



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL - PGBIOEXP**

**FABIANNE ARAÚJO GOMES DOS SANTOS ALVES**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *RINOVÍRUS HUMANO* EM POPULAÇÃO  
INFANTIL NA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO-VELHO/RO**

**Porto Velho-RO**

**2015**

**FABIANNE ARAÚJO GOMES DOS SANTOS ALVES**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *RINOVÍRUS HUMANO* EM POPULAÇÃO  
INFANTIL NA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO - VELHO/RO**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biologia Experimental – PGBIOEXP –  
do Núcleo de Saúde da Universidade  
Federal de Rondônia para obtenção  
do título de mestre.

Orientadora: Dra. Deusilene Souza  
Vieira

**Porto Velho-RO**

**2015**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

Alves, Fabianne Araújo Gomes dos Santos.

A474i

Identificação molecular de rinovírus humano em população infantil na região metropolitana de Porto-Velho - RO. / Fabianne Araújo Gomes dos Santos Alves, Porto Velho, 2015.

60f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Deusilene Souza Vieira

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

1. Infecção respiratória aguda. 2. Criança. 3. Rinovírus humano. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 616-002.1

**Bibliotecário responsável: Luã Silva Mendonça- CRB11/905**

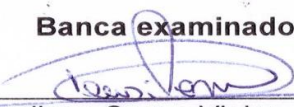
## FICHA DE AVALIAÇÃO

FABIANNE ARAÚJO GOMES DOS SANTOS ALVES

### Identificação Molecular de *Rinovírus humano* em População Infantil na Região Metropolitana de Porto-Velho/RO

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de mestre, em sessão pública realizada em 22 abril de 2015.

#### Banca examinadora

  
Dra. Deusilene Souza Vieira – **Presidente**

Chefe do Laboratório de Virologia – FIOCRUZ/RO

\_\_\_\_\_  
Dra. Soroya dos Santos Pereira – **Titular Externo**  
Pesquisadora – FIOCRUZ/RO

\_\_\_\_\_  
Dra. Najla Benevides Matos – **Titular Interno**  
Chefe do Laboratório de Microbiologia – CEPEN

\_\_\_\_\_  
Dra. Joana D’Arc Neves Costa  
Chefe do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Malária – CEPEN – 1º  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Dr. Tony Hiroshi Katsuragawa  
Chefe do Laboratório de Epidemiologia Malária – CEPEN – 2º Suplente

## DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, principalmente, por ser meu sustentador e minha força nos momentos de fraqueza e limitações, e por me proporcionar sabedoria e paciência para vencer os obstáculos enfrentados ao decorrer da execução desse projeto.

Dedico ao meu esposo Davi pelo carinho, amor, incentivo e paciência nos momentos mais difíceis durante essa jornada.

Aos meus pais amados, Mario e Luzia por serem meu referencial e me ensinarem princípios e valores de honestidade, amor ao próximo, humildade e respeito. E ainda por serem os principais incentivadores de que é possível mudar a história das nossas vidas por meio de dois tipos de conhecimento: a palavra de Deus e a ciência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço á Deus pelo seu infinito amor e graça, e tributo á Ele toda honra e glória, pois sem seu favor eu não estaria aqui, Ele é o mentor de todas as coisas.

A minha orientadora Dra. Deusilene Souza Vieira pela intensa orientação, ensinamentos, dedicação, compreensão e paciência. Fica registrado meu carinho e gratidão.

Aos Doutorandos Luan Felipe Botelho Souza e Alcione dos Santos Oliveira sou imensamente grata pela disponibilidade, e incansáveis ensinamentos, sem dúvida vocês foram grandes colaboradores para meu crescimento profissional.

Ao meu esposo Davi pelo amor, paciência e palavras de incentivos nos momentos mais difíceis, sem você eu não conseguiria.

Aos meus pais, Mário e Luzia, e irmãos (Fabiano, Fábio e Flávio) obrigada pelo incentivo e carinho.

A mestrandia Vanessa Rampaso pelo companheirismo e carinho, com certeza com você a caminhada ficou mais fácil. Obrigada.

A toda equipe do Laboratório Plataforma Técnica do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, mestrandos, alunos de iniciação científica e estagiários sem vocês nada disso seria possível. Sou eternamente grata.

Aos professores do programa de Pós-Graduação de Biologia Experimental por compartilhar seus amplos conhecimentos científicos

A equipe do Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical em especial a Dra Najla Benevides Matos e Cristiane Núcia pela grande contribuição para realização deste trabalho.

Aos mestrandos Roger Lafontaine e Jeane Maia minha gratidão pela amizade e conhecimentos partilhados com certeza vocês acrescentaram muito á minha vida. Muito obrigada.

A todos os pais, e em especial as crianças, muitíssimo obrigada por consentirem participar deste projeto.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Medicina Tropical que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

E a todos os amigos que contribuíram de alguma forma, fica expressa minha gratidão, pois sem todas essas pessoas citadas (e não citadas) jamais seria possível à realização deste sonho. Muito obrigada a todos.

## Resumo

As infecções respiratórias agudas (IRA) são as principais causas de infecções em crianças com menos de cinco anos. As IRA são causadas por diversos agentes etiológicos, sendo os agentes virais os principais causadores deste tipo de infecções. O *Rinovírus humano* (HRV) é um vírus de RNA, patógeno causador do resfriado comum capaz de desenvolver quadros infecciosos mais graves em crianças. O HRV está classificado em espécies A, B, e C que abrange 100 sorotipos diferentes. Este estudo teve por objetivo identificar o vírus HRV em população infantil atendida na região metropolitana de Porto-Velho/ Rondônia. A população de estudo consistiu em crianças de 0 a 6 anos de idade ambos sexos, que apresentaram sintomas clínicos de IRA. Foram coletadas 660 amostras biológicas de secreção nasofaríngea por meio de um swab estéril conforme preconizado pelo Ministério da Saúde. Sendo selecionada para o presente estudo 304 amostras para isolamento viral a PCR qualitativa em tempo real utilizando o sistema *Sybr Green*. Do total de 304 amostras analisadas 26,3% (80/304) foram positivas para HRV. A presença do vírus foi detectada em todas as faixas etárias analisadas. Nas amostras positivas os sintomas mais frequentes foram tosse, coriza, secreção pulmonar, obstrução nasal, sibilos, dispneia e febre apresentando frequências superiores a 60%. O vírus HRV foi detectado durante todo o ano. Dentre os casos de coinfeções: 5 foram HRV + *Adenovírus*, 14 HRV + *Streptococcus pneumoniae*, 5 *Adenovírus* + *Streptococcus pneumoniae* e 1 caso de *Adenovírus* + *Streptococcus pneumoniae* + HRV. O HRV tem sido detectado em diversos estudos voltados para identificação etiológica em infecções respiratórias. Por meio deste trabalho foi possível afirmar a presença do mesmo na região norte do Brasil. Os dados obtidos enfatizam a importância da identificação da HRV, já que o conhecimento do agente causador deste tipo de infecção pode ajudar o prognóstico, favorecendo a prática correta terapêutica, evitando a prescrição desnecessária de antibióticos.

Palavras-chaves: Rinovírus humano, infecção respiratória aguda, crianças.

## **Abstract**

Acute respiratory infections (IRA) are the main causes of infections in children under five years. IRA are caused by other agents, and viral agents the main cause of these infections. The human rhinovirus (HRV) is a RNA virus, the pathogen causing the common cold, capable of developing serious infectious conditions in children. The HRV is ranked species A, B, and C which covers 100 different serotypes. This study aimed to identify the HRV virus in children seen in the metropolitan region of Porto Velho / Rondonia. The study population consisted of children 0-6 years of age both sexes, with clinical symptoms of IRA. We collected 660 biological samples of nasopharyngeal secretions using a sterile swab as recommended by the Ministry of Health. Being selected for this study 304 samples for virus isolation qualitative real-time PCR using SYBR Green system. Of the 660 samples was performed viral identification showing 304 26.3% (80) of positive HRV. The presence of the virus was detected in all age groups analyzed. In positive samples the most frequent symptoms were cough, coryza, pulmonary secretions, nasal obstruction, wheezing, shortness of breath and fever presenting frequencies above 60%. HRV virus was detected throughout the year. Among the cases of coinfection: 5 were HRV + Adenovirus, 14 HRV + *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* + Adenovirus 5 and 1 case of Adenovirus + *Streptococcus pneumoniae* + HRV. The HRV has been detected in several studies focused on etiological identification in respiratory infections. Through this work it was possible to affirm the presence of the same in northern Brazil. The data emphasize the importance of identifying HRV, since knowledge of the causative agent of this type of infection can help prognosis, favoring a correct therapeutic practice, avoiding the unnecessary use of antibiotics.

Keywords: children, acute respiratory infection, human rhinovirus.



## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1. Anatomia do sistema respiratório infantil.....	14
Figura 2. Representação morfológica do HRV e proteínas estruturais.....	17
Figura 3. Representação do genoma do HRV.....	18
Figura 4. Representação esquemática das etapas do ciclo de replicação do HRV.....	21
Figura 5. Coleta combinada.....	32
Figura 6. Alinhamento realizado no BLAST com oligonucleotídeo sense HRV.....	37
Figura 7. Alinhamento realizado no BLAST com oligonucleotídeo antisense HRV.....	38
Figura 8. Alinhamento múltiplo.....	39
Figura 9. Curva de amplificação do HRV.....	40
Figura 10. Distribuição do HRV por faixa etária.....	41
Figura 11. Sintomas relatados pelos pais ou responsáveis.....	42
Figura 12. Distribuição de detecção HRV durante o ano de 2013.....	43
Figura 13. Casos de dupla e múltipla infecção entre patógenos respiratórios.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizado nos ensaios de PCR em tempo Real. ....	33
Tabela 2. Dados epidemiológicos dos casos positivos para HRV. ....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ L	micro Litros
$\mu$ M	micro Molar
cDNA	DNA complementar
CoV	Coronavírus
HAd	<i>Adenovirus Humano</i>
HBoV	Bocavírus humano
HICD	Hospital Infantil Cosme Damião
hMPV	<i>Metapneumovirus humano</i>
HRV	<i>Rinovirus humano</i>
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
IRA	Infecções Respiratórias Agudas
IRES	Sítio interno de ribossomo
ITRS	Infecção do Trato Respiratório Superior
IVAS	Infecções das vias aéreas superiores
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
min	minutos
Nm	nano Molar
ORF	Região de leitura aberta
pb	pares de bases
PBS	Tampão Fosfato Salina
RNApRNAd	RNA polimerase RNA dependente
RPM	rotação por minuto
RT-PCR	Transcrição Reversa - Reação em cadeia da polimerase
seg	segundos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tm	Temperatura <i>melting</i>
UTR	Unidade não transcrita
VP1	Proteína Viral 1
VP2	Proteína viral 2
VP3	Proteína viral 3
VP4	Proteína viral 4

## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Infecções Respiratórias.....	14
1.2	Rinovírus humano.....	16
1.3	Genoma viral.....	18
1.4	Proteínas virais.....	18
1.5	Replicação Viral.....	19
1.6	Transmissão.....	21
1.7	Manifestações Clínicas.....	22
1.8	Imunopatogênese.....	23
1.9	Epidemiologia geral.....	23
1.10	Detecção Viral.....	24
1.10.1	Cultura de células.....	24
1.10.2	Detecção Molecular.....	24
1.10.3	PCR em tempo real.....	25
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Aspectos éticos e legais.....	30
4.2	Local de Estudo.....	30
4.3	População de Estudo.....	30
4.4	Critérios de elegibilidade.....	31
4.4.1	Critérios de inclusão.....	31
4.4.2	Critérios de exclusão.....	31
4.5	Coleta.....	31
4.6	Processamento das amostras.....	32
4.7	Análises <i>in silico</i> .....	33
4.8	Controle positivo.....	33
4.9	Extração de RNA.....	33
4.10	Transcrição reversa.....	35
4.11	PCR em tempo real.....	35

4.12	Dados Climatológicos.....	36
4.13	Dados Epidemiológicos e Clínicos .....	36
4.14	Análises estatísticas.....	36
4.15	Dados para avaliação de múltiplas infecções .....	36
5	RESULTADOS .....	37
5.1	Análises dos oligonucleotídeos .....	37
5.2	Resultado PCR em tempo real.....	39
5.3	Descrição Populacional das amostras positivas para HRV .....	40
5.4	Sintomatologia da população amostral dos HRV positivos .....	42
5.5	Sazonalidade climática da população amostral dos HRV positivos ....	42
5.6	Múltiplas infecções.....	43
6	DISCUSSÃO.....	44
7	CONCLUSÃO .....	49
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
	ANEXOS .....	56

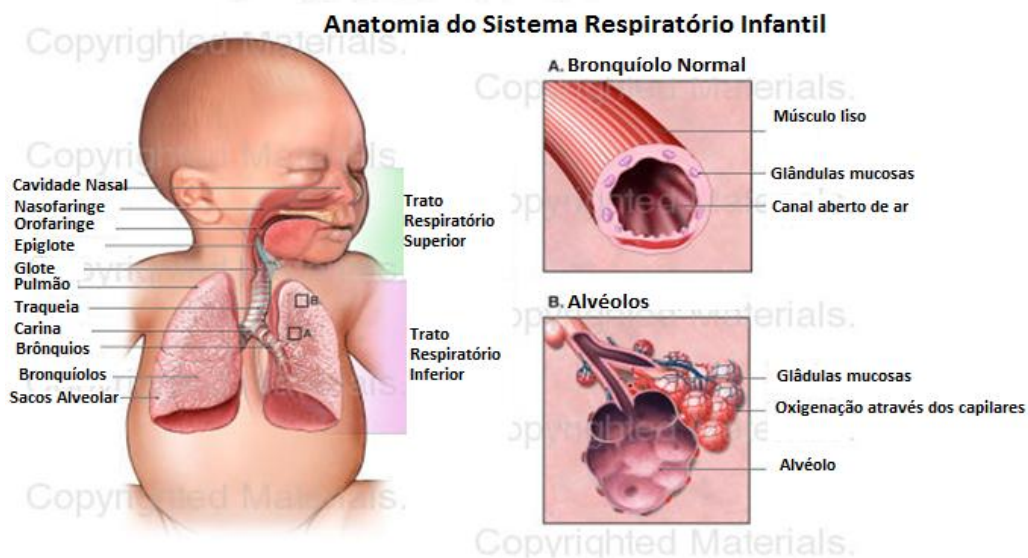
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Infecções Respiratórias

O sistema respiratório está classificado em via aérea superior (ou trato respiratório superior) composto pelo nariz, seios paranasais, passagens nasais, faringe, tonsilas, adenóides, laringe e parte superior da traquéia. A via aérea inferior (ou trato respiratório inferior) compreende os pulmões que são compostos de estruturas brônquicas (brônquios e bronquíolos) e alveolares representadas na figura 1 (BARROS, 2011).

A infecção respiratória consiste na entrada de microorganismos patogênicos no trato respiratório. Sendo definida de acordo com a região anatômica envolvida, onde as regiões do trato superior colonizada ou infectada com microorganismos patogênicos são denominadas infecções das vias aéreas superiores (IVAS). Enquanto que as infecções respiratórias agudas (IRA) são aquelas caracterizadas pela presença de microorganismos infecciosos no trato respiratório inferior (WONG, 2006; TREGONING; SCHWARZE, 2010). As crianças têm características anatômicas e fisiológicas que as predispõem ao desenvolvimento de insuficiência respiratória quando acometidas de patologias do sistema respiratório (MATSUNO, 2012).

Figura 1. Anatomia do sistema respiratório infantil.



Fonte: Adaptado de Nucleus Medical Media. Nucleus Catalog. January, 2011.

As IVAS são ocasionadas principalmente por vírus durante a infância e manifestam sintomas peculiares a um resfriado comum, como coriza, tosse e rouquidão. Porém crianças com IVAS podem desenvolver infecções no trato respiratório inferior evoluindo, para o que chamamos, de infecções respiratórias agudas (IRA) apresentando sintomas como taquipnéia, síbilos, tosse intensa, falta de ar e desconforto respiratório (TREGONING; SCHWARZE, 2010)

As IRA são de início abrupto e duração limitada, que pode iniciar de um resfriado comum evoluindo para otites, sinusites, bronquites e pneumonias (ALVIM, 2009). Dentre essas morbidades, a pneumonia é principal causa infecciosa de morte em crianças em todo o mundo, sendo responsável por 15% de todas as mortes de crianças menores de 5 anos de idade. No ano de 2013 matou cerca de 935.000 crianças com menos de 5 anos. Os causadores desta morbidade podem ser vírus, bactérias ou fungos, podendo ser prevenida por vacinação, nutrição adequada e por o combate aos fatores ambientais (OMS, 2014).

Os sintomas desencadeados durante a pneumonia viral não diferem da bacteriana. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os sintomas de pneumonias virais em crianças são, de modo geral, tosse, dificuldade para respirar, síbilos e febre. O diagnóstico de pneumonia geralmente é definido de acordo com a presença alguns dos seguintes sintomas: respiração rápida, parede torácica menor tiragem intercostal, e síbilos, infiltrado pulmonar novo ou progressivo e persistente, consolidação e cavitação nos pulmões, pneumatocele em crianças <1 ano de idade (ANVISA, 2009). Em casos severos de pneumonia, além dos sintomas citados, as crianças tendem a ter dificuldade para se alimentar ou ingerir líquidos, convulsões e hipotermia (OMS, 2014).

A cada ano cerca de 1,5 milhões de crianças são internadas com casos graves de IRA (NAIR et al., 2013; OMS, 2014). No Estado de Rondônia as doenças do sistema respiratório constituem principais causa de internações hospitalares com um total de 28.151 crianças internadas (44%), ou seja, 18 internações/ 1.000 habitantes, onde a pneumonia é a principal delas, com 14.218 crianças internadas, 9 internações/1.000 habitantes, sendo crianças menores de cinco anos as mais acometidas por essa morbidade, com 7,2 internações por 1.000 habitantes, seguida das doenças infecciosas e

parasitárias, com 23.496 internações (36%), o que corresponde a 15 internações/ 1.000 habitantes (BARROS, 2011).

Embora as IRA seja um importante problema de saúde pública global, em termos de morbidade e mortalidade, a etiologia dessas infecções são pouco elucidadas nos países desenvolvidos, e permanece em grande parte desconhecido nos países em desenvolvimento (RUUSKANEN et al., 2011; NAIR et al., 2013)

Os vírus mais clássicos, como *Vírus sincicial respiratório*, *vírus Influenza*, *Metapneumovírus humano* (hMPV), *Parainfluenza vírus* (PIV) *Adenovírus humano* (HAdv ) e *Rinovírus humano* (HRV), e atualmente *Coronavírus* (CoV) e *Bocavirus humanos* (HBoV) desempenham papel cada vez mais importante nas infecções respiratórias durante a infância. Dentre os principais vírus o HRV vem sendo apontado como importante agente causador de IRA (PAULA et al., 2011; CHAVOSHZADEH et al., 2012; BICER et al., 2013; DA SILVA et al., 2013).

## 1.2 Rinovírus humano

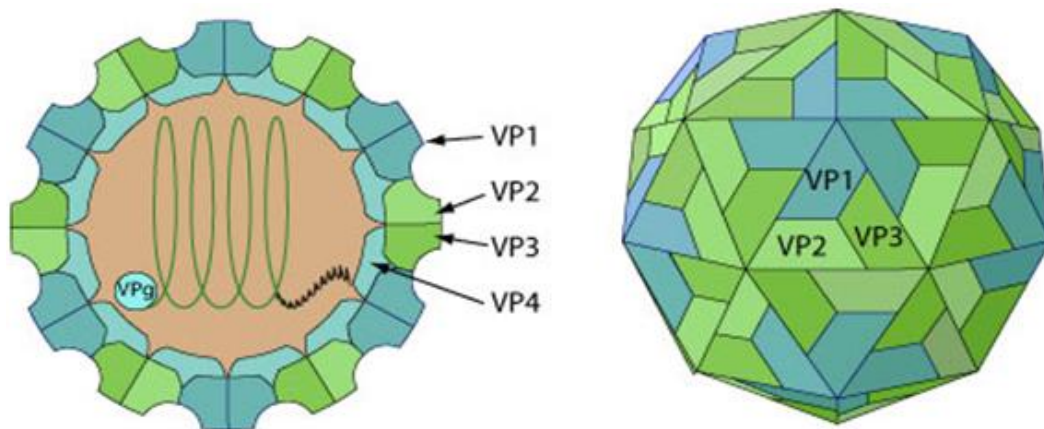
O HRV foi isolado pela primeira vez em 1956 pelo Dr. Winston Price na Universidade Johns Hopkins na cidade de Baltimore, Estados Unidos. Após esse período, ao longo de quase 48 anos, o HRV tem sido associado como patógeno relacionado a doenças respiratórias (PRICE et al., 1956; ANZUETO; NIERDERMAN, 2003; PITREZ et al., 2005; LAU et al., 2007; RUUSKANEN et al., 2011; CHAVOSHZADEH et al., 2012). Porém, apenas nos últimos 16 anos, com o aprimoramento das técnicas moleculares, como RT-PCR e PCR em tempo real, têm se permitido a detecção rápida da diversidade de sorotipos virais relacionados as HRV e permitindo a elucidação da associação desses vírus a essas morbidades em adultos e principalmente em crianças menores de 5 anos (ANZUETO; NIERDERMAN, 2003; CHAVOSHZADEH et al., 2012; HONG et al., 2014).

De acordo com Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, o HRV pertence à família *Picornaviridae*, do gênero *Enterovírus*, classificado em 100 sorotipos circulantes agrupados em três espécies diferentes: HRV-A, HRV- B e HRV-C (ANZUETO; NIEDERMAN, 2003; ICTV, 2014).



A morfologia do HRV consiste no capsídeo icosaédrico de aproximadamente 30 nm de diâmetro, não envelopado, estruturado com quatro proteínas denominadas VP1, VP2, VP3 e VP4 (figura 2). Dentro desse capsídeo encontra-se o genoma viral RNA de fita simples, polaridade positiva contendo cerca de 7,2 Kb, distribuído em 11 genes que são traduzidos inicialmente numa única poliproteína subdivididas em três regiões precursoras: P1 (precursor da poliproteína codificadora das proteínas estruturais do vírus), P2 e P3 (precursor 2 e precursor 3 da região poliproteína codificadoras das proteínas não estruturais) (ROSSAMANN, 1985; CORDEY et al., 2008a; MCERLEAN et al., 2008; LEWIS-ROGERS; BENDALL; CRANDALL, 2009; PALMENBERG et al., 2010).

Figura 2. Representação morfológica do HRV e proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4



Fonte: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/97.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html).

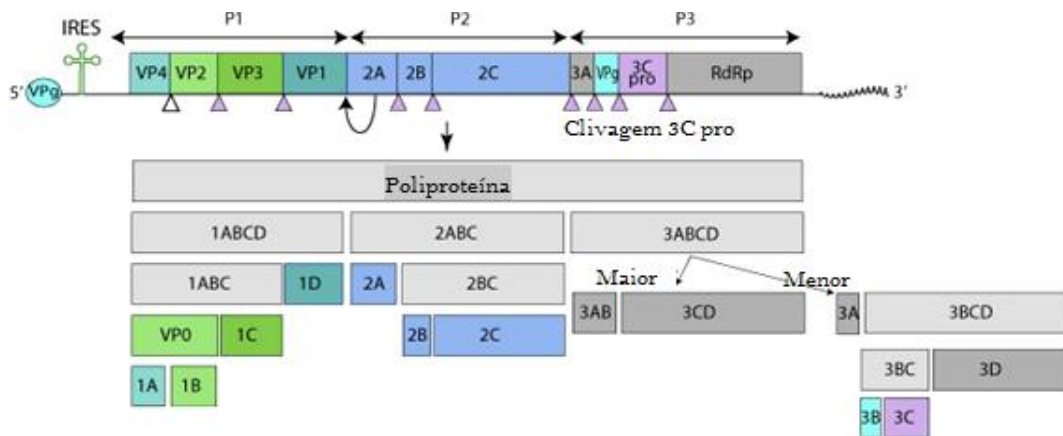
Os HRV estão classificados, quanto ao receptor celular, em dois grupos denominados: grupo maior e grupo menor. O grupo maior é caracterizado pelos HRV que infectam a célula do hospedeiro via adsorção do ligante viral (canyon) à molécula de adesão intracelular 1 - (ICAM-1), e o grupo menor consiste nos HRV que interage com a lipoproteína de baixa densidade (LDL) da superfície da célula do hospedeiro (LEWIS-ROGERS; BENDALL; CRANDALL, 2009).

### 1.3 Genoma viral

Os genomas dos membros da família *Picornaviridae* estão organizados em quatro diferentes regiões, logo, o genoma do HRV está distribuído da seguinte forma: uma longa região 5' não traduzida (5'-UTR), uma região de leitura aberta (ORF), uma região curta 3' UTR e uma cauda poli A, ainda, na extremidade 3' como representado na figura 3 (CORDEY et al., 2008a).

A região 5'-UTR contém dois elementos altamente conservados, o *cloverleaf* (trevo terminal) 5' e o sítio interno de entrada ribossomal (IRES) que possibilitam a formação de uma ribonucleoproteína que implica na interrupção da tradução viral para que haja a replicação. A ORF consiste na região de cerca de 6500 nucleotídeos, codificando uma poliproteína organizada em três subregiões P1, P2 e P3. A região 3' não transcrita encontra-se envolvida na eficiência da replicação, porém seu papel ainda não foi bem elucidado. A cauda poli A é importante na tradução, pois se liga a proteína celular PABP - Proteína de Ligação da Poli A (*Poly A binding protein*) auxiliando na taxa da síntese protéica (CORDEY et al., 2008b; LEWIS-ROGERS; BENDALL; CRANDALL, 2009).

Figura 3. Representação do genoma do HRV.



Fonte: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/97.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html)

### 1.4 Proteínas virais

A poliproteína subdividida em três regiões precursoras: P1, P2 e P3 codificadoras das proteínas estruturais e não estruturais do vírus são responsáveis pelas proteínas essenciais na síntese da nova partícula infectante

(vírion). A região P1 codifica as quatro proteínas estruturais VP4, VP2, VP3 e VP1 que compõem o capsídeo icosaédrico do vírus (CORDEY et al., 2008a; PALMENBERG; RATHE; LIGGETT, 2010).

As proteínas virais VP1, VP2 e VP3 possuem uma extremidade chamada C-terminal responsável pelas interações antigênicas. Já a proteína VP4 está localizada de forma mais interna no capsídeo interagindo diretamente com RNA genômico e auxiliando a entrada do mesmo no citoplasma da célula hospedeira (CORDEY et al., 2008a; LEWIS-ROGERS; BENDALL; CRANDALL, 2009).

A região P2 do genoma viral codifica as proteínas virais não estruturais 2A, 2B, 2C e a região P3 codificam as proteínas não estruturais 3A, 3B, 3C e 3D (CORDEY et al., 2010).

A protease viral 2A é responsável pela clivagem que separa a proteína estrutural VP1 que compõe o capsídeo (pertencente à região P1) do restante do genoma, dando origem a protease 2A<sub>pro</sub>. Esta protease desempenha papel crucial na replicação do RNA pela clivagem do fator de iniciação eucariótico (eIF4G) que irá resultar na inativação da tradução dependente de *cap* da célula do hospedeira durante processo de replicação viral. E a proteína 2B atua como protease na clivagem da poliproteína viral (LEDFORD et al., 2004; CORDEY et al., 2008a).

A protease 3C<sub>pro</sub> é responsável por quase todos os eventos de processamento proteolítico do precursor de poliproteína viral, e ainda interage com a região 5' UTR facilitando a ligação 3D<sub>pol</sub> (RNA polimerase RNA dependente) para a replicação. A proteína 3B ou VP<sub>g</sub> atua como um iniciador para 3D<sub>pol</sub>. A proteína não estrutural 3C é eficiente na mediação nos efeitos no transporte nuclear da célula hospedeira (LEWIS-ROGERS; BENDALL; CRANDALL, 2009; GHILDYAL et al., 2009).

## **1.5 Replicação Viral**

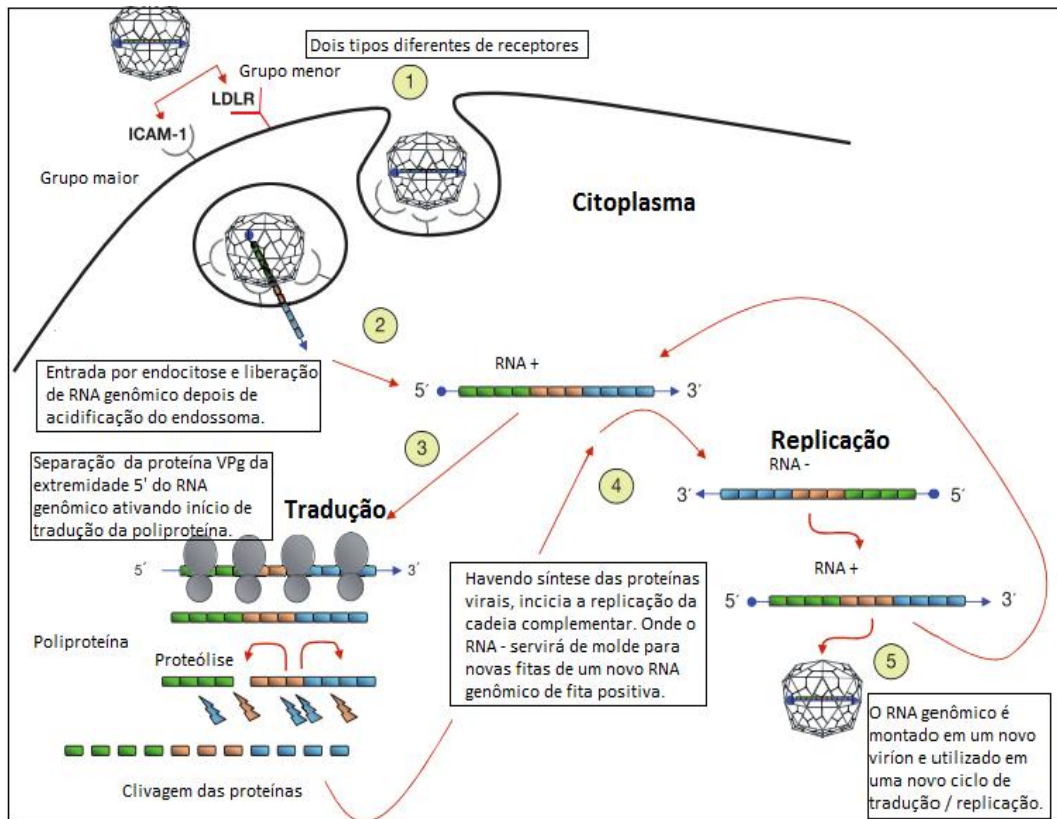
A replicação viral, de modo geral, consiste nas seguintes etapas: adsorção, internalização, desnudamento, síntese viral, maturação e liberação (JACOBS et al., 2013).

Todo processo de replicação viral do HRV ocorre no citoplasma da célula hospedeira como representado na figura 4. A adsorção do HRV é

mediada pela ligação específica da proteína viral (*canyon*) ao receptor celular (ICAM-1 ou LDL). A presença do receptor na superfície celular torna a célula susceptível à infecção. Havendo interação específica do receptor celular com ligante viral, o vírus entra na célula alvo por endocitose, de modo que, o capsídeo libera a proteína VP4, que por sua vez, abre um poro na membrana endossomal e permite a passagem do genoma RNA viral ao citoplasma da célula (CORDEY et al., 2008a; LEWIS-ROGERS; BENDALL; CRANDALL, 2009; WAMAN et al., 2014).

Assim que o RNA viral é liberado no citoplasma celular ele passa a ser reconhecido pela maquinaria da célula hospedeira, isso devido sua capacidade de se portar como RNA mensageiro. Em seguida há liberação da proteína VPg da extremidade 5' do RNA genômico iniciando a tradução do RNA em uma poliproteína. Uma vez sintetizadas as proteínas virais necessárias para replicação, inicia-se a replicação da fita complementar de RNA (-). Este RNA de fita negativa servirá de molde para síntese de novas fitas de RNA (+) genômico para montagem dos vírions (CORDEY et al., 2008b; JACOBS et al., 2013).

Figura 4. Representação esquemática das etapas do ciclo de replicação do HRV.



Fonte: Adaptado de (CORDEY et al., 2008a).

## 1.6 Transmissão

A transmissão por HRV ocorre principalmente pelo contato pessoa a pessoa e por aerossóis contaminados, mas, independentemente da via de transmissão, o início da infecção ocorre quando o vírus entra em contato com a mucosa nasal. Normalmente, a transmissão do HRV ocorre com aproximação entre familiares e a criança, por contato corpo-a-corpo com secreções nasais contaminadas, geralmente da mãe à criança. A auto-inoculação ocorre, em alguns casos, devido hábitos da criança de friccionar os olhos e o nariz, simultaneamente, permitindo transmissão do vírus (TAPPAREL et al., 2012).

A entrada do HRV na mucosa nasal ocorre por meio do ducto lacrimal ou diretamente pelas narinas, sendo transportado até a nasofaringe posterior com auxílio do próprio mecanismo de defesa do aparelho mucociliar e a penetração do vírus nas células epiteliais se dá, por grande parte dos HRV, através do receptor celular ICAM-1. Trata-se de um receptor essencial à adesão de

células como neutrófilos, permitindo que estas rapidamente sejam recrutadas ao sítio inflamatório (ANZUETO; NIEDERMAN, 2003; CAMARGO et al., 2012).

### **1.7 Manifestações Clínicas**

O HRV é o principal agente do resfriado comum. A o resfriado comum é considerado um tipo de IVAS que freqüentemente são acompanhadas por dores de garganta, coriza obstrução nasal, espirros, tosses, perda de apetite, e febre de intensidade variável, podendo ser mais alta em crianças menores de cinco anos. O perfil de manifestação clínica pode variar conforme a faixa etária. Em lactentes, por exemplo, tendem a ter maior inquietação, choro fácil, recusa alimentar, vômitos, alteração do sono e dificuldade respiratória por obstrução nasal, e em crianças maiores pode haver manifestações clínicas de cefaléia, mialgias, calafrios (PITREZ, 2003; KIENINGER et al., 2013).

A taxa de ocorrência de infecção é alta na primeira infância e diminui com a idade, provavelmente devida à imunidade induzida pela exposição cumulativa à sorotipos diferentes ao longo da vida (TREGONING; SCHWARZE, 2010).

Já a IRA tipo de infecção com quadro clínico de maior gravidade, tendem a manifestar sintomas como taquipnéia, sibilos, tosse intensa e dispnéia. De modo geral o surgimento de dispnéia, taquipnéia, sibilos e febre alta indicam bronquiolite aguda e pneumonia. Em casos de complicações bacterianas durante infecções respiratórias virais a febre prolongada por mais de 72 horas, e ainda recorrência de hipertermia após este período e prostração mais acentuada são notáveis em casos de co-infecções (GERN; BUSSE, 1999; MILLER et al., 2007; TREGONING; SCHWARZE, 2010).

A importância clínica de detecção HRV tem sido agora claramente associada com doença grave levando à hospitalização em crianças menores de 5 anos de idade. O HRV também vem sendo identificado em co-infecções importante na doença invasiva pneumocócica, influenciando no aumento da gravidade da doença. A interação do HRV em co-infecções vírus a vírus ainda não está bem esclarecida, há poucos estudos que relatem o modo que o HRV pode influenciar no mecanismo de outros vírus respiratórios (MILLER et al., 2007; TREGONING; SCHWARZE, 2010).

## **1.8 Imunopatogênese**

Estudos sugerem que as infecções virais são importantes estímulos para a inflamação das vias aéreas, lesão e remodelação. O trato respiratório possui barreiras mecânicas com grande importância na defesa de infecções virais como a camada de células ciliadas que recobre o tecido das vias respiratórias, células secretoras de muco, bem como glândulas sub-epiteliais secretora de muco. O muco tem a função de reter as partículas estranhas que são carregadas com o auxílio do movimento das células ciliadas para a garganta para serem eliminadas do organismo (FERREIRA et al., 2008; TREGONING; SCHWARZE, 2010).

Após a entrada dos vírus nas células epiteliais, ocorre à replicação rapidamente e o processo inflamatório gera alterações na permeabilidade dos vasos e estimula as fibras nervosas originando a congestão nasal e rinorréia aquosa. O dano epitelial ocasionado pelo vírus HRV comparado a outros agentes virais respiratório é mínima, porém, a resposta inflamatória tende a ser exacerbada induzindo em alguns casos o processo asmático (KENNEDY et al., 2012; JACOBS et al., 2013; KIENINGER et al., 2013).

## **1.9 Epidemiologia geral**

O HRV foi isolado em diversas partes do mundo, incluindo os continentes Americanos (DO et al., 2010; LANDA-CARDEÑA et al., 2012; MARCONE et al., 2012) Europeu (DEFFERNEZ et al., 2004; KLOEPFER et al., 2014) e Asiático (LAU et al., 2010; HAI et al., 2012; WAMAN, 2014). Quanto à epidemiologia molecular os HRV-A e HRV-C são os principais agentes envolvidos em casos de IRA (ARAKAWA et al., 2012). Estudos têm mostrado evidências do envolvimento de HRV-C relacionado com síbilos em bebês e crianças, enquanto o HRV-A está envolvido em casos de asma em crianças mais velhas com menor duração de sintomas de asma e tosse em crianças infectadas (LAU et al., 2007; ONYANGO et al., 2012)

No Brasil ainda são escassos estudos voltados para identificação de HRV, porém, além dos poucos estudos realizados em algumas regiões do país

que mostra a presença do vírus e a necessidade de conhecer o perfil etiológico, é possível verificar a presença do mesmo em casos de IRA.

Em Salvador, nordeste do Brasil, pesquisa realizada detectou em 129 amostras diferentes vírus respiratório, sendo 67 (52%) amostras positivas para *Rinovírus humano* (SOUZA et al., 2003). Outra pesquisa realizada em Pernambuco verificou a prevalência do HRV em 18,9% em população infantil de 407 crianças analisadas (BEZERRA et al., 2011). No Rio grande do Sul, estudo realizado em amostras de 206 crianças observou-se positividade para HRV em 20,8% (DA SILVA et al., 2013).

Em Rondônia assim como no Norte do Brasil, ainda não há relatos de estudos voltados para identificação do patógeno HRV, porém já houve identificação para outros vírus respiratórios pela técnica de imunofluorescência (OLIVEIRA; CARVALHO, 2009).

### **1.10 Detecção Viral**

Basicamente a detecção vírus respiratórios por métodos como cultura de células e técnicas moleculares que possibilitam a detecção do vírus na amostra (RATY et al., 1999; BARENFANGER et al., 2000; SANALIOS, 2004).

#### **1.10.1 Cultura de células**

O HRV isolado tem sido isolado em cultura de células tipos Helas são extraídas de células cancerosas, e ainda células HEP2. Porém a detecção do mesmo por isolamento em cultura de células é um método caro e tende a ser lenta e, devido às condições específicas características que acaba limitando o diagnóstico em casos mais urgentes. Esta técnica é atualmente pouco ou nada utilizada na rotina laboratorial, pois cada vez mais se pretende a obtenção de resultados em tempo clinicamente útil (SPYRIDAKI et al., 2009).

#### **1.10.2 Detecção Molecular**

O desenvolvimento de métodos moleculares como a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e PCR em tempo real, tem aumentado à possibilidade da detecção do HRV e suas variações além da



identificação de novos agentes virais (RUUSKANEN et al., 2011; CHAVOSHZADEH et al., 2012; KLOEPFER et al., 2014).

A PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) permite a detecção a partir de amplificação de um número pequeno de cópias de material genético. A PCR foi desenvolvida em 1980 por Kary Mullis, que recebeu o Prêmio Nobel em 1994. É uma técnica rápida e sensível, permitindo a distinção entre espécies e sorotipos dependendo da região a ser amplificada. Tal amplificação nos permite verificar as variações genômicas após análise de sequências nucleotídicas obtidas em reações posteriores de sequenciamento (KIDD et al., 1990; RATY et al., 1999; XU et al., 2000; SANALIOS, 2004; KAJON; XU, ERDMAN, 2005; LU; EDMAN, 2006).

O princípio técnico da PCR baseia-se na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA ou cDNA alvo, correspondendo a um mecanismo de síntese artificial de DNA num processo em cadeia que imita a replicação do DNA por meio de uma enzima *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase (SAIKI et al., 1985; OLIVEIRA; CARVALHO, 2009).

### 1.10.3 PCR em tempo real

PCR em tempo real possui além das vantagens apresentada no ensaio de PCR convencional, maior sensibilidade, e especificidade, dependendo do sistema utilizado (sondas marcadas, oligonucleotídeos específicos, *Sybr Green*), além disso, favorece em tempo útil o diagnóstico laboratorial (HOUGH Neste tipo de reação ocorre o monitoramento por meio de um sistema computacional da amplificação do DNA alvo a cada ciclo da reação. Para isso, são utilizados compostos fluorescentes para identificar os produtos gerados na amplificação (HOUGHTON; COCKERILL, 2006; LALAM, 2006; CORDEY et al., 2009). Os formatos de detecção química, baseado na emissão de fluorescência, utilizados para detectar os produtos de amplificação gerados pela PCR em tempo real são os fluoróforos ou moléculas fluorogênicas (chamados de *repórters*) que emitem sinal fluorescente de forma proporcional à quantidade de DNA amplificado na reação (KUBISTA et al., 2006; BUSTIN et al., 2009).

Um dos corantes comumente utilizados na pesquisa é o SYBR Green, que é um corante de cianina que se liga especificamente ao menor dupla fita de DNA. Emitindo uma fluorescência 1000 vezes maior do que a emitida pelo corante não ligado (HOUGHTON; COCKERILL, 2006). O sinal de fluorescência emitida por esses compostos uma vez ligados a fitas de DNA alvo é detectado por um adaptado a um *software* que traduz graficamente em tempo real os dados da emissão de fluorescência obtidos durante a amplificação do DNA alvo em um termociclador traduzindo na curva de amplificação do DNA-alvo (MACKAY et al., 2002; KUBISTA et al., 2006).

Cada produto de DNA tem uma temperatura de dissociação específica, o que diferencia o produto-alvo de produtos inespecíficos. Sequências individuais têm diferentes temperaturas de fusão, que são influenciados pelo comprimento dos oligonucleotídeos e quantidade de guanina/citosina (GC) (HOUGHTON; COCKERILL, 2006; KUBISTA et al., 2006; BUSTIN et al., 2009).

É possível verificar que o ponto CT denominado na literatura como *Cycle Threshold* corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável. O ponto a partir do qual a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fase exponencial é conhecido como *threshold*, sendo que este pode ser definido automática ou arbitrariamente pelo *software* do equipamento em função da *baseline* (KUBISTA et al., 2006, ARISMENDY; CASTELLANOS, 2011).

A progressão da reação de PCR em tempo real passa por duas fases diferentes, a fase exponencial e a fase de platô (KUBISTA et al., 2006, ARISMENDY; CASTELLANOS, 2011).

Na fase exponencial existe potencialmente a desnaturação de cadeias de DNA de dupla fita, anelamento dos oligonucleotídeos com síntese dos produtos através da ação da polimerase. Com a amplificação da quantidade de produto formado o sinal de fluorescência aumenta exponencialmente até que se atinge a fase platô que corresponde aos ciclos finais da reação.

A fase platô é atingida quando fatores como gastos dos reagentes na reação, inativação da polimerase, ou ainda a redução da eficiência da desnaturação fazendo chegar ao fim a amplificação exponencial (KUBISTA et al., 2006; ARISMENDY; CASTELLANOS, 2011).

A especificidade definida quando analisando a curva de dissociação gerada pelo *software* do equipamento e havendo amplificação específica do produto em pesquisa será possível a visualização de apenas um único pico. A curva de dissociação é gerada com base na temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos que por sua vez baseia-se na temperatura de fusão dos *primers* ( $T_m$ , do inglês *melting temperature*), sendo a  $T_m$  a temperatura na qual mais da metade das sequência dos oligonucleotídeos encontram-se associado ao DNA-alvo (MACKAY et al., 2002; HOUGHTON & COCKERILL, 2006; RODRIGUES et al., 2006; KUBISTA et al., 2006).

A curva de dissociação é construída ao final da PCR, onde ocorre um aumento gradual da temperatura e a fluorescência é medida em função da mesma. Com o aumento da temperatura a dupla fita de DNA se dissocia e o corante se desliga diminuindo a fluorescência (KUBISTA et al., 2006).

## 2 JUSTIFICATIVA

Há poucos estudos sobre a etiologia da IRA em crianças. O *Rinovírus humano*, nos últimos anos, vem sendo frequentemente isolado em amostras de indivíduos com IRA, sendo considerado um dos principais causadores dessas infecções e constantemente associado a quadros graves de bronquiolite, pneumonia e exacerbação de asma. Porém, são escassos no Brasil estudos relacionados a esse vírus com a IRA. Em Rondônia não há estudos que definam a relação ou frequência do *Rinovírus humano* relacionado a estas infecções. Logo, o impacto deste vírus como causador de IRA em pronto-atendimento e internações de morbidade respiratórias no Brasil e na região norte são de grande relevância já que é pouco definido o perfil dos agentes virais causadores de IRA. Portanto, ressalta-se a importância de se determinar a incidência e conhecer o perfil etiológico para auxiliar na avaliação, planejamento e implementação de medidas de controle para redução da morbidade.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Identificar molecularmente *Rinovírus Humano* em população infantil na região Metropolitana de Porto-Velho/ Rondônia.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar a frequência do patógeno *Rinovírus humano* na população amostral analisada.
- Correlacionar frequência dos vírus com dado climatológico.
- Correlacionar possíveis coinfeções com outros patógenos virais.
- Relacionar os resultados com os dados clínicos dos pacientes.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos e legais**

O presente trabalho foi submetido aos aspectos éticos sendo aprovados no Comitê de Ético em Pesquisa local (CEP/CEPEM) parecer nº 17/11(31/08/2011- Anexo I). Este estudo foi realizado em colaboração com os laboratórios de Microbiologia e Virologia Molecular, ambos pertencentes a Fundação Oswaldo Cruz Rondônia - FIOCRUZ/RO e Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia – CEPEM/RO.

### **4.2 Local de Estudo**

O estudo foi realizado no hospital infantil Cosme e Damião (HICD), localizado no município de Porto Velho- RO. Esta é a única unidade pública especializada em atendimento pediátrico da capital, também recebe pacientes oriundo do interior do estado e até mesmo vindo de estados vizinhos ou regiões de fronteira. O HICD é um órgão público pertencente ao Poder Executivo Estadual de Rondônia, classificado como médio porte e com capacidade instalada para 59 leitos de internação, com atendimento 24 horas, todos os dias da semana incluindo finais de semana e feriados.

### **4.3 População de Estudo**

A população do estudo foram crianças de 0 a 6 anos de idade, de ambos os sexos, atendidas no HICD durante o ano de 2013 que apresentavam características clínicas para infecção respiratória aguda. Os sintomas foram relatados pelo pai/mãe e/ou responsável pela criança, coletados por meio da Ficha de Investigação Epidemiológica preenchida no momento da entrevista (Anexo II). Os pais e/ou responsáveis que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo III), sendo inicialmente conscientizados de todos os aspectos acerca da pesquisa, assim como os procedimentos de coleta da amostra.

## **4.4 Critérios de elegibilidade**

### **4.4.1 Critérios de inclusão**

Foram selecionados os seguintes critérios de inclusão:

- Crianças com idade de 0 a 6 anos de ambos os sexos, atendidas no HICD;
- Com sintomas clínicos sugestivo de infecção respiratória aguda como: tosse, febre, coriza, secreção pulmonar, sibilos, dispnéia, prurido ocular e otalgia conforme preenchimento da ficha de investigação epidemiológica elaborada pelo grupo de estudo (Anexo II).

### **4.4.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos deste estudo:

- Crianças com idade superior a 6 anos;
- Indígenas;
- Doenças crônicas;
- Pais ou responsáveis que não aceitaram ou não assinaram TCLE.

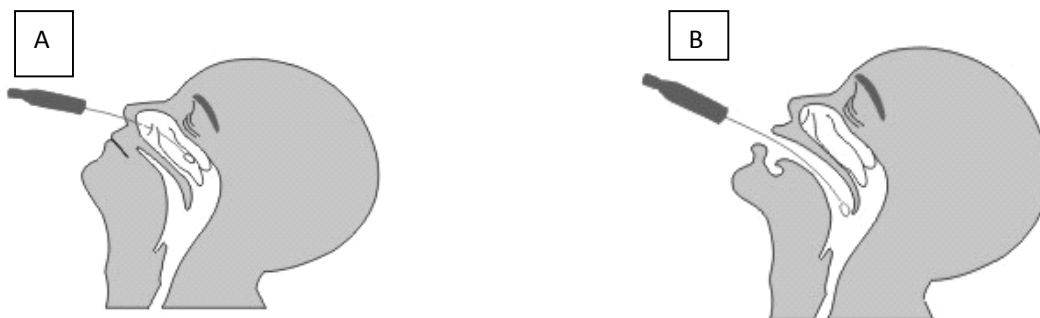
## **4.5 Coleta**

As coletas das amostras foram realizadas duas vezes por semana, pela equipe responsável pelo desenvolvimento deste estudo e em colaboração com o Laboratório de Microbiologia da FIOCRUZ/RO e CEPEM/RO. A coleta foi realizada nos meses de fevereiro a dezembro de 2013. Durante este período foram coletadas 660 amostras biológicas sendo classificadas para análises molecular do presente estudo 304 amostras. A classificação foi de acordo com as características clínicas que mais estão presentes em infecções por HRV. Como por exemplo, sintomas como tosse, febre, coriza, obstrução nasal e sibilos.

O protocolo de coleta foi o mesmo preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS, 2010). A coleta consistiu por meio da técnica *swab* combinado de nasofaringe (narina direita e esquerda) e orofaringe, onde foram utilizados exclusivamente *swab* de rayon.

O *swab* de nasofaringe foi introduzido nas narinas e realizado a fricção dos mesmos para obtenção das células da mucosa nasal (utilizando um *swab* para cada narina – Figura 5). E o *swab* de orofaringe foi friccionado na área posterior da faringe e tonsilas (Figura 5). Posteriormente os três *swab* foram cortados, ou dobrados, para que coubessem dentro de um tubo cônico de 15 mL contendo 3 mL de solução salina fisiológica estéril, que em seguida foram lacrados e identificados (nome do paciente, número da amostra e data da coleta). As amostras foram mantidas em temperatura adequada de refrigeração (4 a 8°C) e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia do FIOCRUZ/RO/CEPEM no mesmo dia para processamento.

Figura 5. Coleta combinada.



Em A: Demonstração da coleta nasal utilizando swab. Em B: Demonstração da coleta oral utilizando swab.

Fonte: <http://lacen.saude.sc.gov.br/arquivos/MCT01.pdf>

#### 4.6 Processamento das amostras

No laboratório de Microbiologia do FIOCRUZ/RO/CEPEM as amostras foram processadas no máximo três horas após a coleta. Primeiramente foi retirada uma alíquota pura de 500µl do tubo contendo a amostra biológica e colocada em tubo de criopreservação devidamente identificado e armazenado em freezer -70 °C. Ao restante da amostra foi acrescentado PBS (Tampão Fosfato Salino) 0,01 M e pH 7,2 e realizada uma centrifugação a 2.500 rpm por 5 minutos a 4 °C. A amostra contendo PBS após centrifugação foi separada em duas alíquotas: sendo uma alíquota de 1 mL de sobrenadante e 1 alíquota com o pellet. Posteriormente foram armazenadas a -70 °C.



#### 4.7 Análises *in silico*

Foi realizada revisão literária para escolha dos oligonucleotídeos que amplificam uma região conservada 5' UTR. Essa região é uma região conservada do genoma do HRV que permite a identificação do HRV de forma específica. O par de oligonucleotídeos selecionado para este estudo amplifica especificamente as espécies de HRV (HAMMITT et al., 2011) relatada na Tabela 1.

As sequências de oligonucleotídeos foram analisadas por ferramentas de bioinformática, utilizando programas como BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) com sequências de HRV disponíveis no banco de dados do NCBI- *Nacional Center Bank Bioinformatic*. O alinhamento múltiplo realizado foi por meio do programa MEGA6. Sendo selecionado para o presente estudo o par de oligonucleotídeos proposto no estudo de HAMMITT e colaboradores (2011).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizado nos ensaios de PCR em tempo Real.

Descrição	Sense 5'- 3'	Antisense 5'- 3'	Fragmento
HRV	TGGACAGGGTGTGAAGAGC	CAAAGTAGTCGGTCCCATCC	144pb

#### 4.8 Controle positivo

A amostra controle do HRV foi previamente identificada, no laboratório de Virologia Molecular da FIOCRUZ/RO, sendo seqüenciada na Plataforma de Sequenciamento da FIOCRUZ Bahia.

#### 4.9 Extração de RNA

Para padronização da extração de RNA HRV foi realizado dois protocolos de extração utilizando o controle positivo do HRV: A primeira metodologia utilizada foi Trizol (Invitrogen) e a segunda foi *Kit QIAamp®Viral RNA Mini kit* (QIAGEN® Hilden, Germany).

O protocolo da primeira extração consistiu em quatro etapas: a primeira correspondeu à separação de fases, a segunda fase de recuperação, terceira fase do isolamento RNA, e por final ressuspensão do RNA.

Na primeira etapa foi adicionado em um tubo de 1,5 mL 40 µL de proteinase K a 10mM, adicionado 250 µL da amostra e incubado a 56°C por 10 minutos (min). Após incubação foi acrescentado 750 µL Trizol e homogeneizado vigorosamente por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente foram adicionados 200 µL de clorofórmio homogeneizado por 15 segundos (seg) e incubado em temperatura ambiente por 2 min. Centrifugou-se a 12000 xg a 4°C por 15 minutos. A mistura se separou em uma fase vermelha de fenol-clorofórmio (parte mais inferior do tubo), uma interfase branca, quase imperceptível e fase aquosa incolor na parte superior do tubo. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa.

Na fase de recuperação para a extração de RNA foi removido à fase aquosa da amostra inclinado 45° e utilizando uma micropipeta de 200 µL e, posteriormente, uma micropipeta de 10 µL para maior precisão, e transferido para um novo tubo de 1,5 mL. O isolamento de RNA consistiu primeiramente na precipitação onde foi adicionar 500 µL de isopropanol 100% (álcool isopropílico) na fase aquosa. E foi incubado em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 12.000 xg a 4 °C por 10 min. Após centrifugação foi realizado a lavagem removendo e descartando o sobrenadante utilizando micropipeta de 200 µL e 10 µL. E lavado com 1mL de etanol a 75% homogeneizar e centrifugar a 7.500 xg a 4 °C por 5 min. Após centrifugação foi descartado o lavado por inversão deixado em repouso para secagem do sedimento de RNA por 10 min.

E por último, o RNA foi ressuspensando em 50 µL de água RNase free e incubado a 55 °C por 10 min e por final o RNA foi armazenado a -20°C.

A segunda extração do RNA HRV foi realizada com o *Kit QIAamp®Viral RNA Mini* kit (QIAGEN® Hilden, Germany), onde foram adicionado á amostra 560 µL do tampão AVL em tubo 1,5 mL, juntamente com uma alíquota de 280µL do sobrenadante, o qual foi homogeneizado em vórtex por 15 seg e incubado a temperatura ambiente por 10 min para lise da membrana. Após incubação foi centrifugado por 1 min a 12.000 rpm. Depois de centrifugado, foram acrescentados 560µL de etanol e homogeneizado por 15 seg. Em seguida foi transferido o conteúdo em colunas sílicas acoplados a coletores, para filtragem, e centrifugado por 1 min a 12.000 rpm.

Posteriormente, o filtrado foi descartado e adicionado a coluna 500 µL do tampão de lavagem AW1 e centrifugado por 1 min a 12000 rpm (na sequência foi descartado o filtrado). Em seguida, adicionado a QIAamp Mini coluna 500 µL do tampão AW2 e centrifugado a 12.000 rpm por 3 min, em seguida foi desprezado o filtrado. Foi realizado uma nova centrifugação por 1 min a 12.000 rpm. E transferido as colunas para outro tubo de 1,5 mL. Foi acrescentado na coluna 20µL do tampão de eluição e incubado por 1 min a temperatura ambiente. Finalizando com centrifugação por 1 min a 12.000 rpm. E armazenado a temperatura de -20°C ou -70°C.

#### **4.10 Transcrição reversa**

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizado o teste com duas enzimas transcriptase reversa para avaliação da maior sensibilidade do teste de PCR em tempo real.

Em primeira reação foi preparado um primeiro mix com um volume final de 24 µL, contendo 1µL *random primer* 1 µL dntp e 10µL de RNA viral onde foi incubado a 65°C por 5 min e 1 min no gelo. Logo após, foi adicionado um segundo mix com um volume de 6 µl, contendo o tampão 1X, 0,1 M DTT, 40 unidades de Inibidor de *Rnase*, 200U de Super Script™ III (Invitrogen™ *Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) resultando em um volume final de 30µl e incubado a 25 °C á 5 min, 50 °C á 60 min e 70 °C por 15 min.

O segundo teste foi utilizando a enzima *Reverse Transcriptase Moloney murine leukemia virus* (M-MLV) (Sigma Aldrich®, Saint Louis, USA). O RNA foi desnaturado a 95°C por 5 min, com o objetivo de desfazer as estruturas secundárias, e convertido em cDNA a partir de 15 µL de RNA da extração com 200 unidades da enzima M-MLV, 1 µL do Tampão 10X M-MLV *Reverse Transcriptase*, 1 µL de oligonucleotídeos randômico e 1 µL de dNTP MIX a 10mM. As condições de termociclagem para síntese do cDNA foram: 37°C por 50 min e 94°C por 10 min.

#### **4.11 PCR em tempo real**

Para padronização da PCR em tempo real com oligonucleotídeos específicos (HAMMITT et al., 2011) foi realizado reação em um gradiente de concentração dos oligonucleotídeos (sense e antisense) de 50 nM a 900 nM.

A amplificação do HRV foi realizada na plataforma ABI 7500 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) com volume total de 30µl contendo SYBR®Green (*Applied Biosystems - Foster city, Califórnia, USA*) á 1x, 50 nM dos oligonucleotídeos sense e antisense e 5µl de cDNA HRV.

#### **4.12 Dados Climatológicos**

Os dados climatológicos utilizados para comparação da distribuição de positividade do HRV foram retirados da estação de monitoramento meteorológico da Usina Santo Antônio – RO. Dados estes disponível no endereço eletrônico da Secretaria de Estado do Desenvolvimento Ambiental (SEDAM) <http://www.sedam.ro.gov.br/index.php/simego>

#### **4.13 Dados Epidemiológicos e Clínicos**

Os resultados epidemiológicos e clínicos foram armazenados no banco de dados (Software Microsoft EXCEL® 2007) onde foram tabulados para análise dos resultados.

#### **4.14 Análises estatísticas**

Todos os resultados tabulados foram submetidos às análises estatísticas utilizando testes paramétricos por meio do programa *GraphPad Prism v.s 5.*, realizando o teste exato de *Fischer* e o *Odds Ratio*. A significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ .

#### **4.15 Dados para avaliação de múltiplas infecções**

Para avaliação de possíveis múltiplas infecções foram cedidas gentilmente os resultados da bactéria *Streptococcus pneumoniae* e *Adenovirus* dos trabalhos de Dissertação desenvolvidos no laboratório de Microbiologia e Virologia molecular, respectivamente.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análises dos oligonucleotídeos

As sequências dos *oligonucleotídeos* selecionados para a PCR em tempo real qualitativa mostraram-se conservados para as espécies do HRV quando realizado as análises *in silico* utilizando os programas MEGA6 (figura 8) e o alinhamento local pelo BLAST (Figura 6 e 7).

Figura 6. Alinhamento realizado no BLAST com oligonucleotídeo sense HRV, mostrando uma máxima identidade entre as cepas utilizadas no alinhamento.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A strain HRV/Ulaanbaatar/2013/0282 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KM462698.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A strain HRV/Ulaanbaatar/2013/0081 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KM462697.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate 249 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KP068618.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus C isolate 174 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KP068605.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus C isolate 103 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KP068599.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate 050 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KP068591.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Enterovirus sp. isolate CB14 polyprotein gene, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KM361526.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus R33 isolate AK173 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ748197.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus W15 isolate AK23 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ748047.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus C isolate MX-U76 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ765075.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate MX-U18 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ765050.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate MX-U53 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ765044.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate MX-U20 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ765028.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate MX-C4 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ765025.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate MX-U36 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ765023.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate MX-T1 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ765021.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate MX-U35 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KJ765013.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus A isolate 06-002 5' UTR</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KC492758.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus sp. isolate VM-09-156-1836 polyprotein gene, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.58	100%	<a href="#">KF543938.1</a>

Figura 7. Alinhamento realizado no BLAST com oligonucleotídeo antisense HRV, mostrando uma máxima identidade entre as cepas utilizadas no alinhamento.

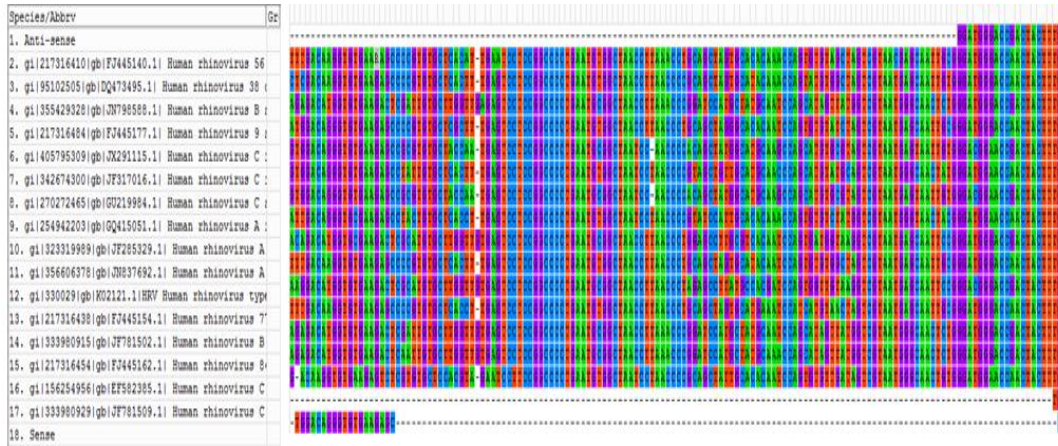
Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus sp. isolate KA08-3358 5' UTR</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KJ919926.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus B isolate BCH214, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">GU568096.2</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus B isolate MX-L20 5' UTR</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KJ765120.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate MX-L56 5' UTR</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KJ765057.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus A isolate MX-U11 5' UTR</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KJ765037.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Rhinovirus B isolate R93, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KF958309.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus B isolate V38 URT-2.5m polyprotein gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">JF285331.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus B isolate V38 URT-6.9m polyprotein gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">JF285330.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus A isolate V38 URT-6.3m polyprotein gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">JF285329.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus A isolate P37 URT LCT-0d polyprotein gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">JF285324.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus A isolate P37 URT LCT-15d polyprotein gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">JF285323.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus A isolate P37 URT LCT-2.9m polyprotein gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">JF285322.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus A isolate P37 LRT LCT-7.6m polyprotein gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">JF285321.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus B isolate A46 LRT-6.7m polyprotein gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">JF285309.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus B isolate A46 URT-6.7m polyprotein gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">JF285308.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus sp. isolate WM-09-148-2403 polyprotein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KF543928.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus sp. isolate WM-09-147-4111 polyprotein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KF543920.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus sp. isolate WM-Mash08-69 polyprotein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KF543915.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus sp. isolate WM-07-138-1266 polyprotein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KF543908.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus sp. isolate WM-07-135-2821 polyprotein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KF543907.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Human rhinovirus sp. isolate WM 07 124 5126 polyprotein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.15	100%	<a href="#">KF543906.1</a>

Figura 8. Alinhamento múltiplo, utilizando o programa MEGA6, das sequências do HRV retiradas do GenBank, sequências estas, correspondem as três diferentes espécies do HRV.

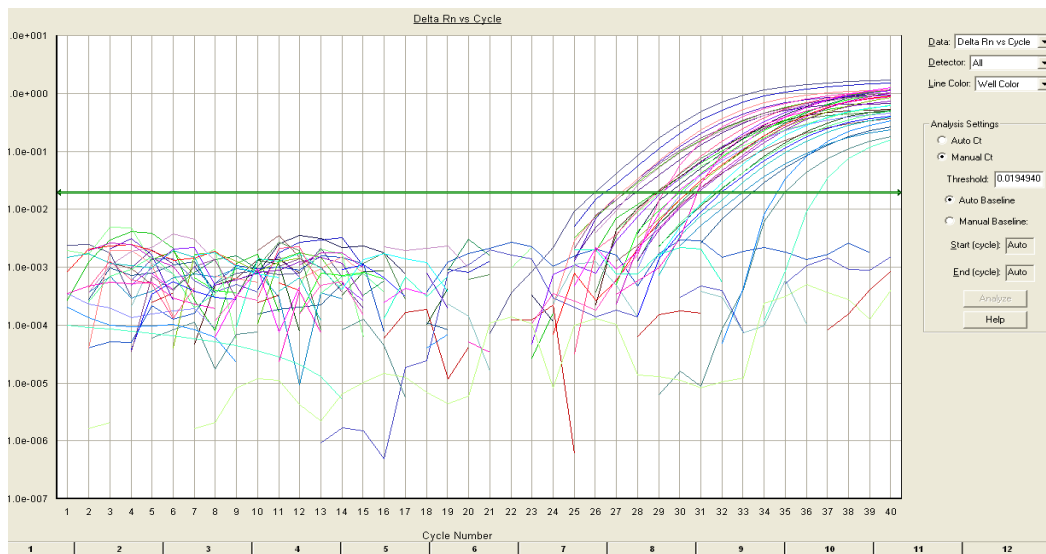


## 5.2 Resultado PCR em tempo real

Do total das 304 amostras selecionadas segundo o perfil clínico que mais caracterizava uma infecção por HRV 26,3% (80/304) apresentaram positividade. Resultados estes obtidos por meio do ensaio de PCR em tempo real qualitativa *in vitro* demonstrada na figura 9 à curva de amplificação da PCR em tempo real qualitativa utilizando o sistema SYBR Green utilizando os oligonucleotídeos HRV (Tabela 1).



Figura 9. Curva de amplificação do HRV de amostras positivas no ensaio de PCR em tempo real utilizando o SYBR Green.



### 5.3 Descrição Populacional das amostras positivas para HRV

Das 80 amostras positivas para HRV 56% (45/80) pertenciam ao sexo masculino e 44% (35/80) ao sexo feminino. Neste estudo foi avaliada a quantidade de pessoas que residiam dentro da mesma residência. Foi observado que percentual de 37,5% (30/80) estava associado a crianças que moravam com até 2 pessoas, 35% (28/80) de 3 a 4 pessoas, 24% (19/80) >5 pessoas e 4% (3/80) não informaram. A renda familiar dos responsáveis foi de um salário mínimo em 50% (40/80) das amostras das crianças positivas, 30% (24/80) tinham entre 2 a 3 salários, 9% (7/80) tinham acima de 4 salários mínimos e 11% (9/80) não informaram (Tabela 2). Foram realizados os testes estatísticos dos dados clínicos e epidemiológicos referentes à população de estudo, porém não houve significância estatística entre os dados analisados.

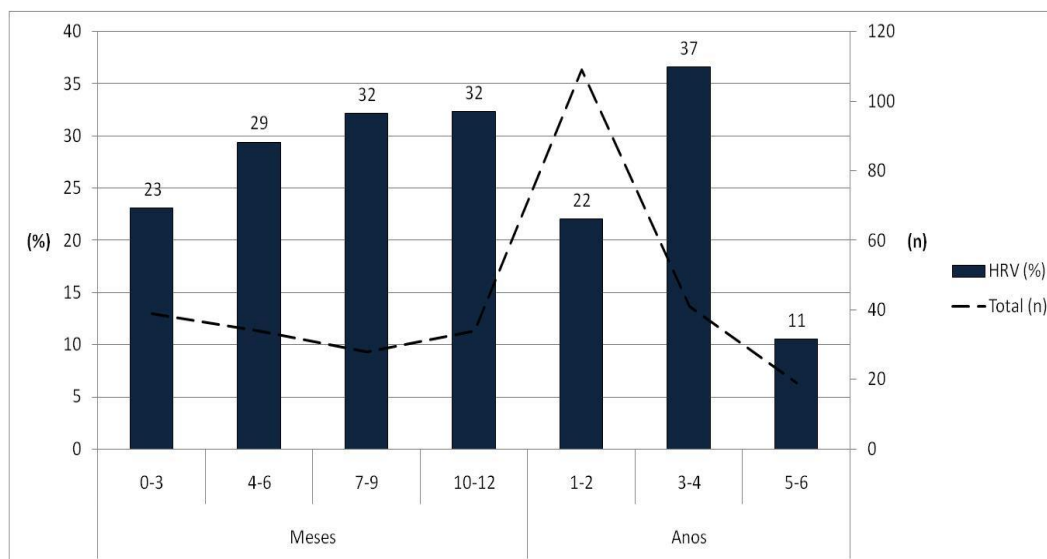


Tabela 2. Dados epidemiológicos dos casos positivos para HRV.

		HRV	
Gênero		Positivos	Negativos
Mas		45	116
Fem		35	108
<b>Total</b>		<b>80</b>	<b>224</b>
Número de Moradores			
1-2		30	68
3-4		28	88
>5		19	62
NI		3	6
<b>Total</b>		<b>80</b>	<b>224</b>
Renda Familiar			
1		40	118
2-3		24	79
>4		7	10
NI		9	17
<b>Total</b>		<b>80</b>	<b>224</b>

A presença do vírus foi detectada em todas as faixas etárias analisadas. Sendo que quando avaliado os meses abaixo de 1 ano de idade e somando essa positividade a faixa etária entre 1 e 2 anos, o número de positividade aumenta comparado a faixa de 3 a 4 anos (Figura 10).

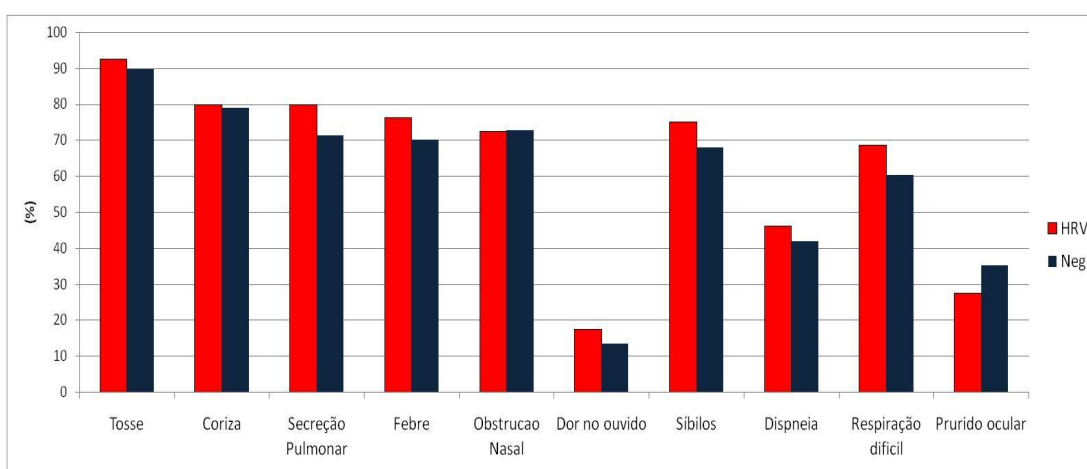
Figura 10. Distribuição do HRV por faixa etária.



#### 5.4 Sintomatologia da população amostral dos HRV positivos

Do total das 304 amostras analisadas foi comparado, quanto aos sintomas, o número de positivos (80/304) com as amostras negativas para HRV. Observou-se que nas 80 amostras positivas os sintomas como tosse, coriza, secreção pulmonar, obstrução nasal, sibilos, dispneia e febre apresentaram frequências superiores a 60% (Figura 11). Também foram observados sintomas como pruridos oculares e otalgia. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os sintomas das crianças positivas para HRV quando comparadas com as negativas.

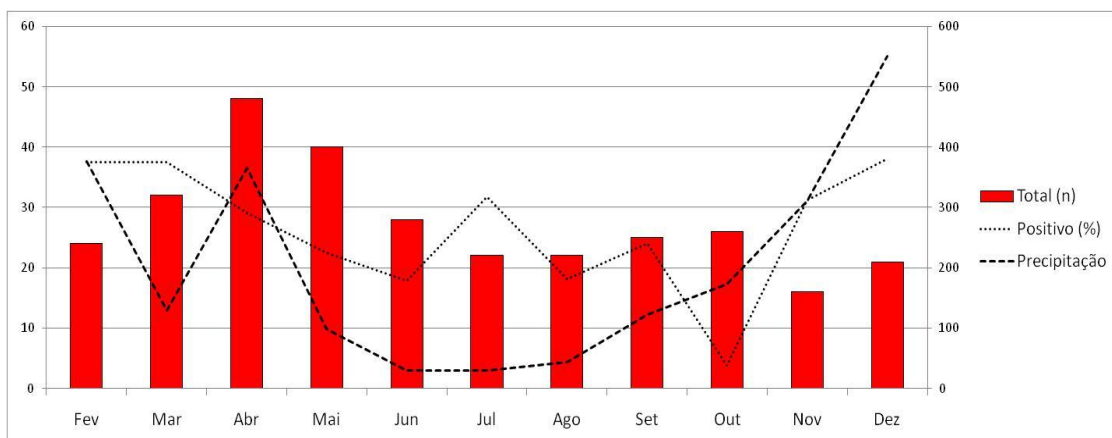
Figura 11. Sintomas relatados pelos pais ou responsáveis.



#### 5.5 Sazonalidade climática da população amostral dos HRV positivos

O vírus foi detectado durante todo o ano. No período de chuva (novembro a abril) os meses de fevereiro a abril a frequência do HRV foi constante, diminuindo a positividade a partir do mês de março até o mês de junho. No período de seca (maio a outubro) observa-se oscilação da frequência do HRV com picos em julho e outubro, voltando a ascender à positividade do mesmo, em novembro e dezembro. A positividade do HRV ficou distribuída com maior frequência nos meses dezembro (38%), fevereiro (37,5%), março (37,5%), julho (31,8%) e novembro (31,2%), respectivamente (Figura 12).

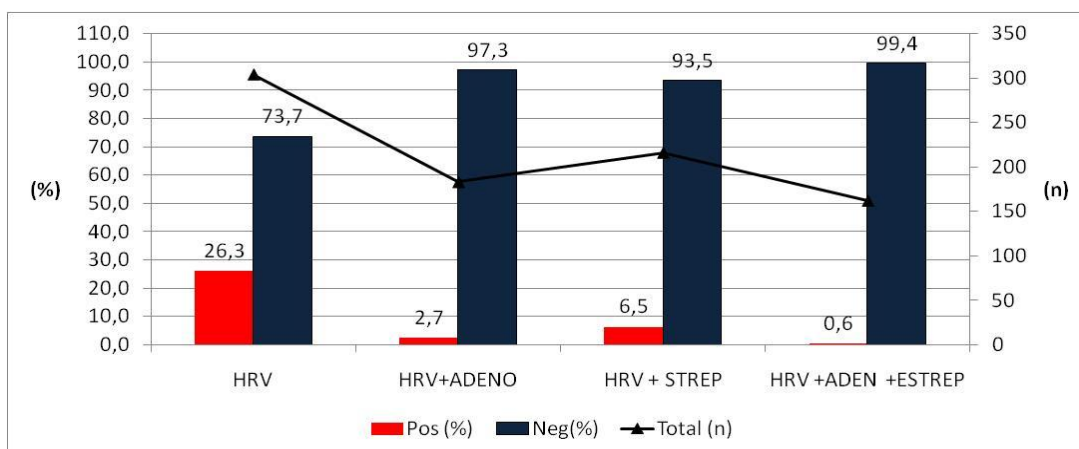
Figura 12. Distribuição de detecção HRV durante o ano de 2013.



## 5.6 Múltiplas infecções

Das 304 amostras testadas tanto para HRV quanto para *Streptococcus pneumoniae*, apenas 268 foram analisadas para pesquisa do *Adenovirus*. Sendo 80 amostras positivas para HRV, 28 para *Adenovirus* e 36 para *Streptococcus pneumoniae*. Observou-se 5 casos de dupla infecção entre HRV + *Adenovirus*, 14 casos de duplas infecções entre HRV + *Streptococcus pneumoniae* e 5 casos de dupla infecção entre *Adenovirus* + *Streptococcus pneumoniae*. O único caso de múltipla infecção entre *Adenovirus* + *Streptococcus pneumoniae* + HRV (Figura 13).

Figura 13. Casos de dupla e múltipla infecção entre patógenos respiratórios.



## 6 DISCUSSÃO

Estudos em populações que apresentam morbidades respiratórias têm relatado que o número de moradores e o número de crianças menores de cinco anos no domicílio evidenciam clara associação com as doenças respiratórias (PRIETSCH et al., 2002). Estudo buscou verificar os fatores associados às doenças respiratórias e verificaram que aglomeração apareceu como um importante fator de risco para infecções respiratórias (PRIETSCH et al., 2008). Estudo realizado verificou que alto índice de pessoas por cômodo na residência e alto índice de pessoas por quarto, estiveram associados com doença aguda das vias aéreas inferiores na análise bruta. O índice pessoa por quarto mostrou redução do efeito quando ajustado pelos fatores socioeconômicos, idade materna e demais variáveis ambientais, mas permaneceu significativamente associado (SOUSA, 2012). Tais resultados indicam que a aglomeração tem muito de seu efeito confundido por aqueles fatores, no entanto exerce algum efeito independente, como fator de risco para doenças respiratórias agudas, em especial quanto ao número de pessoas que compartilham o quarto de dormir com as crianças.

Estudos demonstram que o ensaio de PCR em tempo real tem sido a principal meio de detecção molecular para investigação etiológica de IRA (HAMMITT et al., 2011; FRANCO et al.; 2012).

A diversidade de sorotipos do HRV, ainda, tem sido a principal dificuldade para padronização de ensaios de PCR em tempo real. Pois, a variedade de sorotipos do HRV dificulta a escolha de oligonucleotídeos e sonda que anelem com eficiência e que permitam a detecção de todos os sorotipos virais. Porém, ao longo do desenvolvimento das técnicas moleculares tem-se permitido a identificação do HRV por meio de PCR em tempo real utilizando sistemas e oligonucleotídeos que possibilitam a identificação e caracterização das espécies do HRV (DAGHER et al., 2004). Estudo realizado para verificar a predominância e diversidade genética do HRV em crianças no Panamá utilizou a técnica de PCR em tempo real que permitiu a identificação viral e caracterização por meio do seqüenciamento (FRANCO et al., 2012). No presente estudo foram analisados e selecionados os oligonucleotídeos com capacidade de detectar as espécies do HRV (Figura 6, 7 e 8).

Estudo realizado no Japão demonstrou positividade para o vírus HRV de 18,4% do total de 501 amostras analisadas (ARAKWA et al., 2012). Dois estudos realizados em Milão, Itália, demonstraram a presença significativa do HRV como segundo principal agente infeccioso. No primeiro estudo, do total de 592 amostras, 435 foram positivos para diferentes vírus respiratórios, dentre estes positivos 144 (24,3%) foram HRV (ESPOSITO et al., 2012). O segundo estudo foi realizado em uma população infantil de 643 crianças, e observou-se detecção viral para diferentes vírus respiratórios em 469 (72,9%) amostras, do total de positivos 198 (42,2%) foram HRV (DALENO et al., 2013). Em pesquisa realizada em Fortaleza, Brasil, o HRV foi detectado em 18,9% (77/407) da população (BEZERRA et al., 2011). Estudo descritivo desenvolvido em Vitória, Sudeste do Brasil, com 162 amostras biológicas obtidas ao longo de dois anos o HRV foi segundo agente viral mais prevalente com 8,6% (14), sendo mais de 50% das amostras de HRV positivos identificados em crianças menores de dois anos de idade (JÚNIOR et al., 2014). A presença do HRV neste estudo foi de 26,3% (80/304). Esta taxa de detecção é concordante com estudos anteriores em países desenvolvidos e no Brasil.

O HRV tem sido identificado em vários estudos voltados para identificações etiológicas em infecções respiratórias superiores, fato que o caracteriza como um frequente patógeno dessa morbidade em população infantil e costumam ser recorrentes em lactentes e crianças até 5 anos de idade (KIENINGER et al., 2012). Em pesquisa realizada na Europa com crianças da faixa etária de 1 mês a 14 anos que manifestavam algum sinal e/ou sintomas de infecção do trato respiratório inferior detectou o HRV com maior frequência em crianças com idade menor que 1 ano (31,1%) (DALENO et al., 2013). No presente estudo o perfil de maior frequência do vírus foi durante os dois primeiros anos de idade, não divergindo da literatura.

Apesar da presença dos sintomas tanto no grupo positivo quanto no grupo negativo, estudos mostram os sintomas mais importantes no caso de infecções por HRV são: tosse, coriza, secreção pulmonar, obstrução nasal, sibilos (chiados no peito), dispneia e febre. Os sintomas observados com positividade para HRV evidenciaram frequência acima de 60%.

Estudo realizado por Miller e colaboradores (2014) relata que o HRV causa a doença clínica mais significativa em crianças mais velhas com alto

risco de atopia com histórico prévio de sibilância. No presente estudo 75% das crianças apresentaram episódio de sibilância fato que pode criar condições para possíveis casos de atopia. No sudeste do Brasil estudo realizado observou que o grupo sintomático positivo para HRV manifestaram sintomas como coriza (100%), tosse (77,8%) e febre (22%) (CAMARGO et al., 2012). Os dados da literatura corroboram com o observado no presente estudo, já que quando analisado a presença do vírus relacionado aos sintomas apresentados verificou frequência de sintomas semelhantes ao de outros estudos. No entanto, quando realizado testes estatísticos (dados não mostrados) para comparação do grupo positivo com o grupo negativo para HRV, no que se refere à manifestação dos sintomas, não se constatou diferença estatística entre os sintomas apresentados pelas crianças infectadas e não infectadas com HRV. Porém, otalgia (dor de ouvido) foi mais frequente nos indivíduos positivos para HRV, isso pode estar relacionado à resposta imunológica do organismo frente à infecção por HRV que possibilitam a colonização de bactérias patogênicas (SAVOLAINEN-KOPRA et al., 2009; MAROM; NOKSO-KOIVISTO; CHONMAITREE, 2013). No entanto, é importante considerar que os sintomas presentes, tanto nos indivíduos infectados quanto não infectado, são inespecíficos em quadro de infecções respiratórias, não permitindo afirmar qual patógeno está presente apenas relacionando a clínica.

Sabe-se que o tempo e o clima e os fatores ambientais podem influenciar no perfil e na ocorrência de doenças do aparelho respiratório, aumentando tanto a demanda de consultas ambulatoriais quanto as internações nos meses de chuva, principalmente em crianças (BOTELHO et al., 2003).

Estudo realizado em Istambul, Turquia, a detecção de HRV surgiu de forma endêmica em todo o ano, diminuindo nos meses entre dezembro e maio, marcado por um clima úmido subtropical (BICER et al., 2013). Pesquisa realizada em Milão, Itália, durante cinco anos consecutivos a detecção ocorreu no período do inverno e primavera (DALENO et al., 2013). Na África, pesquisa desenvolvida revelou a detecção do HRV ao longo dos dois anos de estudo sem variabilidade sazonal (PRETORIUS et al., 2012).

Em São José do Rio Preto (BONFIM et al., 2011) observou-se que, no verão, o número de infecções respiratórias diminuiu corroborando com outro

estudo realizado no estado de São Paulo que foram detectados principalmente durante os meses mais frios (VIEIRA et al., 2001). Os dados da literatura reforçam a presença do HRV distribuído de forma sazonal durante o período de 365 dias em diferentes partes do mundo, podendo apresentar picos ou não, dependendo das condições climáticas, ou ainda predisposição da população mais atingida. No presente estudo o HRV ficou distribuído com maior frequência nos meses dezembro, fevereiro, março, julho e novembro, respectivamente. Sendo mais frequentes no período da chuva.

Pesquisa realizada em Rondônia no HICD relatou que as doenças do aparelho respiratório nos anos 2007, 2008 e 2010, aparecem com maior frequência especialmente no período de seca, período em que a estiagem das chuvas torna-se evidente e se inicia o processo de queimadas na região. Em função da grande área de contato entre a superfície do sistema respiratório e o meio ambiente, a qualidade do ar influencia diretamente na saúde respiratória. Além disso, uma quantidade significativa dos poluentes inalados, principalmente em períodos de seca, atinge a circulação sistêmica através dos pulmões e pode causar efeitos deletérios em diversos órgãos e sistemas (BARROS, 2011; ARBEX et al., 2012).

No ano de 2009, se observou o aumento do número de internações no período de chuva quando comparados aos períodos de seca. Nota-se ainda, o aumento das taxas de internação por pneumonia no período seco em todos os anos estudados no HICD. A frequência mensal dos focos de calor para o município de Porto Velho, os anos de 2007 e 2010 foram os anos com maior número de queimadas quando comparados aos quatro anos estudados (BARROS, 2011).

Embora a pneumonia seja a causa mais importante de morte na infância, as otites médias agudas também causam um grande encargo para saúde global. De modo geral, 80% das crianças de até 3 anos de idade já sofreram pelo menos um episódio de otite média aguda. O conhecimento e entendimento sobre a interação viral-bacteriana na otite média têm implicações clínicas sobre gestão desse tipo infecção. De modo geral pacientes com leve a moderada otite média aguda recuperam espontaneamente sem antibiótico (BOSCH et al., 2013).

Kloepfer e colaboradores (2014) analisaram se a detecção viral aumentou a probabilidade de detecção de bactérias, ou vice-versa e observaram que o HRV aumentou as condições para colonização bacteriana na mesma amostra (OR, [95% CI, 1,4-2,7] 2,0; P <0,0001) e para a detecção de bactérias na semana seguinte. Em contraste, a detecção de bactérias não aumentou à chance de detecção viral a seguinte semana. A infecção por HRV foi associada com uma maior probabilidade de detecção de bactérias nas amostras nasais e também um aumento da colonização das bactérias *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis*. No presente estudo houve 14 casos de duplas infecções entre HRV + *Streptococcus pneumoniae*, porém não foi observada significância estatística.

Algumas co-infecções foram observadas no presente estudo. Considerando-se que poucos estudos analisaram co-infecções de vírus respiratórios e nenhum estudo relatou suas associações *in vitro* ou *in vivo*, portanto o perfil de co-infecções entre vírus ainda permanece incerto (BRUNSTEIN et al., 2008; GREER et al., 2009; KAIDA et al., 2014). Kaida e colaboradores observaram duas duplas infecções entre *Adenovirus* e HRV em estudo realizado com crianças menores de 6 anos de idade.



## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados podemos concluir que:

O *Rinovirus humano* foi encontrado em considerável frequência na população amostral analisada, reforçando sua importância como agente etiológico nas IRA.

O vírus apresentou frequência climatológica durante todo ano, apesar das análises estatísticas não apresentarem diferenças significantes a positividade do HRV esteve mais frequentes nos meses de chuva.

Apesar de não podermos afirmar a gravidade da doença quando correlacionado a presença do HRV foi possível verificar que os sintomas como tosse, coriza, secreção pulmonar, obstrução nasal, síbilos, dispneia e febre tiveram maior frequência nos casos positivos do que nos casos negativos para HRV.

A bactéria *Streptococcus pneumoniae*, entre os patógenos co-infectados com HRV foi mais frequente.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **TRATO RESPIRATÓRIO: Critérios Nacionais de Infecções relacionadas à Assistência à Saúde**, 2009. 8p.

ALVIM, C. G. **Saúde da criança e do adolescente: doenças respiratórias**. Cristina Gonçalves Alvim e Laura Maria de Lima Belizário Facury Lasmar. Belo Horizonte: Coopmed; Nescon UFMG, 2009.

ANZUETO, A.; NIEDERMAN, M.S. Diagnosis and treatment of rhinovirus respiratory infections. **Chest**, v. 123, n. 5, p. 1664–72, maio 2003.

ARAKAWA, M. et al. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species A, B and C from patients with acute respiratory illnesses in Japan. **Journal of Medical Microbiology**. v. 61, p. 410–9, mar. 2012.

ARBEX M. A. et al. A poluição do ar e o sistema respiratório. **J Bras Pneumol**. 38(5):643-655, 2012.

ARISMENDY, J.P.; CASTELLANOS, J.E. Real time PCR.Application in dengue studies.**Colombia Médica**. v. 42 n 2, p. 243-258, 2011.

BARENFANGER, J.; DRAKE, C.; LEON, N.; MUELLER, T.; TROUTT, T.; Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcome study. **J Clin Microbiol**. 2000; 38(8):2824-8.

BARROS, M.M.A. **Poluição Atmosférica e Hospitalizações por Doenças respiratórias em crianças menores de 12 anos no município de Porto Velho-Ro, Amazônia Ocidental** [dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente do Núcleo de Ciências e Tecnologia)]. Porto-Velho: Fundação Universidade Federal De Rondônia; 2011.

BEZERRA, P.G.M. et al. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18928, jan. 2011.

BICER, S. et al. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. **Italian journal of pediatrics**, v. 39, p. 22, jan. 2013.

BONFIM, C.M. et al., Frequent respiratory pathogens of respiratory tract infections in children attending daycare centers.**J Pediatr** (Rio J). 87(5):439-44. 2011.

BOSCH, A. A.T.M. et al. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. **PLOS Pathogens**. v.9 | Issue 1 | e1003057. 2013.

BOTELHO, C. et al. Fatores ambientais e hospitalizações em crianças menores de cinco anos com infecção respiratória aguda. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 19(6):1771-1780, nov-dez, 2003.

BRUNSTEIN, J. D. et al. Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. **J Clin Microbiol.** 46:97-102, 2008.

BUSTIN, S.A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, 55(4):611-622. 2009.

CAMARGO, C. N. et al. Human rhinovirus infections in symptomatic and asymptomatic subjects. **Brazilian journal of microbiology** : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], v. 43, n. 4, p. 1641–5, out. 2012.

CHAVOSHZADEH, Z. et al. Molecular Study of Respiratory Syncytial Virus, Human Rhinovirus and Human Metapneumovirus, Detected in Children With Acute Wheezing. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 14–17, 2 out. 2012.

CORDEY, S. et al. **Rhinovirus : diversité clinique et génomique.** v. 12, n. 5, p. 361–373, 2008a.

CORDEY, S. et al. Rhinovirus Genome Evolution during Experimental Human Infection. v. 5, n. 5, 2010.

CORDEY, S. et al. The cis -acting replication elements define human enterovirus and rhinovirus species. p. 1568–1578, 2008b.

DA SILVA, E.R. 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**, v. 13, p. 41, jan. 2013.

DALENO, C. et al. Phylogenetic Analysis of Human Rhinovirus Isolates Collected from Otherwise Healthy Children with Community-Acquired Pneumonia during Five Successive Years. **PLOS ONE** v. 8, n. 11, p. 1–9, 2013.

DEFFERNEZ, C. et al. Amplicon Sequencing and Improved Detection of Human Rhinovirus in Respiratory Samples. **Journal of Clinical Microbiology** v. 42, n. 7, p. 3212–3218, 2004.

DO, D.H. et al. A One-Step , Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Rhinovirus. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 1, p. 102–108, 2010.

ESPOSITO, S. et al. Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. **Influenza Journal** v. 7, n. 1, p. 18–26, jan. 2012.

FERREIRA.D.F.; COSTA, L.J.; CAYALEIRO, N.P.; CÂMARA, F.P.; MIRANDA, M.M.F.S. Propriedades gerais dos vírus, estratégias de replicação dos vírus e arquitetura dos vírus. In Introdução a virologia humana, 2ª edição, **Editora Guanabara**, 2008.

FRANCO et al.: High genetic diversity and predominance of Rhinovirus A and C from Panamanian hospitalized children under five years with respiratory infections. **Virology Journal**. 9:257, 2012.

GERN, J. E. AND BUSSE, W. W. **Association of Rhinovirus Infections with Asthma**. *Clinical Microbiology Reviews*, Jan., p. 9–18, 1999.

GHILDYAL, R. et al. Rhinovirus 3C Protease. **Nucleus and Alter Active and Passive Nucleocytoplasmic Transport**. v. 83, n. 14, p. 7349–7352, 2009.

GREER, R. M. et al. Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? **J Clin Virol**. 45:10-5, 2009.

HAI, L.T.; et al. Fatal Respiratory Infections Associated with Rhinovirus Outbreak, Vietnam Emerging. **Infectious Diseases**. Vol. 18, No.11. 2012.

HAMMITT, L.L. et al. Added value of an oropharyngeal swab in detection of viruses in children hospitalized with lower respiratory tract infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2318–20, jun. 2011.

HONG, H.L. et al. Viral infection is not uncommon in adult patients with severe hospital-acquired pneumonia. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95865, jan. 2014.

HOUGHTON, S.G.; COCKERILL, F.R. Real-time PCR: overview and applications. **Surgery**, v. 139, n. 1, p. 1–5, jan. 2006.

**International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)** Copyright ©2014. Disponível em <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. 2014>.

JACOBS, S.E. et al. Human rhinoviruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 135–62, jan. 2013.

JÚNIOR, R.B.M. et al. Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection . **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 109(6): 716-721, 2014.

KAIDA, A. et al. Associations between Co-Detected Respiratory Viruses in Children with Acute Respiratory Infections. *Jpn. J. Infect. Dis*. 67, 469–475, 2014.

KAJON, A.E.; XU, W.; ERDMAN, D. D. Sequence polymorphism in the E3 7.7 ORF of subspecies B1human adenoviruses. **Virus Res**. 107:11-19. 2005.

KENNEDY, J. L. et al. Pathogenesis of rhinovirus infection. **Current opinion in Virology**, v. 2, n. 3, p. 287–93, jun. 2012.

KIENINGER, E. et al., Rv Infections In Infancy And Childhood. **European Respirator J**; 41: 443–452, 2013.

KLOEPFER, K. M. et al. Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 133, n. 5, p. 1301–7, 1307.e1–3, maio 2014.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95–125, 2006.

LALAM, N. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. **Journal of Theoretical Biology**.v.242 p.947–953, 2006.

LANDA-CARDEÑA, A. et al. Clinical characteristics and genetic variability of human rhinovirus in Mexico. **Viruses**, v. 4, n. 2, p. 200–10, fev. 2012.

LAU, S. K. P. et al. Clinical Features and Complete Genome Characterization of a Distinct Human Rhinovirus ( HRV ) Genetic Cluster , Probably Representing a 41 Previously Undetected HRV Species , HRV-C , Associated with Acute Respiratory Illness in Children . **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 11, p. 3655–3664, 2007.

LAU, S.K.P. et al. Human rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species. **Emerging Health Threats Journal**, 3:e2. doi: 10.3134/ehth.10.002. 2010.

LEDFORD, R.M. et al. VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: Insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds. **Journal of Virology**.78: 3663–3674, 2004.

LEWIS-ROGERS, N.; BENDALL, M. L.; CRANDALL, K. A. Phylogenetic relationships and molecular adaptation dynamics of human rhinoviruses. **Molecular biology and evolution**, v. 26, n. 5, p. 969–81, maio 2009.

MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSHE, A. Real-Time PCR in virology.**Nucleic acids research**. v.30, n.6, p. 1292- 1305, 2002.

MARCONE, D. N. et al. Rhinovirus detection by real-time RT-PCR in children with acute respiratory infection in Buenos Aires , Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia** p. 259–265, 2012.

MAROM, T.; NOKSO-KOIVISTO, J.; CHONMAITREE, T. Viral–Bacterial Interactions in Acute Otitis Media. **Curr Allergy Asthma Rep.**; 12(6): 551–558. doi:10.1007/s11882-012-032012 .2013.

MATSUNO AK. Insuficiência respiratória aguda na criança. Medicina (Ribeirão Preto) Simpósio: EMERGÊNCIAS PEDIÁTRICAS Capítulo II ;45(2): 168-84), 2012.

MCERLEAN, P. et al. Distinguishing Molecular Features and Clinical Characteristics of a Putative New Rhinovirus Species , Human Rhinovirus C (HRV C ). **PLOS ONE**v. 3, n. 4, 2008.

MILLER, E.K. Rhinovirus in Young Children. **Journal of Infectious Diseases**. 195:773–81. 2007.

NAIR, H. et al. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. **Lancet**, v. 381, n. 9875, p. 1380–90, 2013.

OLIVEIRA, L.F. DE; CARVALHO, T.S. DE. Epidemiology Of Respiratory Virus In The Municipality Of Porto-Velho. **Faculdade São Lucas** v. 2, n. 1, p. 69–80, 2009.

OMS, Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care. 2014.

ONYANGO, C. O. et al. Molecular epidemiology of human rhinovirus infections in Kilifi, coastal Kenya. **Journal of medical virology**, v. 84, n. 5, p. 823–31, 2012.

PALMENBERG, A.C.; RATHE, J.A; LIGGETT, S. B. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 6, p. 1190–9; quiz 1200–1, jun. 2010.

PAULA, N.T. et al. Human rhinovirus in the lower respiratory tract infections of young children and the possible involvement of a secondary respiratory viral agent. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v. 106, n. May, p. 316–321, 2011.

PELTOLA, V. et al. Clinical effects of rhinovirus infections. **Journal of Clinical Virology**. 411–414. 2008.

PITREZ, P.M. et al. Bronquiolite aguda por rinovírus em lactentes jovens. **J Pediatr**. (Rio J) 81:417-20, 2005.

PITREZ, P.M.C; PITREZ, J.L.B. Infecções agudas das vias aéreas superiores – diagnóstico e tratamento ambulatorial. **Jornal de Pediatria**. Vol.79, Supl.1. 2003.

PRETORIUS, M.A. et al. Respiratory Viral Coinfections Identified by a 10-Plex Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay in Patients Hospitalized With Severe Acute Respiratory Illness—South Africa, 2009–2010. **JID**.;206. 2012.

PRIETSCH, S. O. M. et al. Doença aguda das vias aéreas inferiores em menores de cinco anos: influência do ambiente doméstico e do tabagismo materno. **Jornal de Pediatria** - Vol. 78, Nº5, 2002.

PRIETSCH, S. O. M. et al. Acute lower respiratory illness in under-five children in Rio Grande, Rio Grande do Sul State, Brazil: prevalence and risk factors. **Cad Saude Publica**. 24(6):1429-38, 2008.

RATY, R.; KLEEMOLA, M.; STENVIK, H. M.; JULKUN, I. **Efficacy of PCR and other diagnostic methods for the detection of respiratory adenoviral infection.** *J Med. Virol.* 1999;59(1):66-72.

RODRIGUES, J.J.S.; SILVA, R.C.; SIQUEIRA, M.M. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico. In. Doenças infecciosas: Diagnóstico molecular. Cap.2, ed. 1ª, editora **Guanabara Koogan**, 2006.

ROSSMANN, M.G. et al. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. **Nature.** 317:145–153. 1985.

RUUSKANEN, O. et al. Viral pneumonia. **The Lancet.** 377(9773),pp. 1264-1275. 2011.

SANALIOS, R.B. **Análise comparativa das técnicas de imunofluorescência indireta, isolamento em cultura celular e reação em cadeia da polimerase, no diagnóstico de infecções respiratórias por adenovirus e vírus respiratório sincicial** [dissertação (Mestrado em Microbiologia )]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2004.

SAVOLAINEN-KOPRA, C. et al. Novel species of human rhinoviruses in acute otitis media. **Pediatr Infect Dis J.** 2009.

SOUZA, L.S.D.F. et al. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. **Pediatric pulmonology**, v. 35, n. 3, p. 184–91, mar. 2003.

TAPPAREL, C. et al. Rhinovirus Genome Variation during Chronic Upper and Lower Respiratory Tract Infections. **PLoS ONE** 6(6): e21163. doi:10.1371/journal.pone.0021163. 2011.

TREGONING, J.S.; SCHWARZE, J. Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. **Clin. Microbiol. Rev.**23:74-98; doi:10.1128/CMR.00032-09. 2010.


VIEIRA, S.E. et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 43: 125-131, 2001.

WAMAN, V.P. et al. Population Structure and Evolution of Rhinoviruses. **PLoS ONE.** doi:10.1371/ journal.pone.0088981. 2014.

WONG, D. L. Fundamentos de enfermagem pediátrica. [Editoria] Hockenberry, Marilyn J., WILSON, David, WINKELSTEIN, Marilyn. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2006.

## ANEXOS

### Anexo I

  
GOVERNO DE  
**RONDÔNIA**  
O ESTADO DA COOPERAÇÃO  
CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Ofício 39/CEP/CEPEM** **Porto Velho, 22 de Agosto de 2011.**


Sra. Pesquisadora  
**Dra. Deusilene Souza Vieira**  
Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM

Assunto: "Encaminhamento de Parecer"

Encaminhamos em anexo, o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, referente ao protocolo de pesquisa: **"Perfil Epidemiológico e Molecular das infecções agudas respiratórias em população infantil na região metropolitana de Porto Velho-RO"**, Folha de Rosto SISNEP nº 418748, Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 0007.0.046.000-11.

Colocamo-nos à disposição para qualquer esclarecimento.


Atenciosamente,

  
Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

*Recebido  
20/9/2011  
[Signature]*

---

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical –CEPEM  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos- CEP  
Aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP  
Av. Guaporé, 215 - Lagoa Telefone: 3219-6012 / 3216-5442  
Porto Velho – RO







Centro de Pesquisa em Medicina Tropical  
Comitê de Ética em Pesquisa

REF.: Parecer 17/11 CEP/CEPEM  
CAAE: 0007.0.046.000-11


Porto Velho, 31 de Agosto de 2011.

Ilmo. Dra. Deusilene Souza Vieira  
Instituição: CEPEM/IPEPATRO

Sra. Pesquisadora, em sua Sexta reunião realizada no dia **18 de Agosto de 2011**, a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação, analisou o projeto sob sua responsabilidade intitulado: **“Perfil epidemiológico e molecular das infecções agudas respiratórias em população infantil na região metropolitana de Porto Velho-RO”**. Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou **APROVADO**, o citado projeto.

De acordo com o item VII.13.d, da resolução CNS nº 196/96, V.Sª. deve encaminhar a nossa secretaria relatórios parcial e final do referido projeto enquanto durar a pesquisa.

Atenciosamente,

  
Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CEPEM

## Anexo II

DATA do preenchimento deste questionário: ____ / ____ / ____	<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> </table> Código do Paciente											
<b>FICHA DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA</b>												
<b>OBJETIVO:</b> Estudo etiológico e epidemiológico de infecções respiratórias e diarreicas em população infantil no município de Porto Velho - Rondônia.												
<b>DADOS DA CRIANÇA</b>												
Nome completo da criança:		Data de nascimento: [ / / ]	Idade (anos):	Sexo: 1-M; 2-F								
Etnia: [ ] 1-branca, 2-parda, 3-negra, 4-indio, 5-amarela, 6-outros												
Naturalidade da(cidade): UF	Nacionalidade (país):	Telefone residencial:										
Tempo de residência em RO (anos):	Tempo de residência no município (anos):	Última procedência: cidade	UF (meses)									
Endereço da criança (Rua/Av, número, bairro, cidade, UF):												
Onde a criança passa a maior parte do tempo? ( ) Própria Casa ( ) Cheche ( ) Escola												
Na última semana que antecedeu ao IRA onde a criança passou a maior parte do tempo? ( ) Própria Casa ( ) Cheche ( ) Escola ( ) Outra casa com outras crianças ( ) viagem												
Quantas pessoas moram com a criança ( Em números )? ( ) crianças ( ) Adultos												
<b>DADOS DA MÃE OU RESPONSÁVEL</b>												
Nome completo da mãe ou responsável:												
RG da mãe ou responsável: [ ]		SSP [ ]	Telefone celular:									
Instrução (1º, 2º, 3º grau): [ ]		Renda familiar: (R\$)	Ocupação principal:									
<b>DADOS DA MORADIA</b>												
CASA	PAREDES	[ ] alvenaria	[ ] barro	[ ] madeira	[ ] lona							
	CHÃO	[ ] cerâmica	[ ] madeira	[ ] cimento	[ ] terra							
	FORRO	[ ] sim	[ ] não									
	CÓMODOS	Quantidade: _____										
	TELA	[ ] sim	[ ] não									
	BANHEIRO	[ ] fora	[ ] dentro	[ ] mato	[ ] rio / Igarapé							
	FOSSA	[ ] fossa séptica	[ ] fossa negra									
Quantos compartimentos tem a casa?	Quantas pessoas dormem em casa com a criança?	A casa possui ventilação normal?	[ ] Sim [ ] Não									
Qual tipo de aparelho é utilizado para ventilar o dormitório? [ ] Ventilador [ ] Ar condicionado [ ] Não utiliza												
ÁGUA para consumo	[ ] poço	[ ] rio / Igarapé	[ ] mina	[ ] chuva	[ ] mineral / comprada							
	[ ] filtrada	[ ] clorada	[ ] fervida	[ ] s/ tratamento								
Armazenada em:												
ÁGUA para banho	[ ] poço	[ ] rio / Igarapé	[ ] mina	[ ] chuva	[ ] mineral / comprada							
	[ ] filtrada	[ ] clorada	[ ] fervida	[ ] s/ tratamento								
ANIMAIS	[ ] cão	[ ] gato	[ ] galinha	[ ] pato	[ ] porco							
	[ ] carneiro	[ ] macaco	[ ] outro (especificar): _____									
Outras informações pertinentes:												

A criança teve IRA no último mês ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não	A criança ficou internada ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não	A criança foi medicada ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não
Se a criança <b>teve</b> IRA quais foram os principais sintomas ?	Tosse	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Dor de ouvido	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Coriza	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Chiado no Peito	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Peito cheio	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Falta de ar	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Febre	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Respiração difícil	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Obstrução nasal	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Prurido ocular	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
Antecedentes familiares	Asma <input type="checkbox"/>	Rinite <input type="checkbox"/>	Tuberculose <input type="checkbox"/>	Fumo passivo <input type="checkbox"/>	1-sim 2-não
Principais sintomas atuais	Tosse	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Dor de ouvido	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Coriza	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Chiado no Peito	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Peito cheio	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Falta de ar	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Febre	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Respiração difícil	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
	Obstrução nasal	<input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Prurido ocular	<input type="checkbox"/> 1-sim 2-não
A quanto tempo iniciou os sintomas ?					
A criança <b>tomou</b> em casa algum medicamento ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não	Qual _____			
A criança <b>está</b> tomando algum medicamento ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não	Qual _____			
A criança foi amamentada ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não				
A criança mama no peito ?	<input type="checkbox"/> 1-sim <input type="checkbox"/> 2-não				
Se já foi desmamada, Idade do desmame ?	_____ meses ; _____ anos				
O Parto foi normal ou cesariana ?	Normal <input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	Cesariana <input type="checkbox"/>	1-sim 2-não	
Exame antropométrico atuais	Peso _____ Kg	Altura _____ Cm			
Outras informações pertinentes:					
Clima atual ?	<input type="checkbox"/> Chuvoso	<input type="checkbox"/> Ensolarado	<input type="checkbox"/> Nublado	<input type="checkbox"/> Seco	
Este questionário foi respondido pelo(a)	<input type="checkbox"/>	1-participante	2-mãe	3-outro responsável	
Nome e assinatura do entrevistador	Visto da Supervisão				



## Anexo III



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

**VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO (A) COMO VOLUNTÁRIO (A) A PARTICIPAR DA PESQUISA:**

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES AGUDAS RESPIRATÓRIAS EM POPULAÇÃO INFANTIL NA REGIÃO METROPOLITANA DE PORTO VELHO – RO A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS:**

Este projeto visa determinar a prevalência e conhecer o perfil etiológico das infecções agudas respiratórias, sendo o isolamento do patógeno envolvido o fator crucial relacionados às decisões terapêuticas e profiláticas. Este estudo será útil para a estruturação dos diferentes níveis de atendimento de saúde para os períodos de pico destas infecções. Os métodos utilizados neste estudo para identificação desses patógeno, seja viral e/ou bacteriano poderá contribuir para redução do número e do período de hospitalizações, na racionalização do uso de antibióticos e, finalmente, na indicação de uma terapia antiviral para casos específicos. Temos como objetivo determinar através do estudo transversal à prevalência das doenças respiratórias Infantis na região de Porto Velho-RO e caracterizar os agentes etiológicos virais e/ou bacterianas responsáveis por estas infecções. Os procedimentos de coleta de material e dados serão da seguinte forma: Quando o responsável pelo voluntário sadio aceitar a participar da pesquisa, este receberá o TCLE, e as explicações sobre a pesquisa. A seguir será coletado cerca de 50uL de secreção nasofaríngea (SNF) pelo médico responsável pela consulta por *swab*.

**DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:**

Existe um leve desconforto, no momento da coleta da secreção nasal justificado para que se possa realizar o procedimento de isolamento viral.

**GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:**

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.