marcadores obtidos no sangue que pudessem indicar a etiologia das ITRI. Métodos como o teste de inibição da hemoaglutinação (HAI), teste de fixação do complemento e imunoensaio enzimático foram propostos, cada um com vantagens e desvantagens que os levaram a serem mais utilizados do que a cultura celular durante muito tempo. No caso específico do vírus influenza, o HAI foi capaz até de diferenciar a infecção pelos sorotipos 1 e 3.(41) Na década de 1990 com o uso de anticorpos monoclonais, o tempo de espera para obtenção de resultados de testes de sorologia caiu de cerca de 8 dias nos casos de cultura celular para aproximadamente 2 dias, aumentando então a utilidade da detecção viral. Após esse período, a imunofluorescência direta de secreção obtida por swab nasal ou por aspirado nasal foi por muito tempo o método de escolha para a realização de testes de identificação etiológica, fornecendo resultados em até 3 horas. Atualmente estes métodos estão sendo cada vez menos usados, em detrimento das modernas técnicas de detecção molecular.

Os métodos diagnósticos mais usados atualmente para a detecção de vírus em IRTI de crianças são a imunofluorescência indireta e a detecção da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) em crianças. A imunofluorescência tem a vantagem de ser um método mais barato e de mais fácil execução, o que o torna mais utilizado. No entanto, sua sensibilidade em detectar corretamente as crianças infectadas com vírus respiratórios é limitada e inferior à observada com o PCR.(42)

O PCR é o método atualmente mais aceito para a realização de estudos epidemiológicos (de painel viral) atualmente. Também é utilizado para detecção de vírus em secreções respiratórias em casos clínicos específicos, embora seu custo o torne limitado. Atualmente, as técnicas de detecção de ácidos nucleicos virais tem permitido a detecção simultânea de vários vírus respiratórios. Além disso, a sensibilidade destes exames é maior que os métodos tradicionais de imunofluorescência, mudando com isso a maneira como se pensa a incidência destas infecções virais. Em países desenvolvidos, os estudos de painel viral em secreções respiratórias de crianças já são bem conhecidos.(34,43)

DIFICULDADES E LIMITAÇÕES

Diversos estudos sobre etiologia e epidemiologia das infecções respiratórias agudas têm sido publicados, tanto baseados em dados colhidos na comunidade, quanto em hospitais. No entanto, estes estudos acabam diferindo significativamente em relação a seus resultados, em grande parte devido a limitações de ordem metodológica. Uma das dificuldades deste tipo de estudo está na não uniformização dos métodos de análise do material coletado. Alguns estudos ainda mostram resultados de imunofluorescência enquanto outros apresentam geralmente maior detecção viral por serem executados testes de detecção de ácidos nucleicos. Outra limitação destes estudos está no modo de recrutamento dos sujeitos de pesquisa: várias faixas de idade diferentes são estudadas e as variáveis estudadas também diferem em muitos casos. Além disso, os estudos de painel viral diferem também em relação aos vírus buscados em cada trabalho: em alguns

locais os pesquisadores optam por economizar custos reduzindo o número de vírus testados em cada painel. Também a sazonalidade se coloca como empecilho para investigar mais precisamente a incidência viral em ITRI; a cada ano há variações na incidência de um mesmo tipo viral.(2) Além disso, em anos específicos podem ocorrer surtos que mudam o impacto final de um vírus específico sobre o número total de ITRI. Um exemplo disto foi a epidemia de infecção respiratória causada pelo vírus Influenza H1N1 no inverno de 2009. Naquele ano, a mortalidade causada pelo influenza-A nos Estados do Sul e Sudeste do Brasil passou de cerca de 2,5/100.00 habitantes para quase 5/100.000 habitantes.(44)

Com o aumento da disponibilidade de métodos como PCR para detecção viral, outros problemas de interpretação acabaram sendo levantados. Embora a detecção de vírus nas vias aéreas possa chegar a até 95% dos casos de crianças com IRTI, ainda é difícil estabelecer uma relação direta de causalidade entre o isolamento do vírus na via aérea e a infecção.(45) Outro aspecto a ser levado em consideração nas limitações é a possibilidade de persistência de restos virais na via aérea causando resultados falso-positivos,(46) além da possibilidade de detecção viral com PCR em pacientes assintomáticos, onde o vírus não parece provocar doença.(47) Além disso, vários vírus apresentam diferentes taxas de persistência de restos virais. O RSV, por exemplo, raramente é isolado em pacientes assintomáticos, deixando poucos e fugazes restos virais na via aérea. Assim, considera-se que qualquer detecção de RSV em via aérea corresponda à infecção e não simples detecção.(48) Por outro lado, o HBoV parece ter comportamento distinto, mantendo restos virais na via aérea por muito tempo após o

período sintomático. Nesse caso, a quantificação da carga viral do HBoV é que determina com mais certeza o diagnóstico de infecção aguda.(49)

Outro aspecto relevante em relação aos estudos de detecção de vírus respiratórios por PCR é a diferença entre codetecção e coinfeção. Em vários estudos os termos são usados indistintamente, mas não sem controvérsia. Em uma definição mais rigorosa, coinfeção é o concurso de dois ou mais vírus causando, cada um, sinais e/ou sintomas clínicos; na codetecção, um dos vírus causa infecção e outro vírus é detectado pela simples presença de restos virais ou como colonização assintomática. Uma das estratégias propostas na literatura para determinar qual o vírus é o predominante nas codetecções é, assim como nas detecções de HBoV, quantificar a carga viral dos dois ou mais vírus isolados.(45) Infelizmente essa técnica ainda não é amplamente utilizada nos estudos.

Por fim, outro fator que dificulta a interpretação dos estudos de painel viral nas ITRI é a predominância de estudos que avaliam o impacto dos vírus em pacientes hospitalizados. Evidentemente esses pacientes são mais impactados pela doença, mas é provável que a real incidência dos vírus seja subestimada quando apenas são testadas crianças que internam ou que buscam serviço médico de referência.(50)

Numerosos estudos evidenciam a importância dos vírus como causa de infecção respiratória aguda(39, 50-52) e mostram que os vírus respiratórios que circulam em regiões tropicais e países em desenvolvimento são os mesmos que circulam em zonas subtropicais e países desenvolvidos.(53) No entanto, parece haver variações relevantes mesmo dentro de mesmos países em relação ao percentual de infecções causados por

cada vírus.(44, 54) O entendimento destas variações e do perfil epidemiológico das IRTI em um país é essencial não só para a auxiliar a tomada de decisões clínicas mas também para o planejamento da vigilância em saúde e para os gestores de serviços. Do mesmo modo, conhecer os principais vírus causadores de IRTI, sua agressividade e sazonalidade e seu comportamento quando associado a outro vírus também é necessário e relevante.

AGENTES VIRAIS

VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL

O principal agente etiológico isolado de IRTI é o vírus respiratório sincicial humano (RSV), mais notadamente em crianças menores de um ano de idade.(55) Estima-se que no ano de 2005, 3,4 milhões de crianças necessitaram de internação hospitalar por ITRI grave em todo o mundo decorrente de infecção pelo RSV. Além disso, ocorreram entre 66 e 199 mil óbitos de crianças menores de 5 anos com ITRI por RSV em apenas um ano, sendo que 99% destes óbitos ocorreram em países em desenvolvimento, incluindo-se o Brasil.(2) No entanto, é possível que estes números estejam subdimensionados, uma vez que em países em desenvolvimento (tomados como um grupo) muitas vezes contam com pouca disponibilidade de recursos para a execução de testes sensíveis em amostras de nasofaringe, assim como há muitas crianças que nem chegam próximo a locais onde há recursos de saúde para serem atendidas.(56)

Do ponto de vista molecular, existem dois tipos de RSV: RSV A e RSV B. Ambos são vírus RNA da família *Paramyxoviridae*, sendo o vírus RSV A mais grave.(41) A maioria das crianças aos 3 anos já foi infectada com pelo menos um dos tipos e as reinfecções são comuns. Tipicamente, a infecção começa com sinais e sintomas de vias aéreas altas, como coriza, espirros e desconforto, podendo evoluir para ITRI com pneumonia, bronquiolite, sibilância e desconforto respiratório. No entanto, muitos fatores diferentes podem ser responsáveis pela gravidade que o paciente irá apresentar. De um modo geral, diz-se que a chance de uma criança ser infectada depende de sua idade e sua exposição ao agente causador. Já a gravidade do quadro, após instalada a infecção, depende mais de fatores genéticos e ambientais, como o número de irmãos, de co-habitantes, a frequência em creches, amamentação e quantidade de imunoglobulina G no leite materno(57) e até mesmo fatores genéticos.(58, 59) Em pacientes imunossuprimidos, cardiopatas e em prematuros, a ITRI causada pelo RSV é mais grave, sendo consenso atualmente que esses pacientes devem receber profilaxia pré-exposição com anticorpo antimonoclonal (Palivizumab).(60, 61)

Em climas temperados e subtropicais, o RSV apresenta sazonalidade bem definida e está associado com elevado número de internações durante o período epidêmico, que ocorre nos meses de inverno.(50, 54, 55) No Brasil, a distribuição típica do RSV se dá entre os meses de março a agosto, coincidindo com a época de clima mais temperado no sul do país e com o aumento da aglomeração e redução da ventilação em locais onde as crianças permanecem.(62) Esse padrão de distribuição entre o final do outono e o início da primavera, com pico de incidência nos meses de inverno, pode ser também observado em países do hemisfério norte, com óbvia inversão do período do

ano.(41, 63) É interessante notar que há um gradiente entre diferentes latitudes na incidência de vírus como o RSV e o Influenza: quanto mais alta a latitude, mais tardio parece ser o pico de incidência anual em relação à temperatura fria no inverno.(63)

RINOVÍRUS HUMANO

O HRV é um vírus de cadeia única de RNA, pertencente à família *Picornaviridae*. Tradicionalmente o HRV era considerado o agente responsável pelo resfriado comum, onde poucos sinais e sintomas eram considerados relevantes em função da baixa gravidade que a doença mostra. No entanto, muitos conceitos em relação ao HRV têm sido mudados após vários estudos demonstrarem o isolamento do HRV em pacientes hospitalizados com ITRI grave.(64-66) Um estudo conduzido na Espanha mostrou que o HRV foi o segundo vírus mais isolado em pacientes internados com ITRI abaixo de 2 anos de idade,(67) resultados esses que são corroborados por outros estudos.(68, 69) Um estudo envolvendo 592 crianças hospitalizadas com febre e ITRI foi realizado nos Estados Unidos, mostrando que 26% destas apresentavam HRV em exames de PCR com swabs de naso e orofaringe. Ao todo, os autores mostraram que o HRV foi responsável por 5 em cada 1000 internações hospitalares em crianças menores de 5 anos de idade.(64)

Existem mais de 200 sorotipos diferentes de HRV.(41) Os mais estudados são os sorotipos do grupo A e B. Mais recentemente, foram descritos subtipos do grupo C, tido por alguns pesquisadores como mais agressivo.(70) A infecção pelo HRV é reconhecida como a principal causa de exacerbações da asma em crianças.(71) Johnston et al. mostraram que entre 80 a 85% das crianças com sibilância foram positivas para a

detecção de vírus respiratório e que na maioria das vezes o agente implicado era o HRV.(43) Outros autores mostram o papel do HRV como fator de piora da gravidade de doença bacteriana invasiva. Peltola e colaboradores demonstraram um aumento no número de casos de doença invasiva por pneumococo nos períodos do ano onde eram detectados picos de circulação de HRV. Os autores não mostraram a mesma correlação com os picos de incidência do RSV, sugerindo assim que o próprio HRV seria o responsável pelo aumento do número de casos de doença bacteriana invasiva e não fatores de confusão agregados à infecção pelo HRV (como o frio, o confinamento e a aglomeração).(72)

Diferentemente do que ocorre com o RSV, a infecção pelo HRV ocorre durante todo o ano, com picos mais discretos e sem uma elevação tão marcada de sua incidência em nenhuma época. Ele é transmitido por contato com secreções respiratórias com auto inoculação nos olhos ou nariz, mas pode também ser transmitido através de gotículas de secreção respiratória sob forma de aerossol.(73) Após o contágio, os vírus replicam-se primariamente nas células epiteliais da mucosa nasal e a criança pode permanecer eliminando vírus no ambiente por até 3 semanas. Além da relação entre HRV, o resfriado humano e as ITRI, o HRV tem sido relacionado também à exacerbação de asma e descompensação de doença pulmonar crônica, à bronquiolite, à sinusite e à otite média.(74, 75)

METAPNEUMOVÍRUS HUMANO

Um dos vírus sobre o qual há maior curiosidade atualmente é o Metapneumovírus Humano (hMPV). A primeira descrição do hMPV ocorreu em 2001 por van den Hoogen e colaboradores.(76) Tão surpreendente quanto a descrição do "novo" vírus, foi o fato de que os autores realizaram detecção viral em 192 amostras coletadas no ano de 1958 e destas todas foram positivas para hMPV. Assim, os pesquisadores concluíram que não se tratava propriamente de um vírus "novo", mas sim um vírus para o qual os métodos de detecção disponíveis não tinham sensibilidade até então.(76)

O hMPV é um Paramyxovirus, de cadeia única de RNA. Os achados clínicos do hMPV são muito semelhantes aos do RSV, indo desde coriza associada a quadros de resfriado comum até tosse, sibilância, bronquiolite e pneumonia.(77, 78) A taxa de hospitalização relacionada ao hMPV e as complicações secundárias (pneumonia, insuficiência respiratória, apnéia e bradicardia) são mais frequentes em pacientes prematuros com doença pulmonar associada à prematuridade,(79) crianças com doença cardíaca relevante, doenças neuromusculares e em pacientes maiores com imunossupressão grave decorrente de transplante.(80) Como a maioria dos vírus respiratórios, os efeitos clínicos do hMPV são mais graves nos extremos de idade. Em adultos, o vírus geralmente causa síndrome gripal leve, mas em idosos com condições clínicas como cardiopatias, doença pulmonar obstrutiva crônica ou imunossupressão, a infecção pelo HMPV pode causar uma mortalidade de até 50%.(81)

O período de incubação é estimado em 3 a 5 dias e o contágio ocorre por semanas após o início da infecção em crianças.(82) A transmissão, como na maioria dos

vírus respiratórios, ocorre por contato com gotículas de secreção ou partículas aerossolizadas. Também há registro de contágio nosocomial. Em instituições que cuidam de idosos, a taxa de contágio pode chegar a até 72%.⁽⁸³⁾ Tipicamente o período de incidência do vírus hMPV é no final do inverno e início da primavera, seguindo a redução do número de infecções por RSV.⁽⁸⁴⁾ Existe mais de um sorotipo de hMPV, variando sua incidência de ano para ano. Basicamente, estes sorotipos podem ser divididos em duas linhagens (A e B) e em duas sub-linhagens (A1 e A2, B1 e B2). No entanto, essas classificações parecem ter mais relevância em relação à sazonalidade dos vírus do que em relação à gravidade dos pacientes infectados. Um estudo conduzido na China mostrou que, embora o hMPV tenha sido detectado em um grande número de pacientes, não havia correlação entre severidade clínica e subtipo de hMPV.⁽⁸⁵⁾ Embora haja descrições de infecções por hMPV em praticamente todas as faixas etárias, a infecção é mais grave em pacientes menores de 2 anos e estima-se que aos 5 anos de idade a maioria (92%) das crianças já tenha experimentado ao menos um episódio de infecção de via aérea (alta ou baixa) pelo hMPV.⁽⁸⁶⁾ Um dos estudos mais completos sobre o hMPV foi realizado no Tennessee, nos Estados Unidos. Neste estudo, os autores analisaram amostras de secreção respiratória de 321 crianças que haviam sido atendidas entre os anos de 1976 e 2001 (ano de "descoberta" do hMPV) e que haviam tido resultados negativos para detecção viral para os vírus anteriormente conhecidos. Nestas amostras, aproximadamente 20% dos pacientes apresentavam hMPV. No total de espécimes coletados, considerando todas as crianças que haviam sido incluídas no estudo, 12% apresentavam hMPV nas secreções respiratórias.⁽⁸⁷⁾

A incidência real de hMPV varia muito entre os estudos publicados. Um dos maiores estudos publicados, feito na Austrália, avaliou durante 4 anos 10.025 espécimes coletados de nasofaringe e detectou uma incidência geral de 7,1%. No entanto, o estudo não se limitou a crianças: embora a idade média tenha sido de 8 anos de idade, houve a inclusão de adultos e até de idosos, o que pode ter reduzido a proporção real de crianças infectadas. O mesmo trabalho mostrou uma variação anual entre os picos de incidência dos vírus, uma vez que em 2003 o pico ocorreu mais precocemente entre os meses de julho e agosto. A exemplo de outros estudos, o trabalho da Austrália também não mostrou nenhum achado clínico característico ou exclusivo da infecção pelo hMPV. No entanto, os autores demonstraram que uma grande proporção dos pacientes (73%) necessitaram de hospitalização por complicações respiratórias, caracterizando assim a relevância do vírus.(86) Uma revisão de Mahony compilou 18 estudos realizados em 10 países diferentes e mostrou uma prevalência entre 1,5 a 30% de hMPV em pacientes com ITRI.(41)

No Brasil, em Porto Alegre foi demonstrada uma prevalência de 14,5% de hMPV em crianças com ITRI nos anos de 2007 e 2008.(49) Laham e colaboradores mostraram que no final do período de inverno em Buenos Aires, embora ocorra uma queda no número total de IRB (em relação ao início do período de frio), o agente viral mais isolado em vias aéreas de crianças era o hMPV.(84) Esses achados são compatíveis com outros da literatura que apontam que o hMPV pode ser muitas vezes o segundo vírus mais prevalente nos estudos de painel viral conduzidos com técnicas de detecção molecular.(62, 88)

Por fim, é importante ressaltar a importância do hMPV como coinfeção. Publicações vêm mostrando uma variação de 4,8 a 30% de coinfeções em pacientes com hMPV isolados nas vias aéreas. Dos vírus mais frequentemente isolados, o bocavírus humano tem sido reportado como o mais frequentemente associado ao hMPV.(89, 90)

INFLUENZA

O Vírus Influenza Humano (IF) é um vírus de cadeia única de RNA, da família *Orthomyxoviridae*. Caracteristicamente o IF é responsável por uma epidemia anual que dura entre 3 a 8 semanas, particularmente em locais de clima temperado. Essa epidemia é percebida como um aumento nos casos de doença respiratória febril de maneira súbita, que ocorre geralmente no outono. Uma revisão sistemática recente de dezembro de 2011, subsidiado pela organização Mundial da Saúde e pela Bill & Melinda Gates Foundation, avaliou dados publicados entre janeiro de 1995 e outubro de 2010, colhidos em áreas que englobavam aproximadamente 8 milhões de crianças. Nesse estudo, foi estimado que em 2008, 90 milhões de casos de influenza ocorreram em crianças menores do que 5 anos de idade. Dentre essas, 20 milhões fizeram quadros de ITRI e que dos casos de ITRI grave, cerca de 7% se deviam à infecção pelo Influenza. Foi estimada também mortalidade de 28 a 111 mil mortes por ano em menores de 5 anos de idade, com 99% destes óbitos ocorrendo em países em desenvolvimento.(2)

CONCLUSÃO

A alta morbidade das ITRI virais em pediatria, a escassez de estudos em países em desenvolvimento e a grande dificuldade de estudar a epidemiologia dos vírus respiratórios com métodos adequados, fazem com que sejam fundamentais novos estudos nessa área. Além disso, a distribuição de vírus recentemente descritos (como o metapneumovírus humano e o bocavírus humano) ainda não foi extensivamente estudada em países como o Brasil. Tampouco estão claros os efeitos da associação de dois ou mais vírus sobre a gravidade do quadro clínico, sendo poucos os estudos que avaliam adequadamente o papel das codeteccções virais.

O objetivo deste estudo é descrever o padrão de distribuição e a incidência de vírus respiratórios causadores de ITRI em crianças durante uma temporada de março a novembro no sul do Brasil. Além disso, procura-se identificar o papel de cada vírus (individualmente e em codeteccções) na determinação de maior ou menor gravidade clínica em crianças.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Conhecer a prevalência dos vírus respiratórios em crianças menores de 3 anos de idade ao longo de uma temporada;
- Descrever o impacto de cada um dos vírus sobre a gravidade da IRTI;
- Descrever o impacto da codeteccção sobre a gravidade das ITRI.

MÉTODOS

POPULAÇÃO

Crianças entre 1 e 36 meses de vida, admitidas no hospital por IRTI, eram consideradas inicialmente para inclusão no estudo. O estudo foi realizado no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre/RS, um hospital terciário, de ensino, e que atende, na grande maioria, pacientes oriundos do Sistema Único de Saúde. O período escolhido para o recrutamento correspondia àquele de maior prevalência de IRTI no sul do Brasil,(75) indo de abril a novembro, no ano de 2007. As crianças deveriam apresentar sinais ou sintomas há menos de 5 dias da data da hospitalização. As admissões em qualquer setor do hospital foram consideradas inicialmente para fins de recrutamento, incluindo unidade de tratamento intensivo e cuidados intermediários. Para isso, foi feita uma busca ativa em todos os setores do hospital diariamente, incluindo finais de semana e feriados.

DEFINIÇÕES

Infecção do trato respiratório inferior foi definida pela presença de sinais e sintomas de infecção respiratória aguda (tosse, coriza, hiperemia de orofaringe, com ou sem febre), associados a sinais de vias aéreas inferiores (taquipneia, tiragem, aumento do tempo expiratório, estertores ou sibilos na ausculta). A taquipneia foi definida de acordo com os critérios da Organização Mundial da

Saúde: até dois meses de vida, frequência respiratória (FR) < 60 respirações por minuto; de 2 a 12 meses, FR > 50; acima de 12 meses, FR > 40.(91)

Os desfechos de gravidade foram o tempo de internação em dias e o tempo de uso de oxigênio suplementar. O oxigênio era retirado obedecendo-se a protocolo assistencial do hospital, quando a oximetria de pulso fosse maior do que 94% com a criança em ar ambiente por pelo menos 6 horas.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas crianças com doença neuromuscular ou imunodeficiência conhecida, doença cardiopulmonar prévia ou anomalias congênitas. Também foram excluídas crianças que apresentavam hospitalização prévia por IRTI nos últimos 30 dias pela possibilidade de persistência viral ou de restos virais nas vias aéreas.

As infecções bacterianas foram excluídas com base na clínica do paciente ou de acordo com resultados de radiogramas de tórax. Esses exames de imagem foram solicitados a critério da equipe assistencial para um subgrupo de pacientes com potencial infecção bacteriana ou comorbidades além da IRTI. Os radiogramas não foram solicitados a todos os participantes do estudo para minimizar exposições desnecessárias à radiação.

CÁLCULO DE TAMANHO AMOSTAL

Foram usados artigos previamente publicados para estimar o tamanho desejável de amostra. (87, 92) Foi estimado que o número de 200 casos seria o suficiente para as análises propostas.

COLETA DE DADOS

Nas primeiras 24 horas de hospitalização os pais ou responsáveis eram abordados pela equipe. Em seguida, era verbalmente explicado o teor do estudo, lido e coletado assinatura no termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 2) e aplicado questionário ao responsável pela criança com dados demográficos e do passado médico (anexo 4). Dados referentes ao estado clínico no momento da admissão, sinais vitais e sinais de desconforto ventilatório foram obtidos junto aos prontuários médicos. Informações acerca do uso de medicações, evolução clínica até a alta hospitalar, uso de oxigênio suplementar e duração da internação foram avaliados prospectivamente usando questionário específico (anexo 5).

PROCEDIMENTOS

As amostras de secreção respiratória eram coletadas com técnica de aspirado nasal inicialmente em três amostras, usando coletor estéril acoplado a vácuo, sempre nas primeiras 48 horas desde a admissão do paciente. As amostras eram então identificadas e imediatamente divididas em alíquotas incluindo uma delas em fixador TRIzol[®], e armazenadas a -80°C, até envio ao Laboratório de Patologia Viral da Escola de Medicina da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto/SP.

DETECÇÃO VIRAL COM RT-PCR

Para o isolamento de RNA dos aspirados nasais, eram extraídos 250 µl da secreção de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos da América). O DNA era extraído de uma amostra de 200µl de aspirado nasal usando kit de purificação Wizard Genomic DNA[®], também de acordo com protocolo do fabricante (Promega, Madison, EUA). A detecção dos vírus foi feita através de PCR Real-Time, usando o sistema Taqman[®] (Applied Biosystems, New Jersey, EUA), com primers e sondas específicas em um termociclador (7300 Real Time PCR System[®]- Applied Biosystems). RT-PCR para o gene celular β-actina também foi realizado para controle de qualidade.

Para os vírus com um genoma de RNA (ou seja, hRV, Influenza vírus-A [FLUAV], parainfluenza humano [HPIV], RSV, hMPV e coronavírus

humano[HCoV]), a transcrição em cDNA foi realizada com a transcriptase reversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®], Applied Biosystems), utilizando 1 µg do RNA extraído, de acordo com o protocolo do fabricante. As amplificações foram realizadas com 45 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e extensão-reanelamento a 60°C durante um minuto, exceto para o hMPV, para quem o anelamento foi realizado a 55°C durante 30 segundos, e a extensão a 60°C durante um minuto. (anexo 3)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados demográficos foram representados como média ou mediana e suas variações de acordo com a sua distribuição. Características entre os grupos foram comparadas, de acordo com a variável, utilizando teste-t pareado, teste de Mann - Whitney, qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Modelos lineares generalizados (Tweedie) foram utilizados para analisar as relações entre principais resultados (tempo de permanência no hospital e tempo de uso de oxigênio suplementar) e as variáveis preditoras (detecção de vírus [sim/não], sexo, idade, prematuridade [<37 semanas de gestação], tabagismo materno durante a gravidez, asma na família). Todas as variáveis com significância de $p < 0,15$ foram consideradas no modelo uni variado e aquelas com significância de $p < 0,05$ foram consideradas relevantes na análise multivariada.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software SPSS v.18 (SPSS Inc., Chicago, IL).

ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob o número 06/03467 e na Universidade de São Paulo sob o número 4856/2004. Todos os pais ou responsáveis pelos pacientes tiveram termo de consentimento livre e esclarecido lido e explicado e aprovaram por escrito a realização das coletas.

RESULTADOS

RESULTADOS

Inicialmente 317 episódios de IRTI foram recrutados no estudo. Destes, 260 prosseguiram até a fase de coleta de dados e de secreção respiratória. Houve 5 pacientes com quadro sugestivo de pneumonia bacteriana, confirmados por radiograma de tórax. Três pacientes tiveram dados incompletos e 5 haviam estado hospitalizados há menos de 30 dias antes da internação atual da inclusão no estudo. Outros 44 pacientes tiveram problemas com as amostras de secreção nasal que inviabilizaram a análise laboratorial. As perdas estão sumarizadas na figura abaixo.



Figura 1: Número de pacientes recrutados e perdas do estudo

Análises radiológicas com radiogramas de tórax foram solicitadas a critério da equipe assistencial para parte dos pacientes incluídos. Os exames foram avaliados de acordo com classificação simplificada em: “normal”, “pneumonia” ou “outro infiltrado”. Ao todo, 104 radiogramas foram realizados, com 5 pacientes apresentando imagens compatíveis com pneumonia, 32 normais e 67 com infiltrado.

Ao todo 222 episódios (85,1% do total) de IRTI tiveram ao menos um vírus isolado através do RT-PCR na secreção respiratória. A sazonalidade geral da detecção dos vírus está mostrada na figura 2.

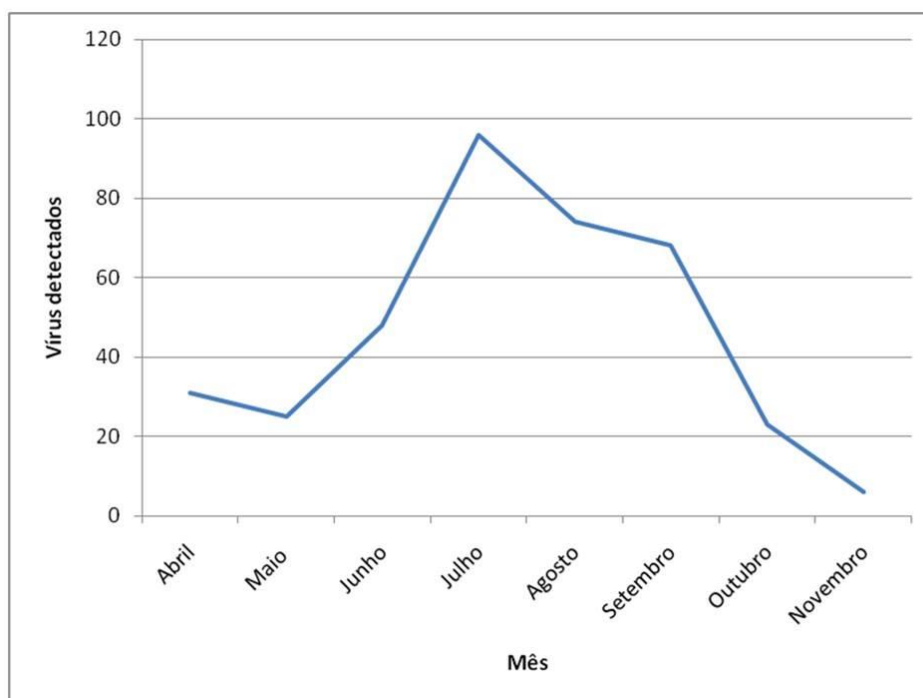


Figura 2: Sazonalidade geral da detecção de vírus

Quanto aos tratamentos instituídos durante a internação, poucos pacientes demandaram suporte respiratório intensivo como ventilação mecânica (12/260) ou mesmo internação em unidade de tratamento intensivo (16/260). No entanto, 92,3% (240/260) necessitaram de suporte de oxigênio suplementar. Alguns dos aspectos do tratamento instituído estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos instituídos durante a internação hospitalar

Variável	n=260	% do total
Oxigênio suplementar	240	92,3
Internação em UTI	16	6,1
Ventilação mecânica	12	4,6
Uso de broncodilatador no hospital	196	75,4
Antibiótico oral na alta	55	21,1
Antibiótico parenteral	23	8,8

Embora poucos pacientes tenham recebido antibiótico parenteral durante a internação, mais de 20% do total recebeu algum tipo de antibiótico na alta hospitalar. A grande maioria dos pacientes recebeu broncodilatador durante a internação.

Os principais achados do estudo estão apresentados no anexo 1.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) é o mais prevalente nas infecções do trato respiratório inferior de crianças internadas por IRTI no sul do Brasil, o que confirma vários outros estudos. No entanto, é bastante relevante a incidência de outros vírus respiratórios, particularmente o rinovírus, o metapneumovírus humano (hMPV) e o Bocavírus humano (hBoV). É importante que estes dois últimos vírus sejam também considerados no raciocínio clínico de quem atende crianças com IRTI, uma vez que foram descritos há menos tempo e ainda há poucos estudos em populações de países menos desenvolvidos.
- Pacientes com HRV detectado na secreção respiratória parecem apresentar mais gravidade do que aqueles infectados por outros vírus. A codeteção deste vírus com o RSV implicou em um aumento no tempo de uso de oxigênio e no número de dias de hospitalização em relação a pacientes com um só vírus detectado ou mesmo apenas com RSV.
- É bastante alta a taxa de detecção viral em pacientes até 36 meses de vida, com IRTI internados em hospital, assim como é alta também a taxa de codeteção viral.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Várias são as perspectivas na investigação das IRTI tendo em vista os achados deste estudo. O primeiro aspecto, talvez mais imediato e necessário, é a disseminação entre as equipas assistenciais dos dados epidemiológicos dos vírus causadores de IRTI. Vários vírus ainda são desconhecidos por grande parte dos clínicos e há estudos que mostram uma redução na prescrição de antibióticos para IRTI de crianças hospitalizadas quando há a detecção positiva de vírus respiratórios (93), inclusive no Brasil.(94) Assim, pode-se especular o impacto assistencial positivo que teria um maior grau de suspeita acerca de etiologia viral de IRTI de crianças.

Outro aspecto a ser estudado é o efeito clínico decorrente de diferentes genótipos virais, particularmente do HRV. Alguns autores sugerem que parece haver aumento da gravidade dos casos de IRTI em pacientes infectados pelo subtipo C do HRV.(69, 70) Embora a ocorrência deste subtipo seja bastante sazonal, a necessidade de caracterização clínica destes subtipos é reforçada pelo presente estudo. Se por um lado o aumento da gravidade nas codeteções HRV/RSV demonstrada nesse estudo parece ser corroborada por outros estudos, por outro lado há ainda que se esclarecerem os mecanismos que levam à piora clínica. O aumento no número de pacientes em um futuro estudo poderia fornecer mais dados relevantes, assim como outros delineamentos poderiam ser particularmente úteis em relação a desfechos mais raros, como mortalidade e uso de ventilação mecânica, por exemplo.

Também parece importante a realização de estudos que potencialmente reforcem nossos achados usando grupos-controle, assim como métodos de detecção de agentes bacterianos. Por fim, como perspectiva relevante, deve-se trabalhar na viabilização dos testes diagnósticos para vírus respiratórios para uso em cenários clínicos como emergências, enfermarias e unidades intensivas de países em desenvolvimento. Essa necessidade não é depreendida apenas pelo presente estudo, mas é consideravelmente reforçada pelos achados aqui descritos. Os testes idealmente precisam ser mais fáceis de serem executados, mais baratos (permitindo seu uso em cenários de recursos escassos, como muitas unidades do Sistema Único de Saúde Brasileiro), e, por fim, também mais rápidos, para que tenham seu impacto clínico maximizado.

ANEXOS

Anexo 1- Artigo publicado no periódico BMC Infectious Diseases

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors

Emerson Rodrigues da Silva^{1,4}, Paulo Márcio Condessa Pitrez², Eurico Arruda³, Rita Mattiello², Edgar E Sarria², Flávia Escremim de Paula³, José Luis Proença-Modena³, Luana Sella Delcaro³, Otávio Cintra³, Marcus H Jones², José Dirceu Ribeiro⁴ and Renato T Stein^{2,5*}

Abstract

Background: Lower respiratory tract infection (LRTI) is a major cause of pediatric morbidity and mortality, especially among non-affluent communities. In this study we determine the impact of respiratory viruses and how viral co-detections/infections can affect clinical LRTI severity in children in a hospital setting.

Methods: Patients younger than 3 years of age admitted to a tertiary hospital in Brazil during the months of high prevalence of respiratory viruses had samples collected from nasopharyngeal aspiration. These samples were tested for 13 different respiratory viruses through real-time PCR (rt-PCR). Patients were followed during hospitalization, and clinical data and population characteristics were collected during that period and at discharge to evaluate severity markers, especially length of hospital stay and oxygen use. Univariate regression analyses identified potential risk factors and multivariate logistic regressions were used to determine the impact of specific viral detections as well as viral co-detections in relation to clinical outcomes.

Results: We analyzed 260 episodes of LRTI with a viral detection rate of 85% (n = 222). Co-detection was observed in 65% of all virus-positive episodes. The most prevalent virus was Respiratory Syncytial Virus (RSV) (54%), followed by Human Metapneumovirus (hMPV) (32%) and Human Rhinovirus (HRV) (21%). In the multivariate models, infants with co-detection of HRV + RSV stayed 4.5 extra days (p = 0.004), when compared to infants without the co-detection. The same trends were observed for the outcome of days of supplemental oxygen use.

Conclusions: Although RSV remains as the main cause of LRTI in infants our study indicates an increase in the length of hospital stay and oxygen use in infants with HRV detected by RT-PCR compared to those without HRV. Moreover, one can speculate that when HRV is detected simultaneously with RSV there is an additive effect that may be reflected in more severe clinical outcome. Also, our study identified a significant number of children infected by recently identified viruses, such as hMPV and Human Bocavirus (HBov), and this is a novel finding for poor communities from developing countries.

Keywords: Respiratory tract infections, Respiratory syncytial virus, Human rhinovirus, Infants, Coinfection

* Correspondence: rstein@pucrs.br

²Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁵Pediatric Respiriology, Department of Pediatrics, PUCRS, Av. Ipiranga, 6690, IPB-PUCRS, Porto Alegre, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Lower respiratory tract infections (LRTI) represent an important public health burden in the first years of life accounting for approximately one fifth of all deaths in children below five years of age, especially in developing countries [1]. The specific role of newly identified viruses on LRTIs, like Human Metapneumovirus (hMPV), has been studied in recent years [2]. However, its impact among non-affluent populations has been scarcely evaluated. In such locales, infants with respiratory syncytial virus (RSV)-associated LRTIs present a three times greater risk of a fatal event, when compared to their peers in developed countries [3].

Although RSV is well recognized as the main agent associated with severe LRTIs, recent data indicate that other viruses may play a significant role in these clinical outcomes. Human rhinovirus (HRV) seems to be of particular interest, as the most prevalent virus in respiratory illnesses even in the first years of life [4,5], being associated with severe acute bronchiolitis, especially among children of atopic parents [6]. Moreover, a recent study showed that, in a population of preterm infants, HRV was the most prevalent agent associated with severe bronchiolitis [7]. Also of interest is the fact that wheeze-related HRV infection in the first year of life is associated with an increased risk for developing asthma later in life [8], and that this effect was greater than the observed in relation to RSV [9].

The impact on severity of early life respiratory infections may be also affected by viral co-detections diagnosed through sensitive PCR analyses. Some studies have shown a positive association between viral co-detection and worse clinical outcomes [10,11], while others have failed to show results in the same direction [12-14].

The aims of our study were to determine the current impact of newly identified viruses on the severity of LRTI in infants seen in the emergency room and pediatric wards from a tertiary hospital in a developing country, and how specific viruses alone or in co-detections increased the degree of clinical severity of disease.

Methods

Subjects and study design

Infants and toddlers younger than three years of age, with a diagnosis of LRTI, admitted to the emergency room (ER) or pediatric wards of a tertiary hospital in Porto Alegre, southern Brazil, were recruited for this study, during the months of greatest prevalence for acute pediatric respiratory viral illnesses (i.e., from April to November) in 2007 [4,15]. The great majority of patients seen in this particular setting come from low-

income families, with health coverage provided by the Brazilian free-access public health system.

LRTI was defined by the presence of signs and symptoms of an acute respiratory infection (cough, nasal discharge, oropharyngeal hyperemia, with or without fever), and lower respiratory signs (tachypnea, retractions, prolonged expiratory time, or crackles/wheezing on auscultation). Chest radiographs were taken only at medical assistant discretion, to avoid unnecessary X-ray exposure, and thus were not used for diagnostic purposes. Children who were admitted in the ER with signs and symptoms of a LRTI for at least 6 hours were considered eligible, once symptoms had started within the previous 5 days. Patients with other co-morbidities such as neuromuscular diseases, previous cardiopulmonary disorders, immunodeficiencies, or important congenital anomalies were excluded. We also excluded patients with a hospitalization due to LRTI in the previous 30 days. Bacterial pneumonia was excluded by clinical presentation and chest X-rays findings.

Within the first 24 hours of hospitalization, medical information was collected from parents or guardians through a standardized questionnaire. Data regarding clinical conditions at admission, vital signs, and signs of respiratory distress were obtained from the medical charts. Information on use of medications, clinical course of the disease until discharge, use of supplemental oxygen, and length of hospital stay were prospectively collected. These two latter variables were used as the main clinical outcomes, serving as surrogates for clinical severity. Supplemental oxygen was withdrawn when pulse oximetry was equal or greater than 94% in room air for at least 6 hours, as this is the standard clinical procedure in the hospital. Sample size was estimated based on few previous similar studies, since data analyzing the association between viral co-detection and our main outcomes was scarce at the time this project was planned [16-18].

Nasopharyngeal sample collection

Nasopharyngeal aspiration with a standardized technique using vacuum and a sterile collector were performed in all children within the first 48 hours of admission. Samples were immediately split into aliquots, including one in TRIzol[®], and stored at -80°C, until shipment to the Laboratory of Viral Pathogenesis, at the University of São Paulo School of Medicine, Ribeirão Preto.

Viral detection by individual real-time RT-PCR

To isolate RNA from nasal aspirates, 250 µL were extracted according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, USA). DNA was extracted from a sample of 200 µL of nasal aspirate using the Wizard

Genomic DNA[®] purification kit, following manufacturer's instructions (Promega, Madison, USA). The detection of viruses was done by Real Time PCR, using the Taqman System[®] (Applied Biosystems, New Jersey, USA), with specific primers and probes in a thermal cycler (7300 Real Time PCR system[®] - Applied Biosystems). Real Time PCR reactions for cellular gene (β -actin) were also performed for internal quality control.

For viruses with a RNA genome (i.e., HRV, Influenza Virus-A [FLUAV], human parainfluenza virus [HPIV], RSV, hMPV and human coronavirus [HCoV]), the transcription into cDNA was done with reverse transcriptase (high capacity cDNA reverse transcription kit[®], Applied Biosystems), using 1 μ g from the extracted RNA, according to the manufacturers' protocol. The qPCR assays were performed using 3 μ L of the DNA extraction or cDNA (approximately 150 ng), 0.33 pmoles for primers, 0.17 pmoles for probes and 7.5 μ L of master mix of TaqMan[®] (Applied Biosystems). Amplifications were performed with 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing-extension at 60°C for one minute, except for hMPV, when annealing was done at 55°C for 30 seconds, and extension at 60°C for one minute.

Statistical analysis

Demographics were summarized as mean or median and range according to their distribution. Characteristics among groups were compared, accordingly, using two-sample t-test, Mann-Whitney, Chi-square or Fisher's exact test.

Generalized linear models (Tweedie model with Identity link function) were used to analyze the relationships between main outcomes (length of stay in the hospital and time in use of supplemental oxygen) and the predictor variables (virus detection [yes/no], sex, age, prematurity (i.e. <37 weeks of gestation), maternal smoking during pregnancy, family asthma). All variables with a significance of $p < 0.15$ were considered in the univariate models and those with significance of $p < 0.05$ in the multivariate analysis. All analyses were performed using SPSS v.18 (SPSS Inc, Chicago, IL).

This study was approved by the local Institutional Ethics Committees (06/03467 - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul and 4856/2004 - Universidade de São Paulo). Parents or legal guardians read and signed an informed consent approved for this study.

Results

Two hundred and sixty patients were enrolled in the study. Characteristics of the patients recruited are presented in Table 1. In the whole sample there were more boys than girls, almost half of children were younger than six months, 24% of all children were born premature, 29% had been exposed to tobacco during gestation,

Table 1 Characteristics and outcomes of the population included in the study (260 children)

Sex, female, n (%)	103 (40)
Age, months, median (range)	5 (1-35)
Age, <6 months, n (%)	128 (49)
Maternal smoking during pregnancy, n (%)	74 (29)
Prematurity, n (%)	62 (24)
Family history of asthma*, n (%)	149 (58)
LOS [†] , days, median (range)	4 (2-8)
Use of oxygen, days, median (range)	3 (1-6)

[†] LOS: length of hospital stay; * for parents and/or siblings.

and more than a half had a family history of asthma (parents or siblings). Overall, median hospital length was 6 days and median supplemental oxygen requirement was 5 days.

The presence of viruses was detected by PCR in 222 (85%) of all LRTI episodes. Co-detection was present in 146/260 (56%). The frequencies of viral detection and co-detection are shown in Table 2. The most common single infection was related to RSV (54%), followed by hMPV (32%), and HRV (21%).

During the surveyed time RSV has shown an incidence peak in the beginning of the cold season (i.e. from april to November) in the southern hemisphere, followed in late winter by peaks of hMPV, HRV, and HBoV (Figure 1). Other viruses such as HPIV and Human Adenovirus

Table 2 Viral detection by RT-PCR, among 260 children

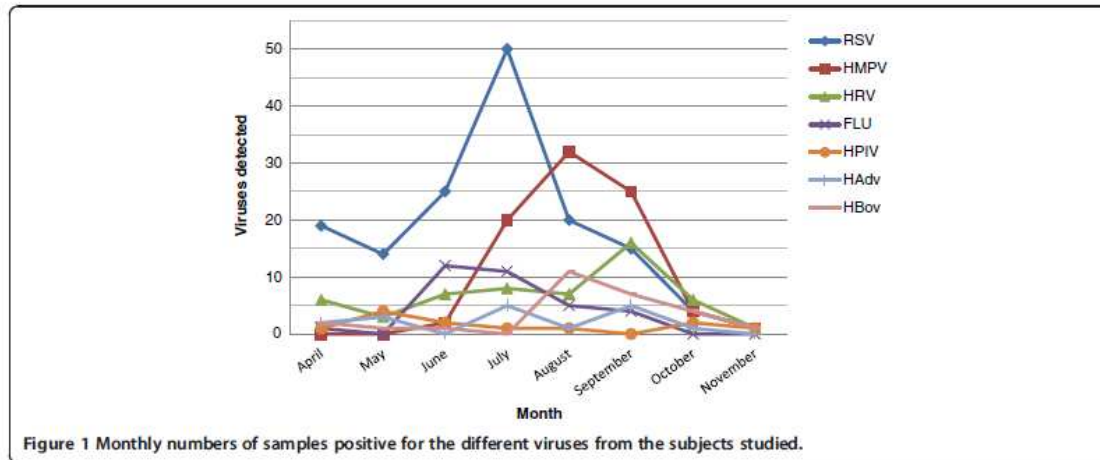
Overall prevalence of viruses	n (%)
No virus detected	38 (14.1)
RSV	139 (53.5)
hMPV	84 (32.3)
HRV	54 (20.8)
HBoV	27 (10.4)
Influenza (A or B)	33 (12.7)
Para-influenza (1 or 2)	17 (6.5)
Adenovirus	17 (6.5)
Coronavirus	3 (1.2)
Co-detections	n (%)
RSV + HRV	22 (8.5)
RSV + hMPV	37 (14.2)
RSV + Others*	26 (10.0)
HRV + Others**	29 (11.2)
HMPV + Others***	16 (6.1)
HMPV + Others***	16 (6.1)

RSV: Respiratory syncytial virus; HMPV: Human metapneumovirus; HRV: Human rhinovirus.

* Bocavirus + influenza A or B.

** HMPV + influenza A or B.

*** Bocavirus + influenza A or B.



(HAdv) showed low but constant rates throughout the season.

In the univariate analyses, length of hospital stay and need of supplemental oxygen were significantly associated with age (≤ 6 months), maternal smoking during pregnancy and with family history of asthma (parents and/or siblings) (Table 3). Infants younger than 6 months of age stayed in hospital 3.8 days longer than older infants ($p < 0.001$), and those with a family history of asthma stayed 2.4 days longer than those without a family history of asthma ($p < 0.001$). Also, infants 6 months of age or younger needed supplemental oxygen for an extra 3.8 days, when compared to older infants/children. A similar finding was observed for children with a family history of asthma, who required 2.4 extra days of oxygen compared to those without the family history of asthma (Table 3). Other risk factors, such as breastfeeding, indoor smoking, current parental smoking, siblings, and overcrowding were not significantly associated with neither of the main outcomes.

Infants with positive PCR for HRV alone as well as those co-detected with RSV and HRV also had significantly longer hospital stays (3.2 days, $p = 0.001$; and 5.5 days, $p = 0.002$, respectively) than those with other detected viruses. Extended time in use of supplemental

oxygen was also associated with HRV (2.8 days, $p = 0.002$) and RSV (3.7 days, $p = 0.013$), but also with Influenza virus A or B (2.2 days, $p = 0.042$), when compared to those with other viruses in single or in co-detection.

Infants with HRV-LRTIs stayed an extra 2.2 days in hospital ($p = 0.011$), for a total of 7.7 (95% CI: 6.1-9.3) days when compared to those with other infections, after adjusting for potential confounding variables (Table 4). Table 5 shows that infants with combined HRV and RSV positive PCR in the same samples stayed 4.5 extra days ($p = 0.004$) than those without HRV and RSV in these adjusted models (that included sex, age ≤ 6 versus > 6 months, prematurity, family history of asthma and maternal smoking during pregnancy), (95% CI: 7.0-13.0) days. Time in use of supplemental oxygen followed the same association trends. Infants with proven RSV infections needed 4.75 (95% CI: 3.97-5.53) extra days of oxygen, while those with HRV used supplemental oxygen for 1.4 extra days, and those with RSV and HRV co-detection for 2.2 days, when compared to infants presenting positive PCRs for other viruses alone or in combinations. Figure 2 illustrates the association between HRV and RSV + HRV co-detection with increased length of hospital stay and oxygen use, and this effect is especially significant for infants younger than 6 months of age. Influenza viruses were not associated with longer use

Table 3 Univariate analyses of risk factors for length of hospital stay and days with supplemental oxygen (n = 260)

	Length of hospital stay			Days with supplemental oxygen		
	β^*	(95% CI)	p	β^*	(95% CI)	p
Sex, female	0.4	(-0.9 - 1.7)	0.553	0.5	(-0.6 - 1.7)	0.372
Age, ≤ 6 months	3.8	(2.7 - 5)	<0.001	3.8	(2.8 - 4.9)	<0.001
Prematurity	0.4	(-1.0 - 1.9)	0.570	0.4	(-1.0 - 1.7)	0.605
Maternal smoking during pregnancy	1.2	(-0.2 - 2.6)	0.106	1.3	(-0.02 - 2.7)	0.054
Family Hx asthma	2.4	(1.2 - 3.6)	<0.001	2.4	(1.3 - 3.5)	<0.001

Hx: history; * number of extra days, compared to negative counterparts.

Table 4 Multivariate analysis for length of hospital stay (dependent variable), and HRV adjusting other risk factors

	Yes		No		β^*	95% CI	P
	Mean	(95% CI)	Mean	(95% CI)			
HRV	7.7	(6.1 - 9.3)	5.5	(4.7 - 6.2)	2.2	(0.5 - 3.9)	0.011
Sex (female)	6.8	(5.6 - 8.0)	6.3	(5.4 - 7.3)	0.4	(-0.6 - 1.5)	0.419
Age ≤ 6 months	8.2	(7.0 - 9.3)	5.0	(3.9 - 6.0)	3.2	(2.0 - 4.3)	<0.001
Family Hx of asthma	7.2	(6.2 - 8.2)	6.0	(4.8 - 7.1)	1.2	(0.1 - 2.3)	0.035
Prematurity	6.7	(5.4 - 7.9)	6.5	(5.5 - 7.4)	-0.2	(-1.4 - 1.0)	0.749
Maternal smoking	6.8	(5.6 - 8.2)	6.3	(5.3 - 7.2)	0.6	(-0.6 - 1.8)	0.354

Hx: history; * number of extra days in hospital, compared to negative counterparts.

of supplemental oxygen when controlling for the demographic variables.

Discussion

Our results suggest that infants with severe LRTI and positive PCR for HRV, alone or in co-detection with RSV, stayed hospitalized longer periods and utilized more supplemental oxygen, when compared to children infected by other viruses, including those with RSV-alone. Our data also reinforce previous findings that identified RSV as the major agent associated with severe LRTIs among children in a hospital setting, in populations of low socio-economic status, where other environmental and social variables potentially play a role [16,17]. Infants younger than six months and those with a family history of asthma/recurrent wheeze are also at greater risk for disease severity.

RSV was the most frequently detected virus, accounting for a high burden of LRTIs in our population. Although it is not possible to establish an unequivocal correlation between LRTIs and upper airway viral detection, the finding of RSV in over 50% of hospitalized children in our study strongly suggests that its impact is still indeed very high in this region, regardless of the presence of newly identified viruses. These results are in accordance with recently published studies in Brazil, which also identified RSV as the main agent responsible for severe LRTI, especially in a hospital setting. Nascimento and coworkers have shown an overall viral detection rate

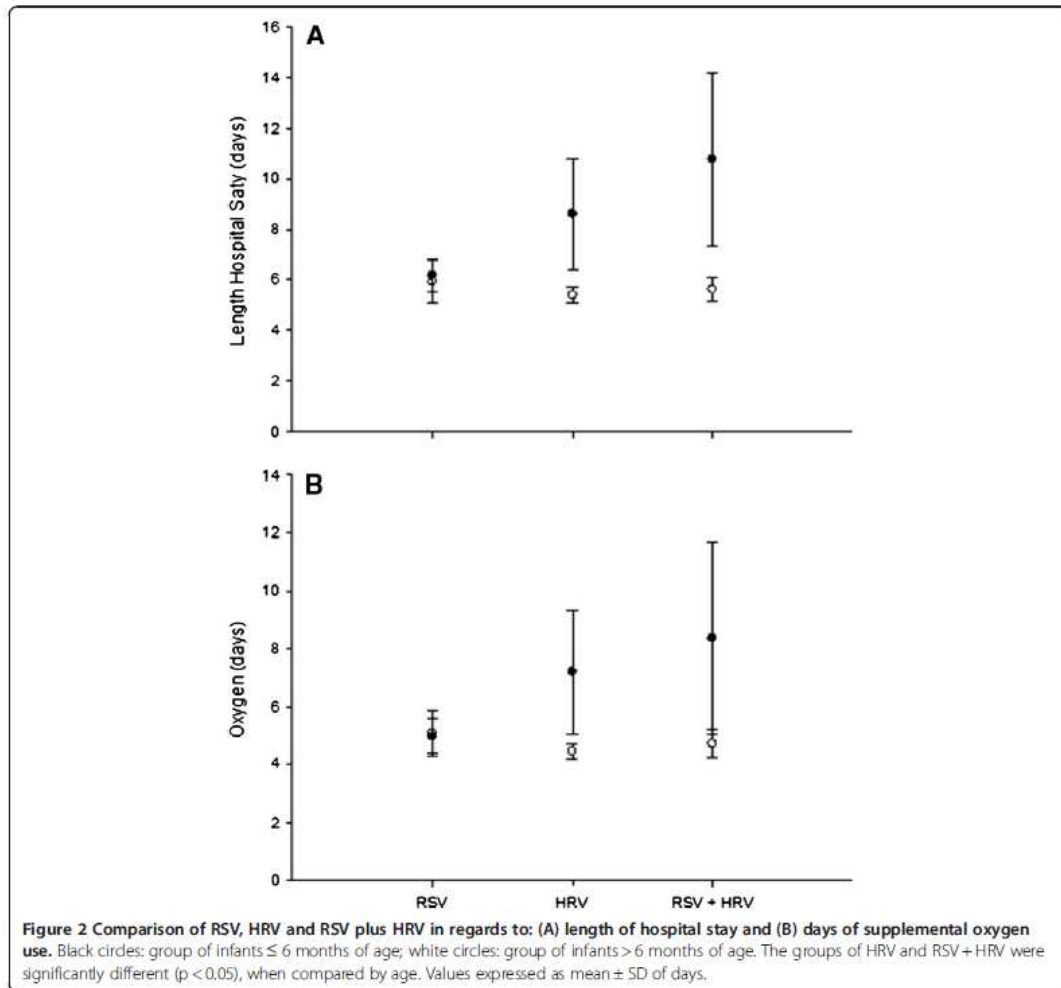
of 93% from nasopharyngeal samples in a small group of children below 2 years of age, and reported RSV as the most prevalent virus (63.6%) [19]. Another study aiming to investigate the role of HBoV and hMPV in LRTIs in southern Brazil also showed similar results (at least one positive virus in 90% of the samples and RSV positive in 49.3%) [20]. The high detection rate of RSV in children with LRTI in a hospital setting such as ours is consistent with most studies worldwide and the burden due to viral respiratory disease seems as high in these locales as they are in more developed countries. A recent analysis of children admitted into the hospital due to acute bronchiolitis in Texas, USA, has shown a steady increase in admissions over a 5-year period and this has been credited mostly to RSV [21]. This increasing role for severe viral LRTIs, observed also in other studies, is probably explained by a series of complex environmental and social changes that seem to affect how viruses spread in communities.

Some studies have reported different clinical outcomes for specific viruses causing LRTIs, especially in the presence of co-detections, such as with RSV and HBoV [22,23], while others did not reproduce such findings [17,24,25] and these associations remain unclear. A lack of association between an overall finding of any viral co-detection and LRTI severity was reported in studies performed in non-affluent countries [2,12,26], as well as in developed countries [13,14]. In our study, patients detected with HRV alone and RSV + HRV presented

Table 5 Multivariate analysis for length of hospital stay (dependent variable) and HRV + RSV (co-detection), adjusting for other risk factors

	Yes		No		β^*	95% CI	P
	Mean	(95% CI)	Mean	(95% CI)			
RSV + HRV	10.0	(7.0 - 13.0)	5.5	(4.8 - 6.3)	4.5	(1.4 - 7.5)	0.004
Age, ≤ 6 months	9.4	(7.7 - 11.1)	6.1	(4.6 - 7.7)	3.3	(2.2 - 4.5)	<0.001
Sex (female)	7.9	(6.2 - 9.6)	7.6	(6.0 - 9.2)	0.3	(-0.7 - 1.4)	0.517
Family Hx of asthma	8.3	(6.7 - 9.9)	7.2	(5.5 - 8.9)	1.1	(0.04 - 2.2)	0.043
Prematurity	7.8	(6.1 - 9.5)	7.7	(6.1 - 9.4)	-0.04	(-1.2 - 1.2)	0.952
Maternal smoking	8.1	(6.3 - 9.9)	7.4	(5.9 - 8.9)	0.7	(-0.5 - 2.0)	0.243

Hx: History; * number of extra days in hospital, compared to negative counterparts.



increased length of hospitalization and increased time of supplemental oxygen use. Papadopoulos et al. has shown a five-fold increase in clinical severity in infants with acute bronchiolitis due to HRV, compared to those infected only with RSV. Compared to those with positive RSV samples without HRV co-detection, infants with HRV were older, had lower birth weights and were hospitalized earlier [16]. Some explanations for apparently contradictory findings in a myriad of studies could be attributed to the lack of uniform criteria for subject inclusion and standardized statistical analysis [14]. Other plausible explanations are the natural variation in HRV prevalence in different seasons and possible variations in the prevalence of type C HRV. This agent is associated with more severe disease and was already described as a

major cause of LRTI in infants from non-affluent countries [27,28]. Unfortunately, in our study, we were not able to determine the prevalence of HRV subtypes, and this stands as an interesting subject for further research.

The association of HRV (alone or with RSV) with LRTI severity and atopy has not been widely studied. The relationship between persistent wheezing at 3 years and at 6 years versus relevant HRV infection in early life is well established [9,29], but there are few studies looking at these relationships in the first year of life. A recent study suggests that the relationship between HRV in early life LRTI and subsequent recurrent wheeze/asthma is dependent on allergic sensitization, which seems to precede the viral insult in a causal model [30]. This association we have found between HRV with increased

severity (using the surrogates of length of hospital stay and days in supplemental oxygen) is a major finding. Hence, the association between HRV infection, increased severity and atopy remains to be better clarified.

It has already been shown that HRV is able to reduce cell proliferation and decreases the self-repair capacity of bronchial epithelial cells [31]. Therefore, our data may suggest that in certain subsets of patients the burden of HRV in acute LRTI should be considered distinct from that of other viruses. Another plausible explanation for our findings could be the possibility of HRV persistence in the airways leading to an "over detection" of the virus, simultaneously with those infected only by RSV [32]. In our study this hypothesis seems improbable since we detected a clear worsening in the clinical markers in patients with RSV that were also detected with HRV.

Another interesting finding of our study was the high prevalence of newly described viruses. hMPV was detected in almost one third of all episodes, but did not seem to affect the main outcomes studied here, in the way RSV and HRV have done. While the recognition of the impact of human hMPV is increasing, its prevalence is still probably underestimated in clinical practice, since laboratory testing has become widely available only in recent years [18,24,33]. HBoV was also detected in a large number of nasal samples and it was very frequently associated (co-detected) with other agents. In our study, only 2/27 patients with HBoV had this virus detected as single agent. The overall HBoV detection rate was higher in our data compared to previous studies [34,35], and this may be explained again by natural seasonal variations. It is also interesting to notice the seasonal pattern of both hMPV and HBoV, which present their peak prevalence rates in late winter, right after the RSV peak, which occurs earlier in winter.

The main limitation of our study is the lack of surveillance in consecutive years, which could have biased results in case of an outbreak of one specific virus in a given year. Our eight months of viral surveillance could potentially have failed to detect any atypical outbreak, which did not seem likely to have occurred. Also, reliable tests capable of ruling out bacterial co-detection were not available at the time of the study. This could have underestimated the burden of bacteria in our sample and the co-detection of viruses and bacteria remains an interesting issue for further studies.

Conclusion

In our study, RSV was the most prevalent viral agent in hospitalized patients with LRTI and the co-detection of HRV in patients with RSV infection increased hospital stay and days in use of supplemental oxygen. Interestingly, even in developing countries, the role of recently discovered viruses needs to be further studied in order

to identify novel risk factors of susceptibility/severity, and new treatment targets for these agents. We also highlight the role of HRV as an important risk factor for severe LRTI, particularly when simultaneously associated with RSV, which strongly suggests that co-detection may also mean co-infection, since the combination of the two agents seem to affect clinical outcomes. Longitudinal studies with control groups are necessary to confirm these results in populations at greater risk for severe respiratory disease.

Abbreviations

LRTI: Lower respiratory tract infection; RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction; RSV: Respiratory syncytial virus; hMPV: Human metapneumovirus; HRV: Human rhinovirus; HBoV: Human bocavirus; ER: Emergency room; FLUA: Influenza virus A; HPIV: Human parainfluenza virus; HCoV: Human coronavirus; HAdV: Human adenovirus.

Competing interests

This study was supported by Abbott Laboratórios do Brasil Ltda (academic grant), from an unrestricted investigator-generated proposal.

Authors' contributions

ERS and RS participated in all steps of the study. PMP participated in the design of the study, in data analysis and manuscript review. EA participated in study design and in the RT-PCR essays. FEP, LSD and JLPM participated in the RT-PCR essays. RM and EES performed the statistical analysis and have reviewed the manuscript. MHJ participated in the data collection. OS and JDR participated in the conception and design of the study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by Abbott Laboratórios do Brasil Ltda (academic grant), from an unrestricted investigator-generated proposal.

Author details

¹Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil. ²Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ³Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. ⁴Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil. ⁵Pediatric Respiriology, Department of Pediatrics, PUCRS, Av. Ipiranga, 6690, IPB-PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Received: 26 July 2012 Accepted: 21 January 2013

Published: 25 January 2013

References

1. *Global action plan for prevention and control of pneumonia (GAPP)*. http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241596336/en/.
2. Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J: **Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness**. *J Med Virol* 2006, **78**(11):1498–1504.
3. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, et al: **Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis**. *Lancet* 2010, **375**(9725):1545–1555.
4. Pitrez PM, Stein RT, Stuermer L, Macedo IS, Schmitt VM, Jones MH, Arruda E: **Rhinovirus and acute bronchiolitis in young infants**. *J Pediatr (Rio J)* 2005, **81**(5):417–420.
5. van der Zalm MM, Uiterwaal CS, Wilbrink B, de Jong BM, Verheij TJ, Kimpen JL, van der Ent CK: **Respiratory pathogens in respiratory tract illnesses during the first year of life: a birth cohort study**. *Pediatr Infect Dis J* 2009, **28**(6):472–476.
6. Miller EK, Williams JV, Gebretsadik T, Carroll KN, Dupont WD, Mohamed YA, Morin LL, Heil L, Minton PA, Woodward K, et al: **Host and viral factors**

- associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. *J Allergy Clin Immunol* 2011, **127**(4):883-891.
7. Miller EK, Bugna J, Libster R, Shepherd BE, Scalzo PM, Acosta PL, Hijano D, Reynoso N, Bataille JP, Coviello S, et al: Human rhinoviruses in severe respiratory disease in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2012, **129**(1):e60-e67.
 8. Jackson DJ, Johnston SL: The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010, **125**(6):1178-1187. quiz 1188-1179.
 9. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, Printz MC, Lee WM, Shult PA, Reisdorf E, et al: Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med* 2008, **178**(7):667-672.
 10. Calvo C, García-García ML, Blanco C, Vazquez MC, Frías ME, Perez-Brena P, Casas I: Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2008, **42**(3):268-272.
 11. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajchouan A, Bagnaud A, Billaud G, Vernet G, Lina B, Floret D, 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, **27**(3):213-217.
 12. De Paulis M, Gilio AE, Ferraro AA, Ferronato AE, do Sacramento PR, Botosso VF, Oliveira DB, Marinheiro JC, Harsi CM, Durigon EL, et al: Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr (Rio J)* 2011, **87**(4):307-313.
 13. Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le Roux P, Deschildre A, Forget C, Couderc T, Siret D, Donnou MD, Bubenheim M, et al: In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One* 2009, **4**(2):e4596.
 14. Suryadevara M, Cummings E, Bonville CA, Bartholoma N, Riddell S, Kiska D, Rosenberg HF, Domachowski JB: Viral etiology of acute febrile respiratory illnesses in hospitalized children younger than 24 months. *Clin Pediatr* 2011, **50**(6):513-517.
 15. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, Gilio AE, Stwien KE, Erdman DD, Durigon EL: Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 2007, **83**(5):422-428.
 16. Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, Gourgiotis D, Kafetzis D: Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**(9):1285-1289.
 17. Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hubinger AM, Geikowski T, Glatzel T, Lentze MJ, Bode U, Simon A: Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr* 2006, **165**(7):467-475.
 18. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr: Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004, **350**(5):443-450.
 19. 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):1133-1137.
 20. Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, Leistner-Segal S: Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011, **106**(1):56-60.
 21. García CG, Bhoire R, Soriano-Fallas A, Trost M, Chason R, Ramilo O, Mejias A: Risk Factors in Children Hospitalized With RSV Bronchiolitis Versus Non-RSV Bronchiolitis. *Pediatrics* 2010, **126**(6):e1453-e1460.
 22. Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, Pierangeli A, Antonelli G, De Angelis D, Berardi R, Moretti C: Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants. *Arch Dis Child* 2010, **95**(1):35-41.
 23. Moriyama Y, Hamada H, Okada M, Tsuchiya N, Maru H, Shirato Y, Maeda Y, Hirose Y, Yoshida M, Omura Y, et al: Distinctive clinical features of human bocavirus in children younger than 2 years. *Eur J Pediatr* 2010, **169**(9):1087-1092.
 24. Zhang SX, Tellier R, Zafar R, Cheung R, Adachi D, Richardson SE: Comparison of human metapneumovirus infection with respiratory syncytial virus infection in children. *Pediatr Infect Dis J* 2009, **28**(11):1022-1024.
 25. Bezerra PG, Britto MC, Correia JB, Duarte Mdo C, Fonseca AM, Rose K, Hopkins MJ, Cuevas LE, McNamara PS: Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLoS One* 2011, **6**(4):e18928.
 26. Venter M, Lassauniere R, Kresfelder TL, Westerberg Y, Visser A: Contribution of common and recently described respiratory viruses to annual hospitalizations in children in South Africa. *J Med Virol* 2011, **83**(8):1458-1468.
 27. Fuji N, Suzuki A, Lupisan S, Sombrero L, Galang H, Kamigaki T, Tamaki R, Saito M, Aniceto R, Olveda R, et al: Detection of human rhinovirus C viral genome in blood among children with severe respiratory infections in the Philippines. *PLoS One* 2011, **6**(11):e27247.
 28. Linsuwanon P, Payungporn S, Samransamruajkit R, Posuwan N, Makkoch J, Theanbooniers A, Poovorawan Y: High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. *J Infect* 2009, **59**(2):115-121.
 29. Lemanske RF Jr, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, Kirk CJ, Reisdorf E, Roberg KA, Anderson EL, et al: Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005, **116**(3):571-577.
 30. Jackson DJ, Evans MD, Gangnon RE, Tisler CJ, Pappas TE, Lee WM, Gern JE, Lemanske RF Jr: Evidence for a causal relationship between allergic sensitization and rhinovirus wheezing in early life. *Am J Respir Crit Care Med* 2012, **185**(3):281-285.
 31. Xatzipsalti M, Psarros F, Konstantinou G, Gaga M, Gourgiotis D, Savoni-Papageorgiou P, Papadopoulos NG: Modulation of the epithelial inflammatory response to rhinovirus in an atopic environment. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2008, **38**(3):466-472.
 32. Mahony JB: Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**(4):716-747.
 33. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001, **7**(6):719-724.
 34. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH: Undiagnosed respiratory viruses in children. *Pediatrics* 2008, **121**(3):e631-e637.
 35. Zheng LS, Yuan XH, Xie ZP, Jin Y, Gao HC, Song JR, Zhang RF, Xu ZQ, Hou YD, Duan ZJ: Human bocavirus infection in young children with acute respiratory tract infection in Lanzhou, China. *J Med Virol* 2010, **82**(2):282-288.

doi:10.1186/1471-2334-13-41

Cite this article as: da Silva et al.: Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors. *BMC Infectious Diseases* 2013 **13**:41.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Anexo 2- Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

As infecções respiratórias baixas, como a pneumonia, são uma das principais causas de hospitalização em crianças abaixo de 5 anos. Elas podem ser causadas por vários tipos de germes (micróbios). Existem dois grandes grupos de germes que causam pneumonia: as bactérias e os vírus. Nesta pesquisa tentaremos identificar quais são os principais germes que causam pneumonias em nossas crianças; quais são os germes mais comuns e qual é a agressividade de cada um deles. Para isso, é necessário que possamos ter acesso aos dados dos exames de raio-x e de laboratório de seu (sua) filho(a). Entre os exames que serão feitos, nenhum envolve sofrimento desnecessário (como injeções ou coletas de material) além do que normalmente a equipe iria pedir em um caso semelhante ao de seu filho. Ou seja, todos os procedimentos que serão feitos são necessários e são sempre realizados em todas as crianças com infecção respiratória como seu filho. Entre estes exames, será enviado material da aspiração do nariz para um laboratório externo a fim de pesquisar outros vírus que causam doença respiratória, com métodos mais avançados. Além disso, os exames de raio-x serão também avaliados por médicos especialistas além dos que habitualmente analisam os exames no hospital. Queremos também saber informações sobre a família, a criança e seu meio ambiente para podermos ter ideia de quais são os fatores de risco associados a estas doenças.

Todos os dados da pesquisa são confidenciais, e o abandono da pesquisa, por parte da criança ou familiar pode ser feito a qualquer momento, sem que haja qualquer forma de prejuízo no tratamento. Os pesquisadores garantem o direito a perguntas ou esclarecimentos específicos sobre os procedimentos realizados, ou sobre os resultados obtidos.

As informações obtidas neste estudo são muito importantes para que se possa conhecer mais sobre as infecções respiratórias, portanto a participação de seu(sua) filho(a) é muito valiosa.

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre todos os procedimentos que serão feitos e os possíveis desconfortos, riscos e benefícios associados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas, e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento. Além disso, sei que as informações obtidas durante o estudo são confidenciais e privadas, e que poderei retirar meu filho(a) do estudo a qualquer momento.

Caso necessite, poderei chamar o coordenador da pesquisa, o Dr. Emerson Rodrigues da Silva pelo telefone 51-9984-0139 ou 54-3226-1223, assim com o Dr. Renato Stein, pelo telefone 51-3384-5104 e o Comitê de Ética em Pesquisa no telefone 51-3320-3345 caso tenha alguma dúvida sobre meus direitos como participante deste estudo.

Declaro que recebi cópia do presente consentimento, ficando outra cópia sob os cuidados do pesquisador responsável.

Nome do responsável: _____

Ass: _____ Data: ___/___/___

Nome do entrevistador: _____

Ass.: _____ Data: ___/___/___

Anexo 3 - Primers e probes usados na identificação viral

VÍRUS	PRIMER	SEQUENCE 5'-3'	Target Gene	REF.
RSVA	A21	GCTCTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA	Nucleoprotein	1
	A102	TGCTCCGTTGCATGGTGTATT		
	APB48	FAM-ACACTCAACAAAGATCAACTCTGTC-TAMRA		
RSVB	B17	GATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAA	Nucleoprotein	1
	B120	TGTCAATATTATCTCTGTACTACGTTGAA		
	BPB45	JOE-TGATACATTAAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCCA-TAMRA		
FLUAV	INFA-1	GGACTGCAGCGTAGACGCTT	Matrix	2
	INFA-2	CATCCTGTTGTATATGAGGCCCAT		
	INFA-3	CATTCTGTTGTATATGAGGCCCAT		
	INFA Probe	FAM-CTCAGTTATTCTGCTGGTGCACCTGCCA-TAMRA		
FLUBV	INFB-1	AAATACGGTGGATTAATAAAAGCAA	Hemaglutinin	2
	INFB-2	CCAGCAATAGCTCCGAAGAAA		
	INFB PROBE	JOE-CACCCATATTGGGCAATTCCTATGGC-TAMRA		
HRV	HRV Forward	GCACTTCTGTTTCCCC	5'NTR	3
	HRV Reverse	GGCAGCCACGCAGGCT		
	HRV1 probe	FAM-AGCCTCATCTGCCAGGTCTA-MGB		
	HRV2 probe	VIC-AGCCTCATCGACCAAACTA-MGB		
HMPV	HMPV-A forward	GCC GTT AGC TTC AGT CAA TTC AA	Fusion	4
	HMPVA reverse	TCC AGC ATT GTC TGA AAA TTG C		
	HMPVA Probe	6FAM-CAA CAT TTA GAA ACC TTC T-MGBNFQ		
	HMPVB Forward	GCT GTC AGC TTC AGT CAA TTC AA		
	HMPVB Reverse	GTT ATC CCT GCA TTG TCT GAA AAC T		
	HMPVB probe	6FAM-CGC ACA ACA TTT AGG AAT CTT CT-MGBNFQ		
Hadv	Adeno1	GCCACGGTGGGGTTTCTAACTT	Hexon gene	5
	Adeno2	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC		
	Adeno probe	FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-TAMRA		
HBov	HBov Forward	GCACAGCCACGTGACGAA	NP1	6
	HBov Reverse	TGGACTCCCTTTTCTTTGTAGGA		
	HBov probe	JOE-TGAGCTCAGGGAATATGAAAGACAAGCATCG-TAMRA		
HPVI 1	Para1 Forward	ACAGATGAAATTTTCAAGTGCTACTTTAGT	Polimerase	7
	Para1 reverse	GCCTCTTTTAATGCCATATTATCATTAGA		
	Para1 probe	FAM-ATGGTAATAAATCGACTCGCT-MGB		
HPVI 3	Para3 forward	CTC GAG GTT GTC AGG ATA TAG	Hemaglutinin and Neuraminidase	8
	Para3 reverse	CTT GGG AGT TGA ACA CAG TT		

	Para3 sonda	FAM-AAT AAC TGT AAA CTC AGA CTT GGT ACC TGA CTT-TAMRA		
HCoV 229E	Corona F3	TGGCGGGTGGGATAATATGT	Polimerase 1b gene	9
	Corona R3	GAGGGCATAGCTCTATCACACTTAGG		
	Corona P2	VIC-ATAGTCCCATCCCATCAA-MGB		
HCoV C43	Corona F-OC	CCTTATTAAGATGTTGACAATCCTGTAC	Polimerase 1b gene	9
	Corona R-OC	AATACGTAGTAGGTTTGGCATAGCAC		
	Corona P-OC	FAM-CACACTTAGGATAGTCCCA-MGB		
β-Actina	β-Actina For.	CCCAGCCATGTACGTTGCTA	β-Actine	10
	β-Actina Rev.	TCACCGGAGTCCATCACGAT		
	β-Actina Probe	VIC-ACGCCTCTGGCCGTACCACTGG-TAMRA		
5'NTR (not translated region)				

Referências do Anexo 3:

- 1- Hu A, Colella M, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):149-54.
- 2- van Elden LJ, Nijhuis M, Schipper P, Schuurman R, van Loon AM. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 2001 Jan;39(1):196-200
- 3- Deffernez C, Wunderli W, Thomas Y, Yerly S, Perrin L, Kaiser L. Amplicon sequencing and improved detection of human rhinovirus in respiratory samples. *J Clin Microbiol.* 2004 Jul;42(7):3212-8.
- 4- Kuypers J, Wright N, Corey L, Morrow R. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. *J Clin Virol* 2005 (33): 299–305.
- 5- Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol.* 2003 Jun;70(2):228-39.
- 6- Neske F, Blessing K, Tollmann F, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol.* 2007 Jul;45(7):2116-22.
- 7- Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J et al. Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children. *J Clin Microbiol*, July 2006, p. 2382–2388.
- 8- Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W et al. Lower respiratory viral illnesses: improved diagnosis by molecular methods and clinical impact. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Dec 1;170(11):1197-203.
- 9- Kuypers J, Martin ET, Heugel J, Wright N, Morrow R, Englund JA. Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics.* 2007 Jan;119(1):e70-6.
- 10- Nystrom K, Biller M, Grahn A, Lindh M, Larson G, Olofsson S. Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus 1-infected human diploid cells. *J Virol Methods.* 2004 Jun 15;118(2):83-94.

Anexo 4 - Questionário do Estudo

PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS – PROVIRI

Coletador do aspirado: _____

Coletador do questionário: _____

1) Dados do paciente:

1.1) Nome: _____

Nome da mãe: _____

1.2) Registro: _____ 1.3) Telefone contato: _____

1.4) Data de nascimento: ____/____/200__

1.5) Endereço: _____

1.6) Cidade: _____ 1.7) Data internação: ____/____/200__

1.8) Peso na internação: ____, ____ Kg

1.9) Hospital de Recrutamento: _____

1.10) Unidade: 1-Emergência 2-Internação 3-CTI Pediátrica

2) Tratamento na internação

2.1. Medicações em uso 1-Beta-2 2-Corticóide oral 3-Corticóide EV
4-Antibiótico (Se não estiver em uso de antibiótico, pular para 3)

2.2) Qual antibiótico? _____

2.3) Via: 1-EV 2-VO

2.4) Antibiótico iniciado nesta internação: 1-sim

2-uso anterior à chegada ao Serviço

3) História Familiar:

- | | Pai | Mãe | Irmãos |
|---|---|---|---|
| 3.1) Asma | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não |
| 3.2) Rinite alérgica | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não |
| 3.3) Eczema atópico | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não |
| 3.4) Tabagismo | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não |
| 3.5) Tabagismo na gestação | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não |
| 3.6) Número de pessoas na casa: _____ | | | |
| 3.7) Frequentada creche > 3 turnos/ semana: | | 1- <input type="checkbox"/> sim 2- <input type="checkbox"/> não | |
| 3.8) Número de irmãos: _____ | | | |

4) História pregressa:

- 4.1) Nasceu antes da data prevista (é prematuro)? 1-sim 2-não
- 4.2) É a primeira vez que tem chiado? 1-sim 2-não
- 4.3) Se já teve chiado antes, quantas vezes nos últimos 12 meses?
 1 vez 2 vezes 3 ou mais vezes
- 4.4) Internação prévia: 1-sim 2-não
Se sim, motivo principal: _____
- 4.5) História pessoal de rinite alérgica: 1-sim 2-não
- 4.6) História de “alergia de pele”: 1-sim 2-não
- 4.7) História de chiado no peito: 1-sim 2-não
- 4.8) Uso prévio de aerolin ou berotec: 1-sim 2-não
- 4.9) Uso recente de antibiótico: 1-sim 2-não
- 4.10) Vacinação para Influenza: 1-sim 2-não 3-não sabe

5) Clínica:

- 5.1) F.R.: ____ rpm 5.2) FC: ____ bpm 5.3) Sat. O2:
____%
- 5.4) Uso de O2: 1-sim 2-não 5.5) Tiragem: 1-sim 2-não

6) Hemograma: 1-sim 2-não

6.1) Hemoglobina: _____ 6.2) Hematócrito: ____%

6.3) Leucócitos totais: _____

6.4) Neutrófilos: ____% 6.5) Bastonados: ____% 6.6)

Linfócitos: ____%

6.7) Monócitos: ____% 6.8) Eosinófilos: ____% 6.9) Mielócitos: ____%

6.10) Metamielócitos: ____% 6.11) Plaquetas: _____

6.12) Granulações tóxicas em neutrófilos: 1-sim 2-não

7) Imunofluorescência para Vírus realizada: 1-sim 2-não

Resultado positivo:

7.1) VSR 1-sim 2-não

7.2) Influenza 1-sim 2-não

7.3) Parainfluenza 1-sim 2-não

7.4) Adenovírus 1-sim 2-não

8. PCR para vírus: 1-sim 2-não

Resultado positivo:

8.1) VSR 1-sim 2-não

8.2) Influenza 1-sim 2-não

8.3) Rinovírus 1-sim 2-não

8.4) Metapneumovirus 1-sim 2-não

Anexo 5 - Questionário Pós-Alta Hospitalar

PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS – PROVIRI – ALTA HOSPITALAR

1) Dados do paciente:

1.1) Nome: _____

1.2) Registro: _____ 1.3) Hospital : _____

2) Tratamento na internação

2.1) Data de internação: __/__/__ Data de alta: __/__/__

2.2) Dias em uso de O2: Início: __/__/__ Fim: __/__/__

2.3) Dias internado(a) em CTIP: Início: __/__/__ Fim: __/__/__

2.4) Dias em VM: Início: __/__/__ Fim: __/__/__

2.5) Sibilância até que data: __/__/__

2.6) Dias de uso de antibiótico: Início: __/__/__ Fim: __/__/__ 1-EV 2-VO

2.7) Qual antibiótico? _____

2.8) Uso de corticóide sistêmico? 1-sim 2-não

2.9) Uso de beta-2? 1-sim 2-não

2.10) Tempo de uso de O2 suplementar: _____ horas

Anexo 6 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUC/RS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 0221/07-CEP

Porto Alegre, 13 de março de 2007.

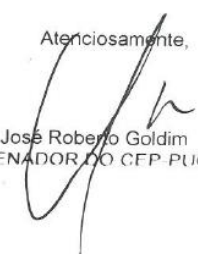
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03467, intitulado:
"Infecção respiratória baixa em crianças: aspectos epidemiológicos".

Sua investigação está autorizada a partir da
presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser
entregues a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Renato Tetelbom Stein
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucls.br
www.pucrs.br/prppg/cep

Anexo 7 – Licença de publicação

Assunto: 00499568 re:Copyright authoriza on ref paper #1454580594768307 3
De: "\"Jesus Ramos Jr\" <info@biomedcentral.com>" <info@biomedcentral.com>
Data: 27/11/2013 22:10
Para: "ersilva9@gmail.com" <ersilva9@gmail.com>

Dear Dr Silva

Thank you for contacting BioMed Central.

The article you refer to is an open access publication. Therefore you are free to use the article for the purpose required, as long as its integrity is maintained and its original authors, citation details and publisher are identified.

For detailed information about the terms please refer to the open access license:

<http://www.biomedcentral.com/about/license> .

If you have any questions please do not hesitate to contact me.
Best wishes

Jesus Ramos Jr
Customer Services
info@biomedcentral.com
www.biomedcentral.com

-----Your Question/Comment -----

To BMC Infectious Disease:

Although knowing that BMC is an open journal, I need to add inside my Ph. D. thesis the paper that I and my colleagues have published in BMC Infectious Diseases. The thesis will be published and will remain available in the University's library and added in the University Thesis Database.

"Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors"

Our University requests a formal written agreement from the publisher. Could you tell me the proper BMC department that could help me with this?

Since now, thank you very much!

This License constitutes the entire agreement between the parties with respect to the Work licensed here. There are no understandings, agreements or representations with respect to the Work not specified here. Licensor shall not be bound by any additional provisions that may appear in any communication from You. This License may not be modified without the mutual written agreement of the Licensor and You.

BioMed Central copyright and license agreement

In submitting a research article ('article') to any of the journals published by BioMed Central Ltd ('BioMed Central') I certify that:

1. I am authorized by my co-authors to enter into these arrangements.
2. I warrant, on behalf of myself and my co-authors, that:
 - a. the article is original, has not been formally published in any other peer-reviewed journal, is not under consideration by any other journal and does not infringe any existing copyright or any other third party rights;
 - b. I am/we are the sole author(s) of the article and have full authority to enter into this agreement and in granting rights to BioMed Central are not in breach of any other obligation. If the law requires that the article be published in the public domain, I/we will notify BioMed Central at the time of submission upon which clauses 3 through 6 inclusive do not apply;
 - c. the article contains nothing that is unlawful, libellous, or which would, if published, constitute a breach of contract or of confidence or of commitment given to secrecy;
 - d. I/we have taken due care to ensure the integrity of the article. To my/our - and currently accepted scientific - knowledge all statements contained in it purporting to be facts are true and any formula or instruction contained in the article will not, if followed accurately, cause any injury, illness or damage to the user.

And I agree to the following license agreement:

BioMed Central Open Access license agreement

Brief summary of the agreement

Anyone is free:

- to copy, distribute, and display the work;
- to make derivative works;

- to make commercial use of the work;

Under the following conditions: Attribution

- the original author must be given credit;
- for any reuse or distribution, it must be made clear to others what the license terms of this work are;
- any of these conditions can be waived if the authors gives permission.

Statutory fair use and other rights are in no way affected by the above.

Full BioMed Central Open Access license agreement

(Identical to the '[Creative Commons Attribution License](#)')

License

THE WORK (AS DEFINED BELOW) IS PROVIDED UNDER THE TERMS OF THIS BIOMED CENTRAL OPEN ACCESS LICENSE ("LICENSE"). THE WORK IS PROTECTED BY COPYRIGHT AND/OR OTHER APPLICABLE LAW. ANY USE OF THE WORK OTHER THAN AS AUTHORIZED UNDER THIS LICENSE IS PROHIBITED.

BY EXERCISING ANY RIGHTS TO THE WORK PROVIDED HERE, YOU ACCEPT AND AGREE TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LICENSE. THE LICENSOR GRANTS YOU THE RIGHTS CONTAINED HERE IN CONSIDERATION OF YOUR ACCEPTANCE OF SUCH TERMS AND CONDITIONS.

1. Definitions

- "Collective Work"** means a work, such as a periodical issue, anthology or encyclopedia, in which the Work in its entirety in unmodified form, along with a number of other contributions, constituting separate and independent works in themselves, are assembled into a collective whole. A work that constitutes a Collective Work will not be considered a Derivative Work (as defined below) for the purposes of this License.
- "Derivative Work"** means a work based upon the Work or upon the Work and other pre-existing works, such as a translation, musical arrangement, dramatization, fictionalization, motion picture version, sound recording, art reproduction, abridgment, condensation, or any other form in which the Work may be recast, transformed, or adapted, except that a work that constitutes a Collective Work will not be considered a Derivative Work for the purpose of this License. For the avoidance of doubt, where the Work is a musical composition or sound recording, the synchronization of the Work in timed-relation with a moving image ("synching") will be considered a Derivative Work for the purpose of this License.
- "Licensor"** means the individual or entity that offers the Work under the terms of this License.
- "Original Author"** means the individual or entity who created the Work.
- "Work"** means the copyrightable work of authorship offered under the terms of this License.

- f. **"You"** means an individual or entity exercising rights under this License who has not previously violated the terms of this License with respect to the Work, or who has received express permission from the Licensor to exercise rights under this License despite a previous violation.

2. Fair Use Rights

Nothing in this license is intended to reduce, limit, or restrict any rights arising from fair use, first sale or other limitations on the exclusive rights of the copyright owner under copyright law or other applicable laws.

3. License Grant

Subject to the terms and conditions of this License, Licensor hereby grants You a worldwide, royalty-free, non-exclusive, perpetual (for the duration of the applicable copyright) license to exercise the rights in the Work as stated below:

- a. to reproduce the Work, to incorporate the Work into one or more Collective Works, and to reproduce the Work as incorporated in the Collective Works;
- b. to create and reproduce Derivative Works;
- c. to distribute copies or phonorecords of, display publicly, perform publicly, and perform publicly by means of a digital audio transmission the Work including as incorporated in Collective Works;
- d. to distribute copies or phonorecords of, display publicly, perform publicly, and perform publicly by means of a digital audio transmission Derivative Works;
- e. For the avoidance of doubt, where the work is a musical composition:
 - i. **Performance Royalties Under Blanket Licenses.** Licensor waives the exclusive right to collect, whether individually or via a performance rights society (e.g. ASCAP, BMI, SESAC), royalties for the public performance or public digital performance (e.g. webcast) of the Work.
 - ii. **Mechanical Rights and Statutory Royalties.** Licensor waives the exclusive right to collect, whether individually or via a music rights agency or designated agent (e.g. Harry Fox Agency), royalties for any phonorecord You create from the Work ("cover version") and distribute, subject to the compulsory license created by 17 USC Section 115 of the US Copyright Act (or the equivalent in other jurisdictions).
- f. **Webcasting Rights and Statutory Royalties.** For the avoidance of doubt, where the Work is a sound recording, Licensor waives the exclusive right to collect, whether individually or via a performance-rights society (e.g. SoundExchange), royalties for the public digital performance (e.g. webcast) of the Work, subject to the compulsory license created by 17 USC Section 114 of the US Copyright Act (or the equivalent in other jurisdictions).

The above rights may be exercised in all media and formats whether now known or hereafter devised. The above rights include the right to make such modifications as are technically necessary to exercise the rights in other media and formats. All rights not expressly granted by Licensor are hereby reserved.

4. Restrictions

The license granted in Section 3 above is expressly made subject to and limited by the

following restrictions:

- a. You may distribute, publicly display, publicly perform, or publicly digitally perform the Work only under the terms of this License, and You must include a copy of, or the Uniform Resource Identifier for, this License with every copy or phonorecord of the Work You distribute, publicly display, publicly perform, or publicly digitally perform. You may not offer or impose any terms on the Work that alter or restrict the terms of this License or the recipients' exercise of the rights granted hereunder. You may not sublicense the Work. You must keep intact all notices that refer to this License and to the disclaimer of warranties. You may not distribute, publicly display, publicly perform, or publicly digitally perform the Work with any technological measures that control access or use of the Work in a manner inconsistent with the terms of this License Agreement. The above applies to the Work as incorporated in a Collective Work, but this does not require the Collective Work apart from the Work itself to be made subject to the terms of this License. If You create a Collective Work, upon notice from any Licensor You must, to the extent practicable, remove from the Collective Work any reference to such Licensor or the Original Author, as requested. If You create a Derivative Work, upon notice from any Licensor You must, to the extent practicable, remove from the Derivative Work any reference to such Licensor or the Original Author, as requested.
- b. If you distribute, publicly display, publicly perform, or publicly digitally perform the Work or any Derivative Works or Collective Works, You must keep intact all copyright notices for the Work and give the Original Author credit reasonable to the medium or means You are utilizing by conveying the name (or pseudonym if applicable) of the Original Author if supplied; the title of the Work if supplied; to the extent reasonably practicable, the Uniform Resource Identifier, if any, that Licensor specifies to be associated with the Work, unless such URI does not refer to the copyright notice or licensing information for the Work; and in the case of a Derivative Work, a credit identifying the use of the Work in the Derivative Work (e.g., "French translation of the Work by Original Author," or "Screenplay based on original Work by Original Author"). Such credit may be implemented in any reasonable manner; provided, however, that in the case of a Derivative Work or Collective Work, at a minimum such credit will appear where any other comparable authorship credit appears and in a manner at least as prominent as such other comparable authorship credit.

5. Representations, Warranties and Disclaimer

UNLESS OTHERWISE MUTUALLY AGREED TO BY THE PARTIES IN WRITING, LICENSOR OFFERS THE WORK AS-IS AND MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND CONCERNING THE WORK, EXPRESS, IMPLIED, STATUTORY OR OTHERWISE, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, WARRANTIES OF TITLE, MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, NONINFRINGEMENT, OR THE ABSENCE OF LATENT OR OTHER DEFECTS, ACCURACY, OR THE PRESENCE OF ABSENCE OF ERRORS, WHETHER OR NOT DISCOVERABLE. SOME JURISDICTIONS DO NOT ALLOW THE EXCLUSION OF IMPLIED WARRANTIES, SO SUCH EXCLUSION MAY NOT APPLY TO YOU.

6. Limitation on Liability

EXCEPT TO THE EXTENT REQUIRED BY APPLICABLE LAW, IN NO EVENT WILL LICENSOR BE LIABLE TO YOU ON ANY LEGAL THEORY FOR ANY SPECIAL, INCIDENTAL, CONSEQUENTIAL, PUNITIVE OR EXEMPLARY DAMAGES ARISING OUT OF THIS LICENSE OR THE USE OF THE WORK, EVEN IF LICENSOR HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES.

7. Termination

- a. This License and the rights granted hereunder will terminate automatically upon any breach by You of the terms of this License. Individuals or entities who have received Derivative Works or Collective Works from You under this License, however, will not have their licenses terminated provided such individuals or entities remain in full compliance with those licenses. Sections 1, 2, 5, 6, 7, and 8 will survive any termination of this License.
- b. Subject to the above terms and conditions, the license granted here is perpetual (for the duration of the applicable copyright in the Work). Notwithstanding the above, Licensor reserves the right to release the Work under different license terms or to stop distributing the Work at any time; provided, however that any such election will not serve to withdraw this License (or any other license that has been, or is required to be, granted under the terms of this License), and this License will continue in full force and effect unless terminated as stated above.

8. Miscellaneous

- a. Each time You distribute or publicly digitally perform the Work or a Collective Work, the Licensor offers to the recipient a license to the Work on the same terms and conditions as the license granted to You under this License.
- b. Each time You distribute or publicly digitally perform a Derivative Work, Licensor offers to the recipient a license to the original Work on the same terms and conditions as the license granted to You under this License.
- c. If any provision of this License is invalid or unenforceable under applicable law, it shall not affect the validity or enforceability of the remainder of the terms of this License, and without further action by the parties to this agreement, such provision shall be reformed to the minimum extent necessary to make such provision valid and enforceable.
- d. No term or provision of this License shall be deemed waived and no breach consented to unless such waiver or consent shall be in writing and signed by the party to be charged with such waiver or consent.
- e. This License constitutes the entire agreement between the parties with respect to the Work licensed here. There are no understandings, agreements or representations with respect to the Work not specified here. Licensor shall not be bound by any additional provisions that may appear in any communication from You. This License may not be modified without the mutual written agreement of the Licensor and You.

BIBLIOGRAFIA

1. Rudan I, O'Brien KL, Nair H, Liu L, Theodoratou E, Qazi S, et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. *Journal of global health*. 2013 Jun;3(1):10401. PubMed PMID: 23826505. Pubmed Central PMCID: PMC3700032. Epub 2013/07/05. eng.
2. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010 May 1;375(9725):1545-55. PubMed PMID: 20399493. Pubmed Central PMCID: 2864404.
3. Lanata CF, Rudan I, Boschi-Pinto C, Tomaskovic L, Cherian T, Weber M, et al. Methodological and quality issues in epidemiological studies of acute lower respiratory infections in children in developing countries. *International Journal of Epidemiology*. 2004 December 1, 2004;33(6):1362-72.
4. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clinical microbiology reviews*. 2010 Jan;23(1):74-98. PubMed PMID: 20065326. Pubmed Central PMCID: 2806659.
5. 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. PubMed PMID: 19240806. Pubmed Central PMCID: PMC2644758. Epub 2009/02/26. eng.
6. Zhang L, Mendoza-Sassi RA, Wainwright C, Klassen TP. Nebulised hypertonic saline solution for acute bronchiolitis in infants. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2013;7:CD006458. PubMed PMID: 23900970.
7. Ramilo O, Mejias A. [Recent advances in the treatment of bronchiolitis: perspectives for 2013]. *Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)*. 2013 Apr;78(4):205-7. PubMed PMID: 23522089. Epub 2013/03/26. Novedades en el tratamiento de la bronquiolitis: perspectivas en el 2013. spa.
8. Hemming VG. Viral respiratory diseases in children: classification, etiology, epidemiology, and risk factors. *The Journal of pediatrics*. 1994 May;124(5 Pt 2):S13-6. PubMed PMID: 8169752.
9. Wong CM, Thach TQ, Chau PY, Chan EK, Chung RY, Ou CQ, et al. Part 4. Interaction between air pollution and respiratory viruses: time-series study of daily mortality and hospital admissions in Hong Kong. *Research report (Health Effects Institute)*. 2010 Nov(154):283-362. PubMed PMID: 21446214. Epub 2011/03/31. eng.
10. Dherani M, Pope D, Mascarenhas M, Smith KR, Weber M, Bruce N. Indoor air pollution from unprocessed solid fuel use and pneumonia risk in children aged under five years: a systematic review and meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008 May;86(5):390-8C. PubMed PMID: 18545742. Pubmed Central PMCID: 2647443.

11. Po JY, FitzGerald JM, Carlsten C. Respiratory disease associated with solid biomass fuel exposure in rural women and children: systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2011 Mar;66(3):232-9. PubMed PMID: 21248322.
12. Ciencewicky J, Jaspers I. Air Pollution and Respiratory Viral Infection. *Inhalation Toxicology*. 2007;19(14):1135-46. PubMed PMID: 17987465.
13. Ghani AS, Morrow BM, Hardie DR, Argent AC. An investigation into the prevalence and outcome of patients admitted to a pediatric intensive care unit with viral respiratory tract infections in Cape Town, South Africa. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 2012 Sep;13(5):e275-81. PubMed PMID: 22596071. Epub 2012/05/19. eng.
14. Garcia C, Soriano-Fallas A, Lozano J, Leos N, Gomez AM, Ramilo O, et al. Decreased innate immune cytokine responses correlate with disease severity in children with respiratory syncytial virus and human rhinovirus bronchiolitis. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012 Jan;31(1):86-9. PubMed PMID: 21829141. Epub 2011/08/11. eng.
15. Mella C, Suarez-Arrabal MC, Lopez S, Stephens J, Fernandez S, Hall MW, et al. Innate immune dysfunction is associated with enhanced disease severity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of infectious diseases*. 2013 Feb 15;207(4):564-73. PubMed PMID: 23204162. Pubmed Central PMCID: PMC3611762. Epub 2012/12/04. eng.
16. Chidlow GR, Laing IA, Harnett GB, Greenhill AR, Phuanukoannon S, Siba PM, et al. Respiratory viral pathogens associated with lower respiratory tract disease among young children in the highlands of Papua New Guinea. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012 Jul;54(3):235-9. PubMed PMID: 22595309. Pubmed Central PMCID: PMC3383990. Epub 2012/05/19. eng.
17. Johnson AW, Osinusi K, Aderele WI, Gbadero DA, Olaleye OD, Adeyemi-Doro FA. Etiologic agents and outcome determinants of community-acquired pneumonia in urban children: a hospital-based study. *Journal of the National Medical Association*. 2008 Apr;100(4):370-85. PubMed PMID: 18481475. Epub 2008/05/17. eng.
18. 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. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2010 Aug;48(4):239-45. PubMed PMID: 20646956. Epub 2010/07/22. eng.
19. Doan QH, Kisson N, Dobson S, Whitehouse S, Cochrane D, Schmidt B, et al. A randomized, controlled trial of the impact of early and rapid diagnosis of viral infections in children brought to an emergency department with febrile respiratory tract illnesses. *The Journal of pediatrics*. 2009 Jan;154(1):91-5. PubMed PMID: 18814887. Epub 2008/09/26. eng.
20. Doan Q, Enarson P, Kisson N, Klassen TP, Johnson DW. Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the Emergency Department. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2009 (4):CD006452. PubMed PMID: 19821366. Epub 2009/10/13. eng.
21. Shun-Shin M, Thompson M, Heneghan C, Perera R, Harnden A, Mant D. Neuraminidase inhibitors for treatment and prophylaxis of influenza in children: systematic review and meta-

analysis of randomised controlled trials. *Bmj*. 2009;339:b3172. PubMed PMID: 19666987. Pubmed Central PMCID: 2724601.

22. Bekhof J, Bakker J, Reimink R, Wessels M, Langenhorst V, Brand PL, et al. Co-infections in children hospitalised for bronchiolitis: role of roomsharing. *Journal of clinical medicine research*. 2013 Dec;5(6):426-31. PubMed PMID: 24171054. Pubmed Central PMCID: 3808260.

23. Madge P, Paton JY, McColl JH, Mackie PL. Prospective controlled study of four infection-control procedures to prevent nosocomial infection with respiratory syncytial virus. *Lancet*. 1992 Oct 31;340(8827):1079-83. PubMed PMID: 1357462.

24. Mills JM, Harper J, Broomfield D, Templeton KE. Rapid testing for respiratory syncytial virus in a paediatric emergency department: benefits for infection control and bed management. *The Journal of hospital infection*. 2011 Mar;77(3):248-51. PubMed PMID: 21277648.

25. Fixler DE. Respiratory syncytial virus infection in children with congenital heart disease: a review. *Pediatric cardiology*. 1996 May-Jun;17(3):163-8. PubMed PMID: 8662029.

26. Groothuis JR, Gutierrez KM, Lauer BA. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*. 1988 Aug;82(2):199-203. PubMed PMID: 3399292.

27. Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Suffin SC, et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *The New England journal of medicine*. 1986 Jul 10;315(2):77-81. PubMed PMID: 3724802.

28. Jarvis WR, Middleton PJ, Gelfand EW. Parainfluenza pneumonia in severe combined immunodeficiency disease. *The Journal of pediatrics*. 1979 Mar;94(3):423-5. PubMed PMID: 217980.

29. Hadi N, Kashef S, Moazzen M, Pour MS, Rezaei N. Survey of *Mycoplasma pneumoniae* in Iranian children with acute lower respiratory tract infections. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2011 Mar-Apr;15(2):97-101. PubMed PMID: 21503393.

30. Bezerra PG, Britto MC, Correia JB, Duarte Mdo C, Fonseca AM, Rose K, et al. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PloS one*. 2011;6(4):e18928. PubMed PMID: 21533115. Pubmed Central PMCID: 3078930.

31. Vervloet LA, Camargos PA, Soares DR, Oliveira GA, Oliveira JN. Clinical, radiographic and hematological characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Jornal de pediatria*. 2010 Nov-Dec;86(6):480-7. PubMed PMID: 21069252.

32. Tjhie JH, Dorigo-Zetsma JW, Roosendaal R, Van Den Brule AJ, Bestebroer TM, Bartelds AI, et al. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in children with acute respiratory infection in general practices in The Netherlands. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2000;32(1):13-7. PubMed PMID: 10716071.

33. Techasaensiri B, Techasaensiri C, Mejias A, McCracken GH, Jr., Ramilo O. Viral coinfections in children with invasive pneumococcal disease. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010 Jun;29(6):519-23. PubMed PMID: 20051928. Epub 2010/01/07. eng.

34. Hishiki H, Ishiwada N, Fukasawa C, Abe K, Hoshino T, Aizawa J, et al. Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2011 Feb;17(1):87-90. PubMed PMID: 20700753.

35. Plotkowski MC, Puchelle E, Beck G, Jacquot J, Hannoun C. Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *The American review of respiratory disease*. 1986 Nov;134(5):1040-4. PubMed PMID: 3777666.
36. McNamee LA, Harmsen AG. Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and immunity*. 2006 Dec;74(12):6707-21. PubMed PMID: 16982840. Pubmed Central PMCID: 1698099.
37. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, et al. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *The Journal of experimental medicine*. 2008 Feb 18;205(2):323-9. PubMed PMID: 18227219. Pubmed Central PMCID: 2271005.
38. Syrnis MW, Whiley DM, Thomas M, Mackay IM, Williamson J, Siebert DJ, et al. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2004 May;6(2):125-31. PubMed PMID: 15096568. Pubmed Central PMCID: PMC1867476. Epub 2004/04/21. eng.
39. Meerhoff TJ, Houben ML, Coenjaerts FE, Kimpen JL, Hofland RW, Schellevis F, et al. Detection of multiple respiratory pathogens during primary respiratory infection: nasal swab versus nasopharyngeal aspirate using real-time polymerase chain reaction. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2010 Apr;29(4):365-71. PubMed PMID: 20111881. Pubmed Central PMCID: 2840676.
40. Lambert SB, Whiley DM, O'Neill NT, Andrews EC, Canavan FM, Bletchly C, et al. Comparing nose-throat swabs and nasopharyngeal aspirates collected from children with symptoms for respiratory virus identification using real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics*. 2008 Sep;122(3):e615-20. PubMed PMID: 18725388.
41. Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clinical microbiology reviews*. 2008 Oct;21(4):716-47. PubMed PMID: 18854489. Pubmed Central PMCID: 2570148.
42. Gharabaghi F, Tellier R, Cheung R, Collins C, Broukhanski G, Drews SJ, et al. Comparison of a commercial qualitative real-time RT-PCR kit with direct immunofluorescence assay (DFA) and cell culture for detection of influenza A and B in children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008 Jun;42(2):190-3. PubMed PMID: 18374630. Epub 2008/04/01. eng.
43. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *Bmj*. 1995 May 13;310(6989):1225-9. PubMed PMID: 7767192. Pubmed Central PMCID: 2549614.
44. Cerbino Neto J, Penna GO, Werneck GL. Regional differences in mortality associated with pandemic influenza A H1N1 in Brazil. *Cadernos de saude publica*. 2013 Jan;29(1):189-94. PubMed PMID: 23370038. Epub 2013/02/02. eng.
45. Jartti T, Soderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Makela MJ. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatric respiratory reviews*. 2013 Mar;14(1):38-45. PubMed PMID: 23347659.

46. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *Journal of medical virology*. 2004 Apr;72(4):695-9. PubMed PMID: 14981776. Epub 2004/02/26. eng.
47. van Benten I, Koopman L, Niesters B, Hop W, van Middelkoop B, de Waal L, et al. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2003 Oct;14(5):363-70. PubMed PMID: 14641606.
48. Jansen RR, Schinkel J, Koekkoek S, Pajkrt D, Beld M, de Jong MD, et al. Development and evaluation of a four-tube real time multiplex PCR assay covering fourteen respiratory viruses, and comparison to its corresponding single target counterparts. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011 Jul;51(3):179-85. PubMed PMID: 21571585.
49. Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, Leistner-Segal S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011 Feb;106(1):56-60. PubMed PMID: 21340356.
50. Marcone DN, Ellis A, Videla C, Ekstrom J, Ricarte C, Carballal G, et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013 Mar;32(3):e105-10. PubMed PMID: 23190781. Epub 2012/11/30. eng.
51. Arruda E, Hayden FG. Update on therapy of influenza and rhinovirus infections. *Advances in experimental medicine and biology*. 1996;394:175-87. PubMed PMID: 8815685.
52. Arruda LK, Rizzo MC, Chapman MD, Fernandez-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills TA, et al. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in Sao Paulo, Brazil. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1991 Jul;21(4):433-9. PubMed PMID: 1913266.
53. Hayden FG. Update on influenza and rhinovirus infections. *Advances in experimental medicine and biology*. 1999;458:55-67. PubMed PMID: 10549379.
54. Respiratory syncytial virus activity - United States, july 2011-january 2013. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2013 Mar 1;62:141-4. PubMed PMID: 23446512. Epub 2013/03/01. eng.
55. Simoes EA. Respiratory syncytial virus and subsequent lower respiratory tract infections in developing countries: A new twist to an old virus. *The Journal of pediatrics*. 1999 Dec;135(6):657-61. PubMed PMID: 10586163.
56. Nokes DJ, Ngama M, Bett A, Abwao J, Munywoki P, English M, et al. Incidence and severity of respiratory syncytial virus pneumonia in rural Kenyan children identified through hospital surveillance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009 Nov 1;49(9):1341-9. PubMed PMID: 19788358. Pubmed Central PMCID: 2762474.
57. Simoes EA. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. *The Journal of pediatrics*. 2003 Nov;143(5 Suppl):S118-26. PubMed PMID: 14615710.
58. Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate

immune genes. *The Journal of infectious diseases*. 2007 Sep 15;196(6):826-34. PubMed PMID: 17703412.

59. Pinto LA, Stein RT, Ribeiro JD. Genetic associations with asthma and virus-induced wheezing: a systematic review. *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2009 Dec;35(12):1220-6. PubMed PMID: 20126925.

60. From the American Academy of Pediatrics: Policy statements--Modified recommendations for use of palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*. 2009 Dec;124(6):1694-701. PubMed PMID: 19736258. Epub 2009/09/09. eng.

61. Prevention of respiratory syncytial virus infections: indications for the use of palivizumab and update on the use of RSV-IGIV. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee of Fetus and Newborn. *Pediatrics*. 1998 Nov;102(5):1211-6. PubMed PMID: 9794957.

62. 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. *Jornal de pediatria*. 2007 Sep-Oct;83(5):422-8. PubMed PMID: 17940688. Epub 2007/10/18. eng.

63. Bloom-Feshbach K, Alonso WJ, Charu V, Tamerius J, Simonsen L, Miller MA, et al. Latitudinal Variations in Seasonal Activity of Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV): A Global Comparative Review. *PLoS one*. 2013;8(2):e54445. PubMed PMID: 23457451. Pubmed Central PMCID: PMC3573019. Epub 2013/03/05. eng.

64. Miller EK, Lu X, Erdman DD, Poehling KA, Zhu Y, Griffin MR, et al. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. *The Journal of infectious diseases*. 2007 Mar 15;195(6):773-81. PubMed PMID: 17299706.

65. Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *Journal of medical virology*. 2006 Nov;78(11):1498-504. PubMed PMID: 16998894.

66. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *Journal of medical virology*. 2006 Sep;78(9):1232-40. PubMed PMID: 16847968.

67. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, Pozo F, Flecha IC, Perez-Brena P. Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain. *The Pediatric infectious disease journal*. 2007 Oct;26(10):904-8. PubMed PMID: 17901795.

68. Piotrowska Z, Vazquez M, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. Rhinoviruses are a major cause of wheezing and hospitalization in children less than 2 years of age. *The Pediatric infectious disease journal*. 2009 Jan;28(1):25-9. PubMed PMID: 19057454.

69. Tan BH, Loo LH, Lim EA, Kheng Seah SL, Lin RT, Tee NW, et al. Human rhinovirus group C in hospitalized children, Singapore. *Emerging infectious diseases*. 2009 Aug;15(8):1318-20. PubMed PMID: 19751605. Pubmed Central PMCID: 2815983.

70. Xiang Z, Gonzalez R, Xie Z, Xiao Y, Chen L, Li Y, et al. Human rhinovirus group C infection in children with lower respiratory tract infection. *Emerging infectious diseases*. 2008 Oct;14(10):1665-7. PubMed PMID: 18826844. Pubmed Central PMCID: 2609892.

71. Gern JE, Busse WW. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clinical microbiology reviews*. 1999 Jan;12(1):9-18. PubMed PMID: 9880472. Pubmed Central PMCID: 88904.

72. Peltola V, Heikkinen T, Ruuskanen O, Jartti T, Hovi T, Kilpi T, et al. Temporal association between rhinovirus circulation in the community and invasive pneumococcal disease in children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011 Jun;30(6):456-61. PubMed PMID: 21200362.
73. Myatt TA, Johnston SL, Zuo Z, Wand M, Keadze T, Rudnick S, et al. Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004 Jun 1;169(11):1187-90. PubMed PMID: 14754759.
74. Cho GS, Moon BJ, Lee BJ, Gong CH, Kim NH, Kim YS, et al. High rates of detection of respiratory viruses in the nasal washes and mucosae of patients with chronic rhinosinusitis. *Journal of clinical microbiology*. 2013 Mar;51(3):979-84. PubMed PMID: 23325817. Pubmed Central PMCID: PMC3592049. Epub 2013/01/18. eng.
75. Pitrez PM, Stein RT, Stuermer L, Macedo IS, Schmitt VM, Jones MH, et al. [Rhinovirus and acute bronchiolitis in young infants]. *Jornal de pediatria*. 2005 Sep-Oct;81(5):417-20. PubMed PMID: 16247546. Bronquiolite aguda por rinovirus em lactentes jovens.
76. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature medicine*. 2001 Jun;7(6):719-24. PubMed PMID: 11385510. Epub 2001/06/01. eng.
77. Konig B, Konig W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *Journal of clinical microbiology*. 2004 Oct;42(10):4632-5. PubMed PMID: 15472321. Pubmed Central PMCID: 522293.
78. van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, de Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *The Journal of infectious diseases*. 2003 Nov 15;188(10):1571-7. PubMed PMID: 14624384. Epub 2003/11/19. eng.
79. Ulloa-Gutierrez R, Skippen P, Synnes A, Seear M, Bastien N, Li Y, et al. Life-threatening human metapneumovirus pneumonia requiring extracorporeal membrane oxygenation in a preterm infant. *Pediatrics*. 2004 Oct;114(4):e517-9. PubMed PMID: 15466079.
80. Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hubinger AM, Geikowski T, Glatzel T, Lentze MJ, et al. Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *European journal of pediatrics*. 2006 Jul;165(7):467-75. PubMed PMID: 16607540.
81. Jartti T, Jartti L, Ruuskanen O, Soderlund-Venermo M. New respiratory viral infections. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2012 May;18(3):271-8. PubMed PMID: 22366993. Epub 2012/03/01. eng.
82. von Linstow ML, Eugen-Olsen J, Koch A, Winther TN, Westh H, Høgh B. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *European journal of medical research*. 2006 Aug 30;11(8):329-35. PubMed PMID: 17052968.
83. Louie JK, Schnurr DP, Pan CY, Kiang D, Carter C, Tougaw S, et al. A summer outbreak of human metapneumovirus infection in a long-term-care facility. *The Journal of infectious diseases*. 2007 Sep 1;196(5):705-8. PubMed PMID: 17674312.
84. Laham FR, Israele V, Casellas JM, Garcia AM, Lac Prugent CM, Hoffman SJ, et al. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *The Journal of infectious diseases*. 2004 Jun 1;189(11):2047-56. PubMed PMID: 15143472.

85. Xiao NG, Xie ZP, Zhang B, Yuan XH, Song JR, Gao HC, et al. Prevalence and clinical and molecular characterization of human metapneumovirus in children with acute respiratory infection in China. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010 Feb;29(2):131-4. PubMed PMID: 20135829. Epub 2010/02/06. eng.
86. Sloots TP, Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Harnett GB, et al. Human metapneumovirus, Australia, 2001-2004. *Emerging infectious diseases*. 2006 Aug;12(8):1263-6. PubMed PMID: 16965711. Pubmed Central PMCID: 3291208.
87. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *The New England journal of medicine*. 2004 Jan 29;350(5):443-50. PubMed PMID: 14749452. Pubmed Central PMCID: 1831873.
88. Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, Edwards K, Hall CB, Walker FJ, et al. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerging infectious diseases*. 2004 Apr;10(4):700-5. PubMed PMID: 15200863. Pubmed Central PMCID: 3323105.
89. Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, Clementi M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Virology journal*. 2012;9:247. PubMed PMID: 23102237. Pubmed Central PMCID: PMC3573994. Epub 2012/10/30. eng.
90. Xiao NG, Zhang B, Xie ZP, Zhou QH, Zhang RF, Zhong LL, et al. Prevalence of human metapneumovirus in children with acute lower respiratory infection in Changsha, China. *Journal of medical virology*. 2013 Mar;85(3):546-53. PubMed PMID: 23296388. Epub 2013/01/09. eng.
91. Mahabee-Gittens EM, Grupp-Phelan J, Brody AS, Donnelly LF, Bracey SE, Duma EM, et al. Identifying children with pneumonia in the emergency department. *Clinical pediatrics*. 2005 Jun;44(5):427-35. PubMed PMID: 15965550.
92. Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002 May 1;165(9):1285-9. PubMed PMID: 11991880.
93. Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011 May;52 Suppl 4:S284-9. PubMed PMID: 21460286. Pubmed Central PMCID: 3106235.
94. Ferronato AE, Gilio AE, Ferraro AA, Paulis M, Vieira SE. Etiological diagnosis reduces the use of antibiotics in infants with bronchiolitis. *Clinics*. 2012 Sep;67(9):1001-6. PubMed PMID: 23018294. Pubmed Central PMCID: 3438237.