

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DETECÇÃO DO RINOVÍRUS HUMANO EM PACIENTES COM INFECÇÃO
RESPIRATÓRIA AGUDA EM GUARAPUAVA-PR**

FERNANDO SEIJI MORAIS

GUARAPUAVA

2016

FERNANDO SEJI MORAIS

DETECÇÃO DO RINOVÍRUS HUMANO EM PACIENTES COM INFECÇÃO
RESPIRATÓRIA AGUDA EM GUARAPUAVA-PR

Dissertação apresentada como requisito essencial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração de fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácia, setor de ciências da saúde, Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Carraro

GUARAPUAVA

2016

M827d

Morais, Fernando Seiji

Detecção do rinovírus humano em pacientes com infecção respiratória aguda em Guarapuava-PR / Fernando Seiji Moraes. -- Guarapuava, 2016
xii, 55 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, 2016

Orientador: Emerson Carraro

Banca examinadora: Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe, Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Rinovírus humano. 3. Infecções respiratórias agudas. 4. *Influenza-like illness*. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

DEDICATÓRIA

É com exultação que dedico este trabalho a meus pais, Orlando e Helena, por todas as oportunidades que me proporcionaram e por todo o apoio prestado em cada etapa de minha vida. Às minhas irmãs, Helenice e Suzana, que sempre me incentivaram com benevolência e fraternidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois acredito que esta força maior que rege o universo de forma misteriosa e muitas vezes incompreensível, tem me agraciado desde o meu nascer e a cada novo dia a partir de então.

Ao meu orientador Dr. Emerson Carraro, por todos os ensinamentos e conhecimentos passados desde a época da graduação. Por ser o responsável pela minha iniciação na pesquisa. Por toda a orientação e apoio prestados durante o mestrado com paciência e dedicação. E principalmente pela confiança em mim depositada.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Unicentro, vocês são um grupo muito especial.

A todos os professores que tive durante o mestrado, muitos dos ensinamentos foram muito úteis durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, que foram os pilares da formação do meu caráter, que me ensinaram a perseverar e foram essenciais para que me sentisse motivado, não deixando de prestar apoio em nenhum momento sequer.

Às minhas duas irmãs, Helenice e Suzana, por toda a convivência desde criança, alegrias e histórias compartilhadas, pela amizade fraterna, e pelo incentivo para perseverar frente às dificuldades.

A todos os meus familiares, tios, primos, avós, e também aos familiares distantes. Em especial à minha finada avó Hilda, que há poucos anos nos deixou. Você cuidou de mim com muito zelo e afeto quando criança, espero que esteja em paz no Paraíso.

A todos os meus amigos, que estão comigo em momentos bons e ruins, que prestam apoio, que ensinam também, e que compartilham conhecimentos e histórias.

Aos pacientes, que se voluntariaram a participar desse estudo e deram possibilidade para

execução do trabalho.

A todos os que fizeram qualquer contribuição com este trabalho de forma direta ou indireta.

À Fundação Araucária e CAPES pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

As infecções respiratórias agudas (IRA) são a causa mais comum de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Os vírus respiratórios são responsáveis pela maioria das IRA, e o Rinovírus humano (HRV) é o mais frequentemente identificado. O HRV era conhecido por causar o resfriado comum, infecção limitada ao trato respiratório superior e de sintomatologia branda. Sabe-se, atualmente, que o HRV infecta também o trato respiratório inferior e causa doenças mais graves, até potencialmente fatais, como a pneumonia, exacerbação de doença pulmonar obstrutiva crônica e asma. O HRV infecta em proporções similares indivíduos de todas as idades, com uma leve tendência a infectar mais frequentemente crianças jovens. Esse vírus circula durante todas as estações do ano, com um discreto aumento nos meses mais frios. Até a data não existe um tratamento eficaz contra o HRV, tão pouco vacina, devido à existência de mais de 160 cepas divididas entre as espécies A, B e C, contra as quais os anticorpos apresentam pouca reatividade cruzada. No presente estudo, foi realizada investigação de infecção por HRV em pacientes com IRA atendidos em uma unidade de básica de saúde do município de Guarapuava-PR, entre o mês de abril a dezembro de 2014. Foram coletadas 135 de swab nasal de pacientes de 1 a 82 anos. Informações clínicas, sobre o uso de medicamentos para tratamento para da IRA, e outras foram coletadas. As amostras foram testadas para presença do HRV por RT-PCR, e aproximadamente 20% produziram resultado positivo. O HRV foi detectado em pacientes de todas as idades. A maior taxa de detecção do HRV ocorreu nos meses de maio e agosto, referentes às estações de outono e inverno, respectivamente, no Brasil. A sintomatologia dos pacientes HRV positivos foi variável, houveram casos de resfriado comum, mas observou-se também uma relação entre a infecção pelo HRV e a apresentação de “doença semelhante à gripe causada pelo vírus Influenza” – do inglês, *influenza-like illness* (ILI). O tratamento sintomático para IRA relatado pelos pacientes apresentou bom nível de adequação à literatura atual, porém o uso inadequado de antibióticos foi verificado em alguns casos. Os resultados mostram uma detecção significativa do HRV nos casos de IRA, alguns com sintomatologia mais grave que o esperado quadro de resfriado comum, o que condiz com a literatura atual e também evidencia o impacto que esse vírus causa na população local.

Palavras Chave: Rinovírus humano, Infecções respiratórias agudas, Influenza-like illness

ABSTRACT

Acute respiratory infections (ARI) are the most common cause of morbidity and mortality worldwide. Respiratory viruses are responsible for most of the IRA, among them, the human rhinovirus (HRV) is the most frequently identified. The HRV was known as the "common cold virus", an infection limited to the upper respiratory tract with mild symptoms. It is now known that HRV is responsible for more severe syndromes, infecting also the lower respiratory tract and causing life-threatening diseases such as pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease and asthma exacerbations. The HRV infects individuals of all ages in similar proportions, with a slight tendency to infect young children most often. This virus seems to circulate during all seasons of the year with a slight increase in the colder months. To date there is no effective treatment against HRV, nor vaccine, due to the existence of more than 160 strains divided among species A, B and C, against which the antibodies exhibit little cross-reactivity. In this study, an epidemiological surveillance HRV in patients with ARI was conducted in a primary care health unit of Guarapuava-PR city, from April to December 2014, in order to estimate an epidemiological profile of this virus in the region. 135 nasal swab samples were collected from patients aged 1-82 years. Information on the clinical presentation, use of medicines for treating ARI, and others were collected. Samples were tested by RT-PCR for detection of HRV, and about 20% yielded a positive result. HRV was detected in patients of all ages. The highest detection rates were found in May and August, relative months to autumn and winter, respectively, in Brazil. The symptoms of HRV positive patients were variable, there were common cold cases, but a relation between HRV infection and influenza-like illness (ILI) presentation was also observed. Symptomatic treatment for ARI reported by patients showed a good level of adaptation to the current literature, but inappropriate use of antibiotics was observed in some cases. The results show a significant detection of HRV in cases of ARI, some with more severe symptoms than expected common cold condition, which is consistent with the current literature and highlights the impact that this virus causes on the local population.

Keywords: Human rhinovirus, Acute respiratory infections, Influenza-like illness

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Atendimentos por Síndrome gripal/IRA nas unidades sentinela em SP, 2007 a 2011	2
Figura 2 - Identificação dos vírus respiratórios nas unidades-sentinela de SP, segundo mês, de 2010 a 2011.....	3
Figura 3 - Patógenos virais em casos de IRA de julho de 2012 a junho de 2013, Georgia.....	5
Figura 4 - Positividade dos vírus respiratórios em pacientes pediátricos com IRA entre julho de 2003 e setembro de 2005, SP.....	5
Figura 5 - Filograma circular com a relação entre os genótipos conhecidos de HRV-A, HRV-B e HRV-C	6
Figura 6 - Representação do capsídeo do HRV	7
Figura 7 – Representação do genoma de um picornavírus	8
Figura 8 – Representação do ciclo de replicação do HRV	9
Gráfico 1 - Taxas de detecção do HRV em estudos epidemiológicos realizados em vários Estados brasileiros	15
Quadro 1 - Concentração e Volume dos Reagentes Utilizados na RT	20
Quadro 2 - Concentração e volume dos componentes da PCR	21
Quadro 3 - Composição do gel de agarose corado em brometo de etídeo.....	21
Figura 9 – Amplificação inicial do HRV por RT-PCR.....	25
Figura 10 – Determinação do limite de detecção da reação de RT-PCR.....	26
Quadro 4 - Concentração e volume dos componentes da PCR após a padronização	30
Figura 11 – Amplificação do HRV por RT-PCR após padronização	28
Gráfico 2 - Distribuição mensal da inclusão de pacientes/amostras clínicas	28
Gráfico 3 - Distribuição dos pacientes por faixa etária.....	28
Gráfico 4 - Distribuição da frequência de sintomas por porcentagem do total de pacientes....	30
Tabela 1 - Medicamentos utilizados pelos pacientes para tratamento de IRA.....	31
Tabela 2 - Informações básicas dos pacientes em uso de antibióticos.....	32
Tabela 3 - Detecção do HRV entre os grupos de idade.....	33
Tabela 4 - Apresentação de sintomas pelos pacientes infectados e não infectados pelo HRV..	34
Quadro 5 - Frequência de detecção do HRV e apresentação de ILI em pacientes vacinados contra o Influenza A/B.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

+ssRNA	RNA de fita simples de senso positivo
3' UTR	Região 3' não traduzível
3DPol	Polimerase viral do HRV
5' UTR	Região 5' não traduzível
CDHR3	Caderina relatada como membro da família 3
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
dATP	Di-adenina trifosfato
dCTP	Di-citosina trifosfato
dGTP	Di-guanina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dinucleotídeos trifosfato
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
dTTP	Di-timina trifosfato
FDA	<i>Food and drugs administration</i>
HAdV	Adenovírus humano
HBoV	Bocavírus humano
HCov	Coronavírus humano
HeLa	Henrietta Lacks
HEV	Enterovírus humano
HMpV	Metapneumovírus humano
HPIV	Vírus Parainfluenza humano
HRV	Rinovírus humano
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL8	Interleucina 8
ILI	<i>Influenza like illness</i>
INF1	Interferon tipo 1
IRA	Infecções respiratórias agudas
IRV	Infecções respiratória viral
ITRI	Infecção do trato respiratório inferior
ITRS	Infecção do trato respiratório superior
KCl	Cloreto de potássio
LD	Limite de detecção
Md	Mediana
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MRC-5	<i>Medical Research Council -5</i>
mRNA	RNA mensageiro
NASBA	amplificação de ácido nucleico baseada em sequenciamento
ORF	<i>Open Reading Frame</i> – Quadro aberto à leitura
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa em tempo real
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de restrição

RNA	Ácido ribonucleico
RSV	Vírus sincicial respiratório
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/borato/EDTA
TCD4+	Células T auxiliares
TCD8+	Células T citotóxicas
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR2	Receptor semelhante a toll 2
TRI	Trato respiratório inferior
TRS	Trato respiratório superior
UBS	Unidade Básica de Saúde
UV	Ultra violeta
VLDLr	Receptor de VLDL
VP1	Proteína de capsídeo VP1
VP2	Proteína de capsídeo VP2
VP3	Proteína de capsídeo VP3
VP4	Proteína de capsídeo VP4
VPg	Peptídeo iniciador da replicação do HRV
VRs	Vírus respiratórios
WHO	World Health Organization
WI-38	<i>Wistar Institute 38</i>

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1.Infecções Respiratórias Agudas.....	1
1.2.Infecções Respiratórias Agudas Virais.....	2
1.3.O Rinovírus Humano.....	4
1.4.Virologia Básica do Rinovírus Humano.....	6
1.5.Modos de Transmissão do Rinovírus Humano.....	9
1.6.Patogênese da Infecção pelo Rinovírus Humano.....	10
1.7.Diagnóstico Laboratorial.....	12
1.8.Terapia e Prevenção da Infecção pelo HRV.....	14
1.9.Epidemiologia e Sazonalidade.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1.Objetivo geral.....	17
2.2.Objetivos específicos.....	17
3. METODOLOGIA.....	18
3.1.Inclusão de pacientes.....	18
3.2.Coleta e processamento das amostras clínicas.....	18
3.3.Amostras controle.....	18
3.4.Extração do material genético.....	19
3.5.Transcrição reversa – síntese de cDNA (RT).....	19
3.6.Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	20
3.7.Determinação do tamanho do amplicon gerado na PCR.....	21
3.8.Padronização da etapa de PCR.....	22
3.9. Determinação do limite de detecção (LD).....	22
3.9.1. Determinação da temperatura de hibridização dos primers.....	22
3.9.2. Determinação da concentração de primers.....	23
3.9.3. Determinação da concentração de dNTPs.....	23
3.9.4 Determinação da concentração de MgCl ₂	23
3.9.5 Determinação da concentração de <i>Taq</i> DNA Polimerase.....	23
3.9.6. Determinação da quantidade de cDNA.....	23
3.9.7. Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1.Reação inicial de RT-PCR com as cepas controle HRV-1 e HRV-39.....	25

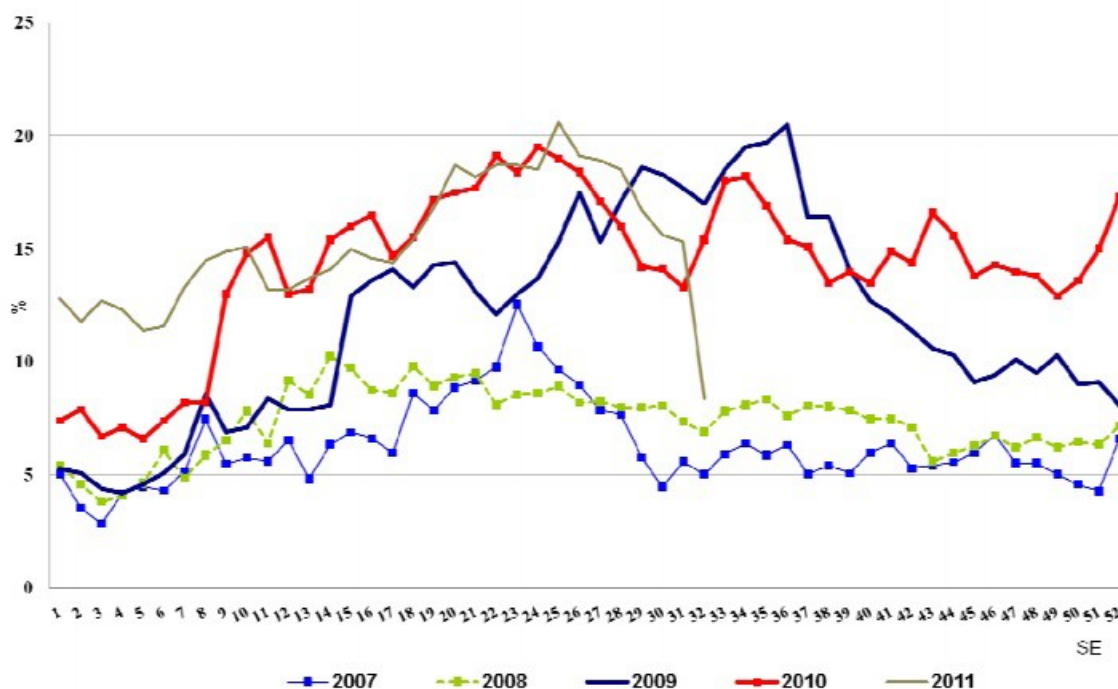
4.2. Limite de detecção (LD)	25
4.3. Determinação da temperatura de hibridização dos primers.....	26
4.4. Determinação da concentração de primers.....	26
4.5. Determinação da concentração de dNTPs.....	26
4.6. Determinação da concentração de MgCl ₂	26
4.7. Determinação da concentração de <i>Taq</i> DNA Polimerase.....	27
4.8. Determinação da quantidade de cDNA.....	27
4.9. Reação de PCR para a detecção do HRV padronizada.....	27
4.9.1. Dados dos pacientes inclusos no estudo.....	28
4.9.2. Pacientes infectados pelo HRV.....	33
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	
ANEXO B – QUESTIONÁRIO/FICHA DE DADOS PESSOAIS	

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Infecções Respiratórias Agudas

Infecções respiratórias denominam um amplo espectro de condições que podem afetar o trato respiratório, limitadas ao trato respiratório superior (TRS) ou atingindo também o inferior (TRI). No TRS, essas infecções causam doenças como o resfriado comum, rinite, sinusite, faringite, laringite e tonsilite, e, quando atingem o TRI, podem levar a complicações mais graves, como pneumonia, bronquite, bronquiolite e abscesso pulmonar (SOLLET, 2006). As infecções respiratórias agudas (IRA) são o tipo de infecção mais comum no mundo todo, acometem indivíduos de todas as idades e são a principal causa de morbidade e mortalidade (GILLIM-ROSS e SUBBARAO, 2006). A gravidade dos sintomas que uma IRA pode acarretar é variável e depende do agente infectante e das condições de saúde do hospedeiro (DUNN e MILLER, 2014).

O impacto que as IRA causam na saúde das populações reflete também na economia, pois são a principal causa de absenteísmo no trabalho, e também nas escolas, causando prejuízo à educação das crianças. Dessa forma, a alta ocorrência de IRAs gera um déficit na produção da população ativa, visto que esta população é comumente exposta a essas infecções (BERTINO, 2002; ROELEN, KOOPMANS, *et al.*, 2011). Estima-se que o gasto gerado pelas IRAs chega a dezenas de bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos, principalmente devido ao déficit na produtividade do país (FENDRICK, MONTO, *et al.*, 2003; PALMER, ROUSCULP, *et al.*, 2010), e, nos países emergentes, esse valor pode chegar a ser mais alto (SCOTT II, 2009). E ainda, o agravamento de uma IRA não é raro, além das complicações respiratórias, podem levar a complicações secundárias e eventualmente fatais como cardiopatias agudas (HARSKAMP e VAN GINKEL, 2008). Estima-se que cerca de 2 milhões de mortes sejam decorrentes de IRA por ano, com o maior número de vítimas sendo menores de 5 anos em países em desenvolvimento (WHO, 2002). A figura 1 mostra o percentual de atendimentos por síndrome gripal/IRA pelo total de atendimentos dos pacientes nas unidades sentinela de São Paulo de 2007 a 2011.



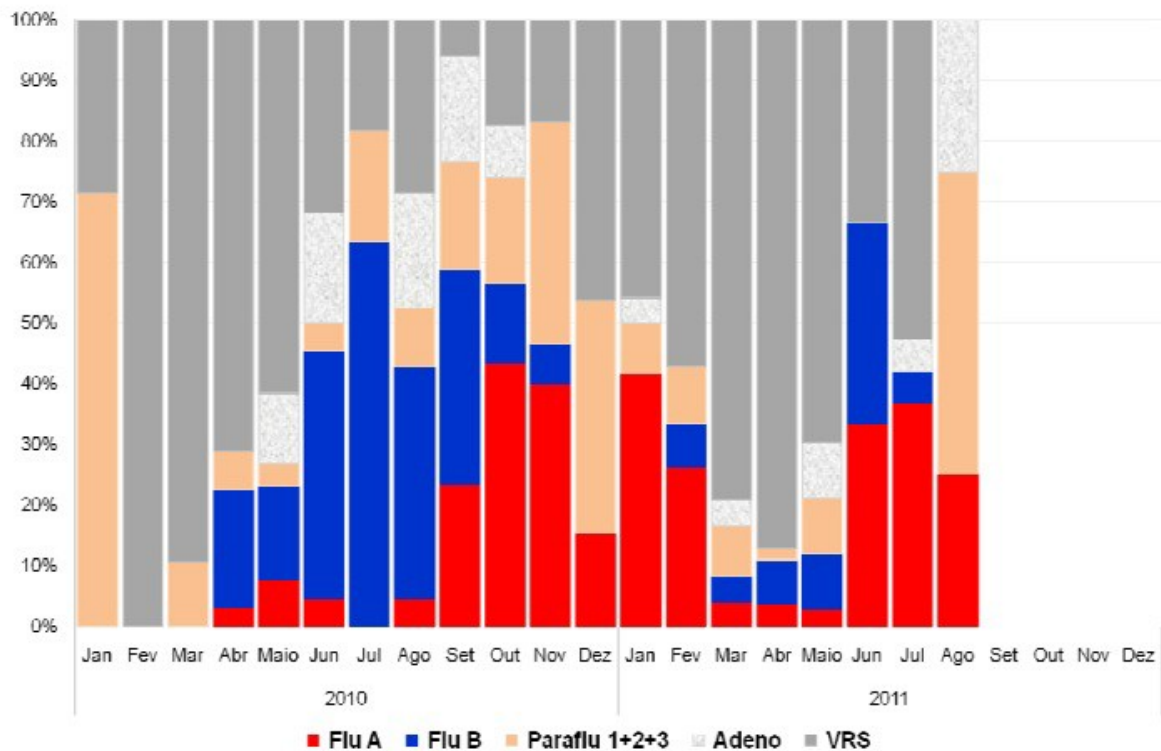
Fonte: Sivep 2011

Figura 1 - Distribuição da porcentagem de atendimentos por síndrome gripal/IRA pelo total de atendimentos de clínica médica nas unidades sentinelas do Estado de São Paulo, 2007 a 2011. SE: semana epidemiológica. SE = semana epidemiológica. (CVE/SVS, 2011)

1.2. Infecções Respiratórias Agudas Virais

Os agentes causadores das IRA podem ser vírus, bactérias, e, com menor frequência, fungos, muito embora os vírus respiratórios (VRs) sejam de longe os causadores da maioria das IRAs (BEZERRA, BRITO, *et al.*, 2011). Entre os muitos vírus que sabidamente infectam o TR dos seres humanos, destacam-se o vírus Influenza A/B, vírus sincicial respiratório (RSV), adenovírus humano (HAdV), parainfluenza vírus humano (HPIV), rinovírus humano (HRV), corona vírus humano (HCoV), bocavírus humano (HBoV) e metapneumovírus humano (HMpV). O HRV tem se evidenciado como o agente mais frequentemente isolado nos casos de IRA em várias partes do mundo (NICHOLSON, KENT, *et al.*, 1997).

Os VRs geralmente possuem um comportamento sazonal, em sua maioria circulam e infectam indivíduos com mais frequência nos meses mais frios do ano (ECCLES, 2002; MONTO, 2002). A figura 2 mostra a distribuição do percentual de identificação dos VRs por mês nas unidades-sentinela do Estado de São Paulo (CVE/SVS, 2011).



Fonte: Sivep 2011

Figura 2 - Distribuição do percentual de identificação dos vírus respiratórios nas unidades-sentinelas do estado de São Paulo, segundo mês, de 2010 a 2011. Flu A = Influenza A; Flu B = Influenza B; Parafllu 1+2+3 = Parainfluenza vírus 1, 2 e 3; Adeno = adenovírus; VRS = vírus respiratório sincicial (CVE/SVS, 2011).

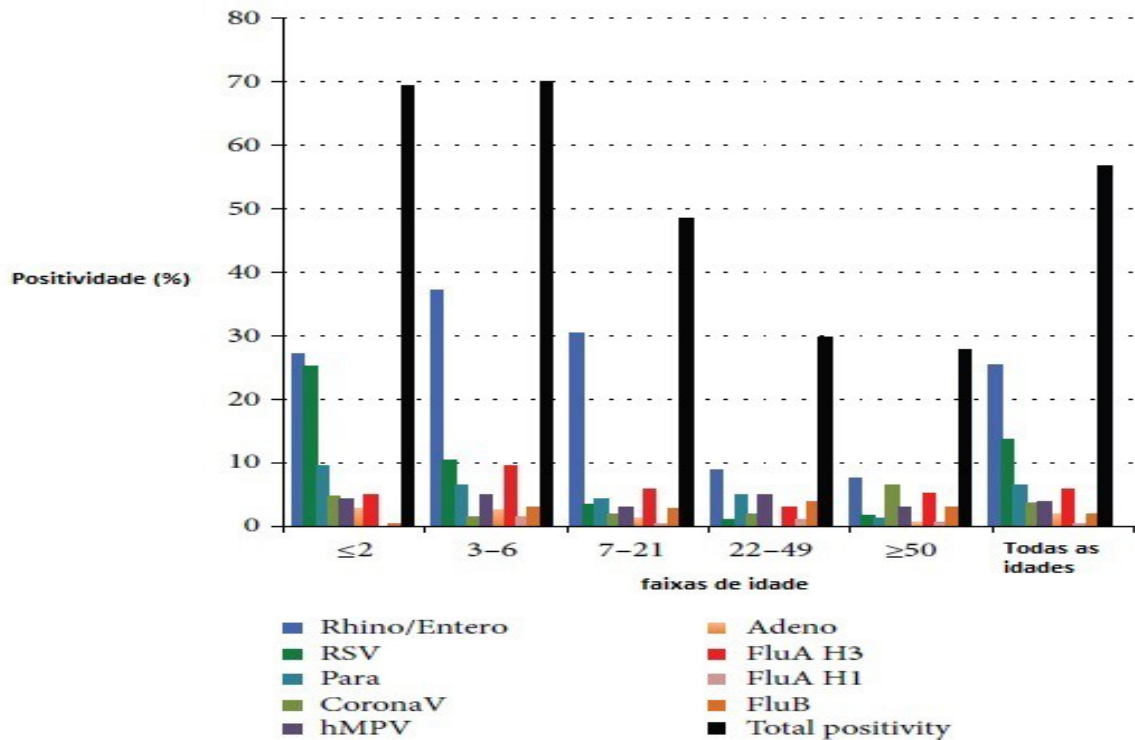
A transmissão de uma IRA pode se dar por várias maneiras, alguns vírus possuem capacidade infectante ao se propagarem pelo ar e outros são mais restritos ao contato físico com indivíduos ou superfícies contaminadas (LA ROSA, FRATINI, *et al.*, 2013). Independentemente do modo de transmissão, as temporadas de baixa temperatura costumam favorecer o aumento da incidência de IRAs, isso se deve em parte ao fato de que as pessoas passam mais tempo em ambientes fechados e em contato com outras pessoas. Ambientes com lotação de indivíduos são potenciais focos de transmissão de um agente causador de IRA, como hospitais, postos de saúde, transporte coletivo, ambientes de trabalho coletivo, escolas e creches (MONTTO, 2002; SELWYN, 1990)

O advento das ferramentas da biologia molecular e sua aplicação para a identificação viral mostraram uma identificação dos VRs ainda mais frequente do que se era preconizado nos casos de IRA, o que leva a contestar a antibioticoterapia nesses casos (GONZALES, MALONE, *et al.*, 2001). Existem poucas opções sabidamente eficazes para combater os VRs, tendo como melhor alternativa a prevenção por vacinação na época

correta do ano, disponível apenas contra poucos VRs (com eficiência notável, apenas contra o Influenza A/B, e, em menor proporção, contra o RSV) (PAPI e CONTOLI, 2011). Embora o arsenal de medicamentos para combater os VRs seja ainda limitado, o esclarecimento da etiologia de uma IRA leva a correta tomada de decisão terapêutica, o que pode evitar o uso indiscriminado de antibióticos e o possível surgimento de cepas de bactérias resistentes (ROQUE, HERDEIRO, *et al.*, 2014; FREDERICKS, HOLLINGWORTH, *et al.*, 2015).

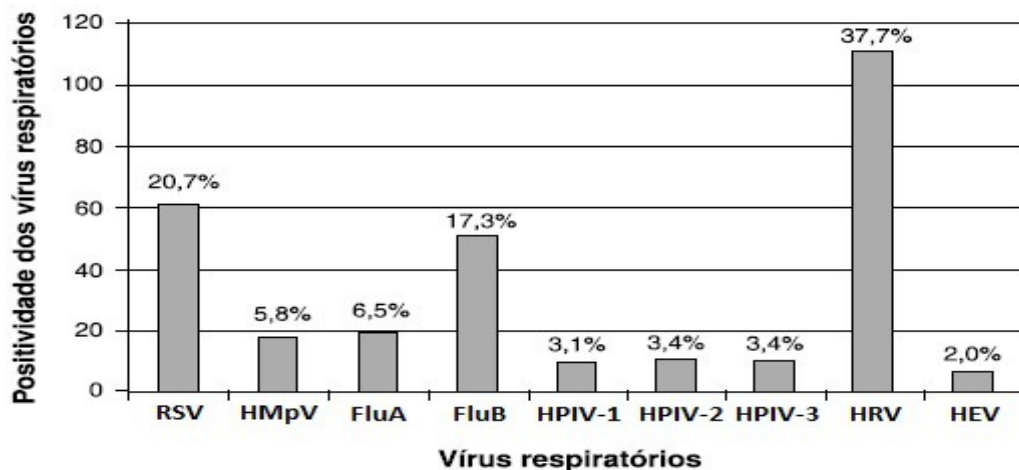
1.3. O Rinovírus Humano

O HRV foi primeiramente isolado em 1956 pelo Dr. Winston Price, na Universidade Johns Hopkins, e foi rapidamente determinado como a causa mais comum de resfriados (PRICE, 1956). A partir de então, o HRV foi por muito tempo conhecido como o vírus do "resfriado comum". Atualmente, sabe-se que o HRV não causa somente o resfriado comum, doença caracterizada por uma sintomatologia branda em decorrência de uma infecção do trato respiratório superior (ITRS), mas também pode causar infecções do trato respiratório inferior (ITRI) e causar graves complicações (MÄKELÄ, PUHAKKA, *et al.*, 1998). Várias outras síndromes respiratórias podem ser causadas pelo HRV, como bronquiolite, pneumonias, exacerbação de asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (MÄKELÄ, PUHAKKA, *et al.*, 1998; MARTIN, SIDDIQUI e HASSAN, 2006; PELTOLA, WARIS, *et al.*, 2008; NASCIMENTO, SOUZA, *et al.*, 2010). Entre casos de IRA de pacientes de todas as idades, o HRV tem sido detectado em aproximadamente um quarto dos casos (NICHOLSON, KENT, *et al.*, 1997; MÄKELÄ, PUHAKKA, *et al.*, 1998; ARDEN, MCERLEAN, *et al.*, 2006), há estudos que chegam a relatá-lo como causador de aproximadamente metade dos casos de IRA (ARRUDA, PITKÄRANTA, *et al.*, 1997; MOREIRA, KAMIKAWA, *et al.*, 2011), chegando a representar quase 80% das infecções respiratórias virais (MONTA, 2002). As figuras 3 e 4 foram retiradas de estudos que fizeram a detecção do HRV em casos de IRA.



Fonte: STOVER e LITWIN, 2014

Figura 3 - Positividade para cada patógeno viral em casos de IRA de Julho de 2012 a Junho de 2013, Geórgia. Rhino/Entero = rinovírus humano/enterovírus humano; RSV = vírus sincicial respiratório; Para = vírus parainfluenza humano; CoronaV = coronavírus humano; hMPV = metapneumovírus humano; Adeno = adenovírus humano; FluA H3 = influenza A H3N2; FluA H1 = influenza A H1N1; FluB = influenza B; *Total positivity* = positividade total (STOVER e LITWIN, 2014)

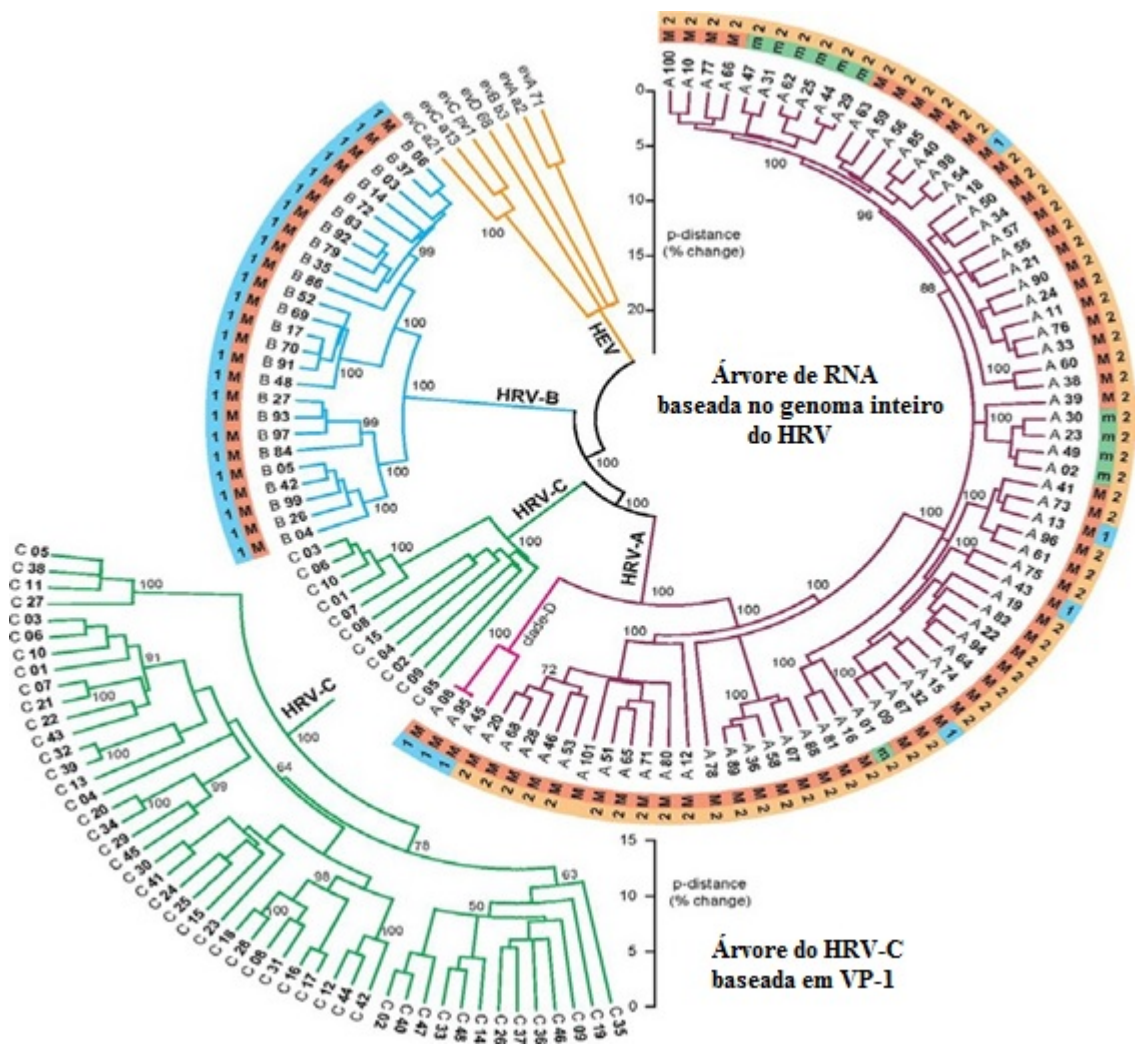


Fonte: BONFIM, NOGUEIRA, *et al.*, 2011.

Figura 4 - Positividade dos vírus respiratórios em pacientes pediátricos com IRA, Estado de São Paulo, Brasil. HEV = enterovírus humano; FluA e FluB = influenza tipo A e B; HMPV = metapneumovírus humano; HRV = rinovírus humano; HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3 = vírus da parainfluenza tipo 1, 2 e 3; RSV = vírus sincicial respiratório (BONFIM, NOGUEIRA, *et al.*, 2011).

1.4. Virologia Básica do Rinovírus Humano

A taxonomia atual classifica o HRV como pertencente à família Picornaviridae, gênero *Enterovirus* (anteriormente, Rinovírus era classificado como sendo um gênero da família Picornaviridae, atualmente, é uma espécie), e possui três espécies: HRV-A, HRV-B e, a mais recentemente descoberta, HRV-C (LAMSON, RENWICK, *et al.*, 2006; PALMENBERG, RATHE e LIGGETT, 2010). Dentro das três espécies, existem mais de 160 sorotipos/genotipos, sendo 74 sorotipos pertencentes à espécie A, 25 à espécie B, e os demais, classificados por análise molecular, e, portanto, chamados de genotipos e não sorotipos, pertencem à espécie C (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013; MCLEAN, 2014). A figura 5 mostra a árvore filogenética com as espécies A, B e C do HRV.

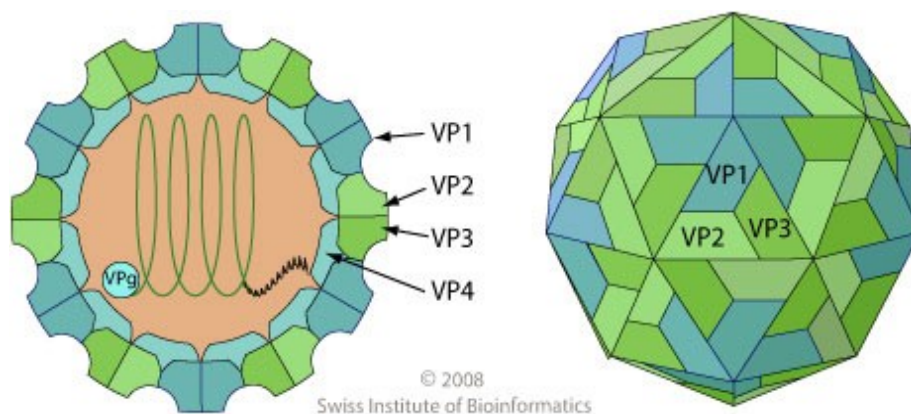


Fonte: (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013) (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013)

Figura 5 - Árvore filogenética. Mostra um filograma circular com a relação entre os genótipos conhecidos de HRV-A (74), HRV-B (25) e HRV-C (59). A árvore foi construída a partir do sequenciamento do genoma completo do RNA e enraizada com dados existentes do HEV (grupo externo). Como haviam poucas

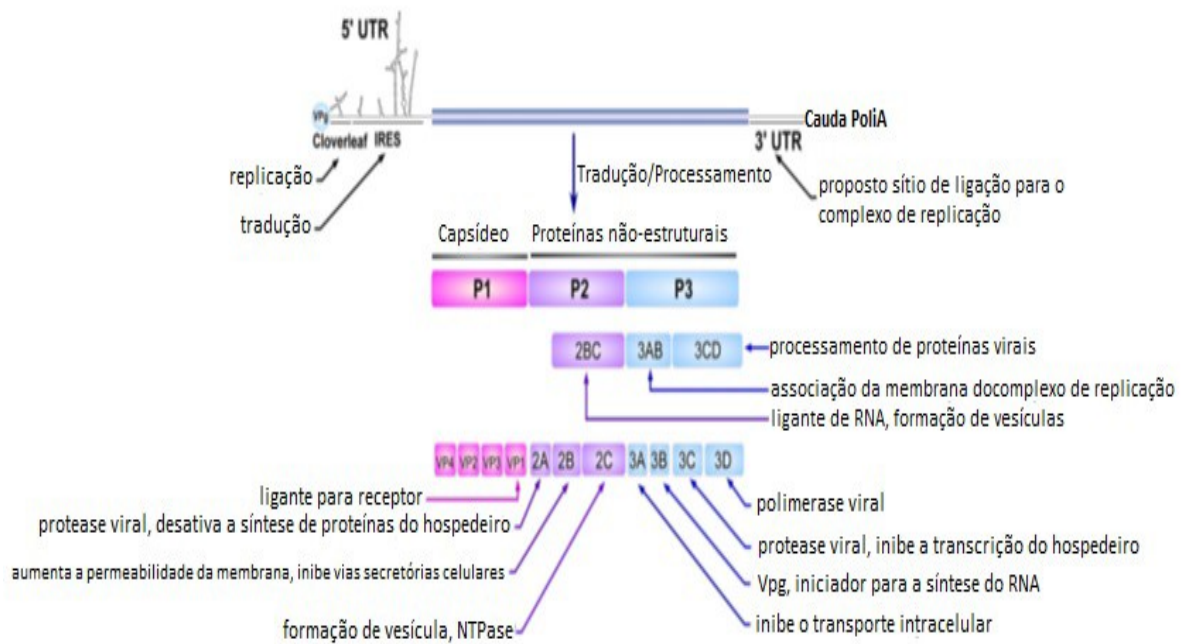
cepas do HRV-C sequenciadas por completo, a determinação da relação desses genótipos foi feita com dados de parte da região de VP1 do RNA. Os números no anel exterior da imagem indicam a suscetibilidade dos genótipos à drogas que atuam no capsídeo viral (1: mais suscetível; 2: menos suscetível). No anel interior, as letras indicam o receptor celular das espécies, sendo M do grupo maior (receptor de ICAM-1), e m, pertencentes ao grupo menor (receptor de VLDL) (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013). Até a data de publicação da figura, o receptor de HRV-C ainda não havia sido identificado, sendo posteriormente proposto como sendo uma caderina relatada como membro da família 3 (BOCHKOV, WATTERS, *et al.*, 2015).

O HRV compartilha algumas características dos picornavírus, é um vírus pequeno (cerca de 30nm), RNA (ácido ribonucleico) fita simples de senso positivo (+ssRNA) de cerca de 7200 bases e não é envelopado. O genoma é constituído de um único gene, cujo polipeptídeo traduzido a partir do quadro aberto à leitura (ORF – *open reading frame*) do mesmo, que é clivado por proteases virais e gera 11 proteínas. O início se dá pelo peptídeo VPg, imediatamente após a região 5' não traduzível (5' UTR) localizada em uma das extremidades do genoma viral, em seguida, a região P1 que codifica as proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4 que compõem o capsídeo de estrutura icosaédrica. As proteínas VP1, VP2 e VP3 estão localizadas na superfície externa do capsídeo, e a VP4 no lado interno. A figura 6 abaixo mostra a ilustração do capsídeo. As regiões P2 e P3 codificam proteínas não-estruturais, envolvendo, entre outras, as proteases 2A e 3C e a polimerase viral RNA dependente (3DPol). Na outra extremidade do ORF está a região 3' não traduzível (3' UTR) seguida da cauda poli-A (COUCH, 2006; TURNER e LEE, 2009). A figura 7 traz uma ilustração da organização do genoma do HRV.



Fonte: Jenn Brophy. Rhinovirus. Disponível em <<http://biowiki.org/view/Fall09/JennBrophyRhinovirus>> Acessado em 28/10/2015

Figura 6 - representação do capsídeo de forma icosaédrica do HRV que envolve o genoma viral. A estrutura do capsídeo é formada por 60 cópias das proteínas VP1-VP4. A proteína VP4 fica voltada para o lado interno do capsídeo, e as demais estão localizadas na superfície externa. VP1 = proteína de capsídeo viral 1; VP2 = proteína de capsídeo viral 2; VP3 = proteína de capsídeo viral 3; VP4 = proteína de capsídeo viral



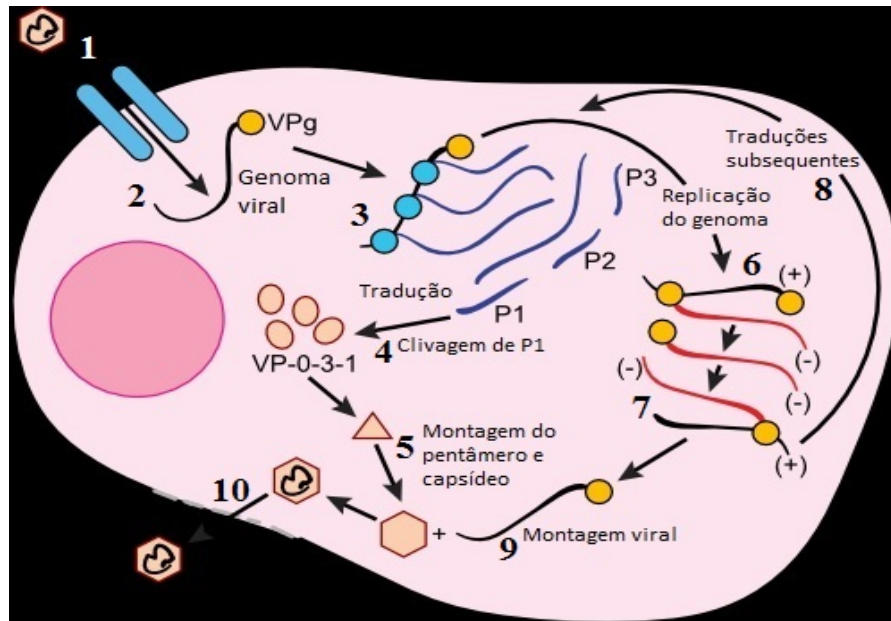
Fonte: Adaptado de (LIN, CHEN, *et al.*, 2009)

Figura 7 - Genoma de um picornavírus. Os 11 polipeptídeos maduros são mostrados, juntamente, as três clivagens intermediárias principais. As funções biológicas principais estão indicadas para cada polipeptídeo. IRES = *internal ribosome entry site* (sítio interno de entrada para ribossomo) (LIN, CHEN, *et al.*, 2009)

A proteína VP1 apresenta um cânion onde se encontra o vírion que interage com o sítio de ligação aos receptores da célula hospedeira. As espécies HRV-A e HRV-B são divididas quanto ao receptor celular em grupo maior e menor. O grupo maior se liga à molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), e engloba a grande maioria dos HRV-A e todos os HRV-B, e o restante dos HRV-A pertencem ao grupo menor, que se liga ao receptor de VLDL (VLDLr) (LIN, CHEN, *et al.*, 2009; PALMENBERG, RATHE e LIGGETT, 2010). O receptor celular da espécie HRV-C foi recentemente proposto como sendo uma caderina relatada como membro da família 3 (CDHR3), das imunoglobulinas (BOCHKOV, WATTERS, *et al.*, 2015).

Após a ligação com o receptor, o HRV entra na célula hospedeira, e como seu genoma é +ssRNA, é imediatamente traduzido em proteínas no citoplasma da célula. Com as proteínas virais já traduzidas, ocorre a síntese da fita complementar de RNA é sintetizada pela 3DPol a partir da VPg, e servirá de molde para a replicação do genoma viral, que por sua vez servirá como RNA mensageiro (mRNA) para a síntese de novas proteínas, e também dará origem à novas partículas virais, dando continuidade ao ciclo de

replicação do vírus (LIN, CHEN, *et al.*, 2009). Um resumo do ciclo replicativo é demonstrado na figura 8.



Fonte: Adaptado de “The Microbial World”, Disponível em <http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=477> Acessado em 21/09/2015

Figura 8 - Ligação do HRV ao receptor na superfície celular (1) e entrada diretamente no citoplasma (2). Uma vez no interior, o RNA viral (senso positivo) é traduzido em uma poliproteína (3) que é eventualmente processada (4). As proteínas do capsídeo, localizadas na extremidade N-terminal da poliproteína, se reúnem para formar monômeros de capsídeo, que consistem em VP1, VP2, VP3, e VP4 (5). A partir de VPg, a polimerase viral sintetiza primeiro a fita de sentido negativo (-) (6), em seguida, as cópias da fita de sentido positivo (+) do RNA (7). Estas serão subsequentemente traduzidas em proteínas (8) e eventualmente irão se juntar com proteínas do capsídeo para criar uma partícula intacta (9) que sairá por lise celular (10).

1.5. Modo de Transmissão do Rinovírus Humano

A principal rota de transmissão do HRV é pela contaminação das mãos com secreções de indivíduo infectado, principalmente provindas do nariz, e posterior contaminação das mucosas dos olhos e nariz (auto-inoculação). O contato com superfícies ou objetos (maçanetas, interruptores, corrimões, mesas, bancos, etc) onde tenham sido depositadas secreções contendo o vírus vivo e o aperto de mãos são os meios mais comuns em que a transmissão ocorre (WINTHER, MCCUE, *et al.*, 2007). O HRV pode sobreviver, sendo ainda infectante, por horas ou até dias à temperatura ambiente, ou por até duas horas em pele intacta (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013; MONTO, 2002). Há estudos que sustentam a hipótese de que a transmissão por partículas virais carregadas pelo

ar também pode ocorrer, principalmente em ambientes fechados com ventilação artificial e com baixa corrente de ar do vindo do ambiente externo (DICK, JENNINGS, *et al.*, 1987; MYATT, JOHNSTON, *et al.*, 2004). Embora essa rota seja menos comum, e possivelmente menos eficaz que a transmissão pela contaminação das mãos com secreções nasais de indivíduo infectado pelo HRV (HENDLEY e GWALTNEY, 1988; TURNER e HENDLEY, 2005).

1.6. Patogênese da Infecção pelo Rinovírus Humano

Em indivíduos imunocompetentes e não portadores de doenças que afetam o trato respiratório, a infecção pelo HRV geralmente, mas não exclusivamente, é limitada ao TRS. Obstrução nasal e coriza (em caso de infecção pelo HRV, também chamada de rinorreia) são os sintomas mais frequentes, e estão associados à resposta inflamatória neutrofílica, que aumenta a permeabilidade vascular e estimula hipersecreção de muco. A tosse é menos comum, mas também pode ser decorrente de uma ITRS pelo HRV (KENNEDY, TURNER, *et al.*, 2012). A inflamação da mucosa das cavidades sinusais (sinusite) pode ser consequência de uma ITRS por HRV (GWALTNEY, PHILLIPS, *et al.*, 1994). O HRV também já foi isolado em casos de otite média, uma inflamação do ouvido médio (BLOMQVIST, ROIVAINEN, *et al.*, 2002; PITKÄRANTA, JERO, *et al.*, 1998). Normalmente, a duração dos sintomas da infecção pode durar de 7 a 14 dias (PAPPAS, HENDLEY, *et al.*, 2008).

O mecanismo da ITRS se dá em parte pelo efeito citopático que o HRV causa no epitélio que, quando comparado a outros VRs como o Influenza A/B e RSV, é bem menos frequente e agressivo (WINTHER, GWALTNEY, *et al.*, 1998). Além do efeito direto sobre o epitélio celular, as respostas imunes inata e adaptativa também exercem função na patogênese da infecção pelo HRV (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013). Em um experimento com o HRV-6 *in vitro*, Triantafilou e colaboradores relataram que o capsídeo viral é reconhecido pelo receptor semelhante a toll 2 (TLR2), e após internalização do RNA fita simples, este é reconhecido por outros receptores semelhantes a toll localizados nos endossomos. Uma vez formado o RNA de fita dupla, uma resposta do interferon tipo 1 (IFN-1) mediada por outros intermediários é desencadeada e inicia uma cascata de liberação de citocinas pró-inflamatórias, em especial, a interleucina 8 (IL-8), que tem ação quimiotática de neutrófilos (TRANTAFILOU, VAKAKIS, *et al.*, 2011). O aumento no nível de quininas em lavado de fluído nasal em indivíduos infectados pelo HRV, que está relacionado com o aumento da permeabilidade vascular, facilitando o influxo de

neutrófilos, também foi relatado em estudos (NACLERIO, PROUD, *et al.*, 1988). Os níveis de histamina permanecem normais durante a infecção pelo HRV, sugerindo que mastócitos e basófilos não contribuem para a patogênese dessa infecção (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013).

Indivíduos com anticorpos *nãives*, ao se infectarem com HRV, desenvolvem anticorpos neutralizadores séricos soro-específicos (IgG), bem como anticorpos secretórios (IgA), sugerindo que a resposta imune humoral tem importante papel na prevenção da infecção pelo HRV (BARCLAY, AL-NAKIB, *et al.*, 1989). A persistência desses anticorpos específicos para cada sorotipo viral conferem imunidade ao hospedeiro quando este entra em contato com o mesmo sorotipo do vírus, ou ainda, a redução da gravidade dos sintomas da infecção (ALPER, DOYLE, *et al.*, 1998). No entanto, essa proteção se torna difícil devido a existência dos muitos sorotipos/cepas do HRV, visto que há pouca neutralização cruzada entre os mesmos (PAPI e CONTOLI, 2011). As células T citotóxicas (CD8+) e auxiliares (CD4+) também desempenham importante papel na defesa do hospedeiro. A quimiocina IP-10 é secretada por monócitos, linfócitos e neutrófilos, que estão aumentados na infecção por HRV. Essa quimiocina exerce quimiotaxia de células T, que ajuda na imunidade reconhecendo o agente viral e desencadeando as respostas de TCD4+ e TCD8+ (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013). Os clones de células T humanos são ativados por alguns epítomos virais compartilhados, de modo que a reatividade cruzada pode induzir uma resposta de células T mais potente com subsequente liberação de citocinas frente a uma reinfecção com cepas diferentes do HRV (KELLY e BUSSE, 2008).

Apesar dos experimentos indicarem que o HRV se replica de maneira ótima a 33°C (temperatura média das vias aéreas superiores), as suspeitas do envolvimento do HRV com quadros de asma levaram a mais investigações (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013). Papadopoulos e sua equipe realizaram um experimento de cultura de células com oito cepas do HRV, não foram observadas diferenças muito significativas na replicação das cepas de 33°C para 37°C (temperatura média das vias aéreas inferiores) (PAPADOPOULOS, SANDERSON, *et al.*, 1999). Contudo, a ITRI pelo HRV é mais comum em pacientes com asma subjacente ou outras doenças pulmonares, embora existam indícios da iniciação de asma causada pelo HRV (GERN, 2009) e sua ligação com a bronquiolite aguda (TEERATAKULPISARN, PIENTONG, *et al.*, 2014), bem como com DPOC e pneumonia (MARTIN, SIDDIQUI e HASSAN, 2006; PELTOLA, WARIS, *et al.*, 2008). Os sintomas de uma ITRI pelo HRV podem incluir tosse, respiração ofegante,

sensação de aperto no peito, e chiado (PAPADOPOULOS, BATES, *et al.*, 2000). O mecanismo da patogênese da ITRI pelo HRV é um pouco controverso, uma vez que já foi isolado em coinfeção com agentes bacterianos, dificultando o esclarecimento de qual o verdadeiro agente responsável pela manifestação dos sintomas (JENNINGS, ANDERSON, *et al.*, 2008). Independentemente do HRV ser ou não o responsável pela aparição dos sintomas de ITRI, ele parece ter um importante papel aumentando a predisposição do hospedeiro a uma infecção bacteriana secundária (ISHIZUKA, YAMAYA, *et al.*, 2003; OLIVER, LIM, *et al.*, 2008).

A aplicação de técnicas moleculares altamente sensíveis para a detecção do HRV mostrou que a infecção pelo HRV também pode ser assintomática. Pela técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), o HRV pode ser detectado em cerca de 10 a 20% dos indivíduos assintomáticos, porém, podem ser resultados falso positivos, ou ainda, alguma cepa do HRV menos virulenta, que provoca uma manifestação tão branda dos sintomas da infecção que muitas vezes é resolvida sem que o hospedeiro se sinta incomodado (BELLA e ROSSMANN, 2000). A gravidade da manifestação dos sintomas não parece ter relação direta com a carga viral no hospedeiro, nem mesmo com o efeito citopático causado pelo HRV, mas sim com a natureza da resposta imune contra o vírus (KENNEDY, TURNER, *et al.*, 2012).

1.7. Diagnóstico Laboratorial

A coleta de amostras deve ser realizada o mais rápido possível após o início dos sintomas de infecção, uma vez que os títulos de carga viral são maiores no trato respiratório nos primeiros 2 dias de infecção, embora o HRV possa ser detectado em amostras coletadas mais tardiamente (LANDRY, 2011). Para ITRS, as amostras podem ser aspirados ou swabs provenientes da nasofaringe, orofaringe, ou cavidades nasais. Para ITRI, as amostras podem ser aspirados traqueais ou bronquiais, fluido broncoalveolar ou, o que é menos frequente, biópsia de tecido pulmonar (ARRUDA, CRUMP, *et al.*, 1996). As amostras devem ser transportadas refrigeradas, em salina estéril ou meio de transporte viral adequado, e estocadas a -70°C quando por tempo maior do que poucos dias (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013).

O HRV era tradicionalmente identificado pelo crescimento em cultura de células, mais comumente linhagens como MRC-5, WI-38, ou HeLa, com incubação de 33 a 35°C em câmara de CO_2 umidificada por cerca de 14 dias, e posterior caracterização pelo seu efeito citopático. A diferenciação entre HRV e HEV era feita por labilidade ácida, sendo o

HRV ácido-lábil e o HEV ácido-resistente (AMINEVA, AMINEY, *et al.*, 2011; WRIGHT, DEATLY, *et al.*, 2007). Porém, o método de cultura é bastante trabalhoso, leva muito tempo para dar resultados, o que inviabiliza a técnica para fins de manejo clínico, além de ser pouco sensível quando comparada aos métodos moleculares de detecção viral (STEININGER, ABERLE e POPOW-KRAUPP, 2001). Além disso, a espécie HRV-C até pouco tempo não era cultivável em linhagens celulares, apenas recentemente foi cultivada com sucesso em cultura de órgão em mucosa sinusal (BOCHKOV, PALMENBERG, *et al.*, 2011). O fato da espécie HRV-C não se multiplicar nas linhagens celulares tradicionais para o HRV foi o que levou à identificação tardia da espécie, descrita somente em 2006, caracterizada por métodos moleculares (LAMSON, RENWICK, *et al.*, 2006).

O diagnóstico sorológico não é viável devido à existência dos muitos sorotipos do HRV com poucos antígenos em comum, dificultando essa prática em rotina laboratorial (BLOMQVIST, SAVOLAINEN, *et al.*, 2002). No fim da década de 1980, ensaios moleculares de RT-PCR para detecção do HRV em amostras respiratórias foram descritos, mostrando aumento significativo nas taxas de detecção viral (GAMA, HORSNELL, *et al.*, 1989). Muito embora, esses resultados precisavam ser confirmados por sequenciamento devido à falta de especificidade. Ainda assim, o tempo de identificação do HRV diminuiu de cerca de 2 semanas para poucos dias (HYYPÄÄ, AUVINEN e MAARONEN, 1989).

Muitos ensaios de RT-PCR e RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) tem sido descritos, a maioria com a 5' UTR como alvo, uma região conservada entre as muitas espécies do HRV (OLIVE, AL-MUFRI, *et al.*, 1990; ARRUDA e HAYDEN, 1993; STEININGER, ABERLE e POPOW-KRAUPP, 2001; ARDEN, MCERLEAN, *et al.*, 2006; TAPPAREL, CORDEY, *et al.*, 2009; ÖSTERBACK, TEVALUOTO, *et al.*, 2013). Porém, esse alvo pode gerar inespecificidade devido a detecção cruzada de HRV e HEV, necessitando de um meio de diferenciação entre as duas espécies, como a diferença no tamanho do produto amplificado (OLIVE, AL-MUFRI, *et al.*, 1990), polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) (TORGERSEN, SKERN e BLAAS, 1989), hibridização com sondas específicas (HYYPÄÄ, AUVINEN e MAARONEN, 1989), sequenciamento genômico (MORI e CLEWLEY, 1994), ou sondas específicas inclusas já no ensaio (LU, HOLLOWAY, *et al.*, 2008). Outras regiões do genoma do HRV tem sido alvo de ensaios moleculares, como a região que codifica as proteínas de capsídeo VP4/VP2 (SAVOLAINEN, MULDER e HOVI, 2002; BOCHKOV, GRINDLE, *et al.*, 2014) e

VP1 (KHETSURIANI, LU, *et al.*, 2008; MCINTYRE, KNOWLES e SIMMONDS, 2013). Essas regiões são menos suscetíveis a recombinações, o que as torna alvos mais favoráveis para análise filogenética (SAVOLAINEN, MULDERE e HOVI, 2002), e, apesar de um pouco menos sensíveis, são mais específicas, não necessitando de etapa de diferenciação entre HRV e HEV (FAUX, ARDEN, *et al.*, 2011)

Além da RT-PCR e qRT-PCR, outras técnicas moleculares tem sido descritas para a detecção do HRV, a alternativa mais comum é a amplificação de ácido nucleico baseada em sequenciamento (NASBA), técnica que não necessita da transcrição do RNA em DNA complementar (cDNA) (SAMUELSON, WESTMORELAND, *et al.*, 1998; LOENS, IEVEN, *et al.*, 2003). A aplicação quantitativa da técnica de NASBA em tempo real utilizando sondas moleculares também foi descrita recentemente (SIDOTI, BERGALLO, *et al.*, 2012). Muito embora, em estudos com amostras clínicas a técnica de RT-PCR ainda é a mais utilizada.

1.8. Terapia e Prevenção da Infecção pelo HRV

Até a data ainda não há uma terapia comprovadamente eficaz contra o a infecção por HRV, tão pouco uma vacina, visto que o grande número de cepas existentes com pouca imunidade cruzada entre si dificulta tem dificultado seu desenvolvimento (ROHDE, 2011). Devido à importância do HRV como causador do resfriado comum e de uma vasta gama de doenças do trato respiratório, diversos candidatos a potenciais medicamentos para combater esse vírus surgiram e continuam surgindo. Alguns fármacos como Pleconaril, Vapendavir, Pirodavir e Rupintrivir chegaram a passar por testes clínicos e conseguiram alguns resultados favoráveis, mas ainda não há aprovação pelo FDA (*food and drug administration*) devido à falta de resultados mais significativos e também quanto a segurança do uso dos medicamentos (JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013).

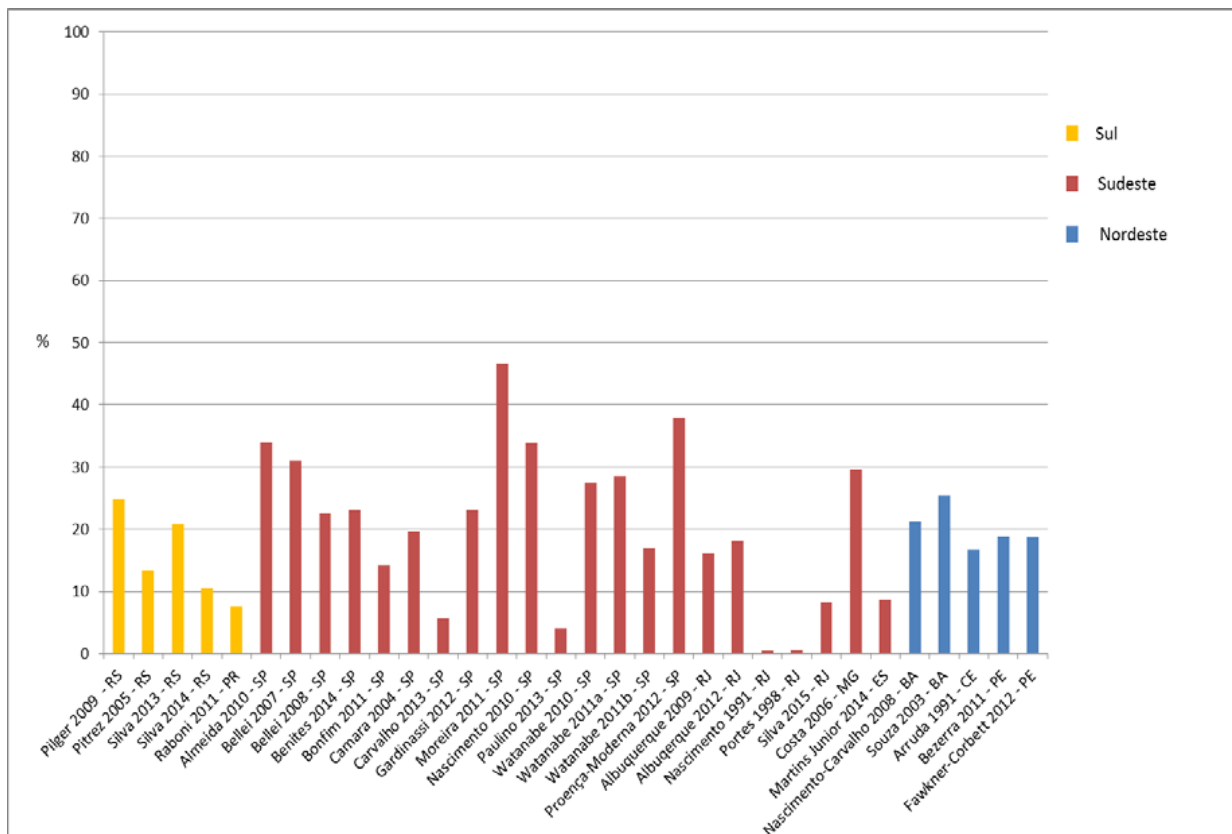
A lavagem de mãos e uso de desinfetantes como o álcool em gel 70% diversas vezes ao dia pode ter algum efeito como uma medida de profilaxia, uma vez que a principal rota de transmissão do HRV é por auto-inoculação das mucosas do nariz e olhos pelas mãos contaminadas com partículas virais (SAVOLAINEN-KOPRA, KORPELA, *et al.*, 2012; TURNER, FULS, *et al.*, 2012). Porém, essas medidas ainda não possuem uma eficácia comprovada para a diminuição do risco de infecção.

1.9. Epidemiologia e Sazonalidade

O HRV infecta pessoas de todas as idades, em proporções ligeiramente maiores tende

a infectar crianças, e a gravidade dos sintomas varia de acordo com o estado imunológico do hospedeiro (MÄKELÄ, PUHAKKA, *et al.*, 1998; PELTOLA, WARIS, *et al.*, 2008; DENLINGER, SORKNESS, *et al.*, 2011; MILLER, WILLIAMS, *et al.*, 2011) e, possivelmente, a cepa infectante (ARDEN, FAUX, *et al.*, 2010; MILLER, LU, *et al.*, 2007). A infecção pode por vezes ser assintomática, acometendo cerca de 4% da população adulta (JOHNSTON, SANDERSON, *et al.*, 1993) e cerca de 12-20% de crianças (STEININGER, ABERLE e POPOW-KRAUPP, 2001; NOKSO-KOIVISTO, KINNARI, *et al.*, 2002). De modo geral, o HRV é o patógeno mais frequentemente associado com IRA no mundo todo (KENNEDY, TURNER, *et al.*, 2012; JACOBS, LAMSON, *et al.*, 2013). Estima-se que os adultos sejam acometidos por 2 a 3 episódios de IRA por ano, enquanto as crianças podem ser acometidas com frequência de 8 a 12 episódios por ano (WINTHER, GWALTNEY, *et al.*, 1998). No Brasil, foram realizados alguns estudos epidemiológicos, mas nem todas as regiões foram abrangidas, existindo até o momento, estudos somente realizados na região Sul, Sudeste e Nordeste. O Gráfico 1 mostra a taxa de detecção do HRV em estudos realizados em vários estados do Brasil.

Gráfico 1. Distribuição das taxas de detecção do HRV em estudos epidemiológicos no Brasil realizados em vários estados. As cores indicam a região do país.



No hemisfério norte do mundo, o HRV circula durante todo o ano, com um decréscimo no verão, ascensão no outono e pico na primavera, comportamento sazonal um pouco diferente dos demais VRs, que circulam principalmente no outono e inverno (MONTO, 2002). Esse comportamento pode ser explicado pela relação com a atividade escolar que gera aglomeração das crianças, facilitando a transmissão viral entre elas e delas para seus familiares. Assim como para os outros VRs, qualquer ambiente com lotação de pessoas favorecem a transmissão do HRV (MONTO, 2002; SOUZA, RAMOS, *et al.*, 2003). No Brasil, apesar do HRV não ter um padrão de sazonalidade bem definido, uma vez que está presente em todas as estações do ano, apresenta um aumento de circulação nos meses mais frios, correspondentes ao inverno (WATANABE, CARRARO, *et al.*, 2010).

Após a descoberta da espécie C, surgiram vários estudos na tentativa de elucidar a epidemiologia molecular do HRV e caracterizar os aspectos clínicos de acordo com cada espécie (LAU, YIP, *et al.*, 2007; RENWICK, SCHWEIGER, *et al.*, 2007; WATANABE, CARRARO, *et al.*, 2010; NAKAMURA, ITOKAZU, *et al.*, 2010). Os estudos epidemiológicos mostram que as espécies A e C são mais frequentemente isoladas de paciente com IRA do que a espécie B (WATANABE, CARRARO, *et al.*, 2010; NAKAMURA, ITOKAZU, *et al.*, 2010). Existem relatos de que o HRV-C esteja associado com um quadro sintomático mais grave em relação as outras duas espécies e que é mais comumente identificado em ITRIs em crianças (CHOI, LEE, *et al.*, 2006; XIANG, GONZALEZ, *et al.*, 2008; ARDEN, FAUX, *et al.*, 2010).

O sistema de vigilância de IRA padronizado no Brasil é feito por imunofluorescência e não inclui o diagnóstico de infecção por HRV, uma vez que sua detecção por métodos imunológicos não é uma prática viável. Desse modo, a verdadeira incidência das infecções por HRV e impacto que causam se torna eufemizado, surgindo então a necessidade de estudos por iniciativa própria, utilizando de metodologias capazes de detectar esse patógeno com eficiência em pacientes com IRA nas diversas e divergentes regiões do país.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho objetivou investigar a presença de Rinovírus humano em amostras clínicas de pacientes com infecção respiratória aguda na população de Guarapuava-PR.

2.2. Objetivos específicos

1. Validar técnica de RT-PCR para detecção de HRV.
2. Estimar a prevalência do HRV nos casos de IRA na população de Guarapuava-PR.
3. Descrever a terapia medicamentosa dos pacientes apresentando IRA
4. Descrever o quadro clínico dos pacientes infectados pelo HRV.
5. Investigar um possível padrão sazonal das infecções por HRV ao longo do período de estudo.

3. METODOLOGIA

3.1. Inclusão de pacientes

Uma vigilância foi realizada de abril a dezembro de 2014 para a coleta de amostras de pacientes não hospitalizados com IRA frequentadores da Unidade Básica de Saúde (UBS) do bairro Vila Carli, em Guarapuava-PR. Durante a etapa de coleta, foram feitas duas visitas semanais à UBS, sempre no período da manhã. Os critérios de inclusão foram a apresentação de qualquer sintoma de IRA relatada pelos frequentadores da UBS, e a participação dos mesmos foi voluntária, mediante a explanação dos objetivos do presente estudo, ciência e concordância com TCLE (anexo A). Foi elaborada uma ficha com tópicos pré-definidos (anexo B) incluindo dados pessoais, sintomatologia, comorbidades/fatores de risco, histórico de vacinação contra o influenza A/B e uso de medicamentos para tratar a IRA. A ficha foi preenchida por agentes treinados perante ao relato dos pacientes. O projeto do presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO).

3.2. Coleta e processamento das amostras clínicas

As amostras de secreção nasal foram coletadas por meio de swab de rayon estéril e acondicionadas em tubo cônico de 10 mL com tampa contendo de 1,5 a 2mL de solução salina estéril. Os tubos foram mantidos em caixa térmica resfriada com gelo reciclável para o transporte até o Laboratório de Virologia e Biologia Molecular UNICENTRO. Já no laboratório, as amostras em tubo cônico fechado foram homogeneizadas em agitador de tubos de bancada (NOVA Instruments, Brasil) por 60 segundos em potência média e transferidas para um criotubo de 1,5mL devidamente identificado para serem estocadas a -80°C até o momento da extração do material genético.

3.3. Amostras controle

A cepas controle provenientes de cultura viral em células das espécies HRV 1 (pertencentes à espécie A) foram gentilmente cedidas pela Dr. Nancy Bellei (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP). As amostras foram recebidas em criotubos de 1,5 mL e foram estocadas a -80°C até o momento da extração do material genético. As amostras utilizadas como controles negativos consistiram em água de grau molecular (obtida por filtro MiliQ–Millipore, EUA).

3.4. Extração do material genético

As amostras clínicas e controles foram descongelados à temperatura ambiente e centrifugados a 4.000g por 10 minutos. A extração do material genético foi realizada a partir de 200µL do sobrenadante das amostras utilizando o RNeasy® Mini Kit – Qiagen (Qiagen GmbH, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

3.5. Transcrição reversa – síntese de cDNA (RT)

Na técnica de PCR, somente se pode gerar cópias de fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucleico), nunca de fragmentos de RNA. Por essa razão, uma vez extraído o material genético das amostras clínicas e cepas controle, houve a necessidade da etapa de RT, visto que o genoma do HRV consiste em RNA, que, nesta etapa, é convertido em cDNA, passível de amplificação na etapa posterior de PCR.

A RT foi realizada em um volume final de 20µL. Em um microtubo de 200µL de capacidade com tampa, foram adicionados 10µL do material genético extraído das amostras clínicas e cepas controle. O microtubo contendo o material extraído foi levado ao termociclador (Swift MaxPro®, Esco, Bélgica) para ser aquecido a 75°C por 10 minutos. Após o resfriamento rápido em gelo do microtubo contendo o material genético extraído, foi adicionada ao mesmo a mistura de reagentes (Quadro 1) contendo 200ng (10ng/µL) de primer randômico (Random Hexamer Primer, Invitrogen, EUA), tampão para RT (First Strand Buffer, Invitrogen, EUA) em concentração 1x (50mM Tris-HCl, pH8,3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂), 0,2mMol/L de cada um dos desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2,5U de enzima transcriptase reversa MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus*) (Invitrogen, EUA), 4U de inibidor de RNase (RNaseOUT®, Invitrogen, EUA), e água de grau molecular (obtida por filtro MiliQ–Millipore, EUA) q.s.p 20µL. A mistura foi incubada no termociclador com programação para 37°C por 60 minutos, seguidos de uma etapa para inativação da transcriptase reversa, de 70°C por 15 minutos. Em todas as reações foram incluídos controles positivos (material genético extraído das cepas controle do HRV) e negativos (água de grau molecular).

Quadro 1. Concentração e Volume dos Reagentes Utilizados na RT

Reagente	Concentração inicial	Concentração final	Volume
Primer Randômico	200ng/ μ L	10ng/ μ L	1 μ L
Tampão para RT	5 x	1 x	4 μ L
Mix dNTPs	20mMol/L	0,8mMol/L	0,8 μ L
Transcriptase Reversa	5U/ μ L	2,5U	0,5 μ L
Inibidor de RNase	40U/ μ L	4U	0,1 μ L
Água de Grau Molecular	-	-	3,6 μ L

3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a etapa de PCR, foram utilizados os primers senso 9895 (posição 534-560, 5' - GGG ACC AAC TAC TTT GGG TGT CCG TGT - 3') e anti-senso 9565 (posição 1083-1058, 5' - GCA TCI GGY ARY TTC CAC CAC CAN CC - 3'), descritos por Savolainen e colaboradores (2002). O tamanho do fragmento gerado por esse par de primers a partir do genoma do HRV tem o comprimento de 549 pares de bases (pb), e compreende parte da zona hipervariável 5' UTR, o gene VP4 inteiro, e a parte 5' terminal do gene VP2 (SAVOLAINEN, MULDERE e HOVI, 2002). A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 μ L. Em um microtubo de 200 μ L com tampa, foi adicionada a mistura de reagentes para a PCR (Quadro 2) contendo tampão para PCR (PCR Buffer - MgCl₂, Invitrogen, EUA) em concentração de 1 x (20mM Tris-HCl, pH 8.4, 50mM KCl), 0,1mMol/L de cada um dos quatro dNTPs, 3,5mMol/L de MgCl₂ (Invitrogen, EUA), 0,4 μ Mol/L de cada um dos primers 9895 e 9565, 5 μ L do produto da RT (cDNA), e água de grau molecular q.s.p 25 μ L. A amplificação do cDNA foi realizada em termociclador Swift MaxPro®, com programação para 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 61°C por 45 segundos, e 72°C por 1 minuto, e uma etapa final de 72°C por 10 minutos. Em todas as reações foram incluídos controles positivos (cDNA sintetizado a partir do material genético extraído das cepas controle do HRV) e negativos (água de grau molecular).

Quadro 2. Concentração e volume dos componentes da PCR

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final	Volume
Tampão para PCR	10 x	1 x	2,5µL
MgCl ₂	50mMol/L	3,5mMol/L	1,75µL
Mix dNTPs	20mMol/L	0,4mMol/L	0,5µL
Primers	20µMol/L	0,4µMol/L	0,5µL
Água de Grau Molecular	-	-	14,75µL
cDNA	-	-	5,0µL

3.7. Determinação do tamanho do amplicon gerado na PCR por eletroforese em gel de agarose

O gel para a eletroforese foi preparado em volume de 250mL, contendo 1,2% de agarose (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, EUA), 5% de tampão com Tris/borato/EDTA (TBE) (Tris 0,089M; ácido bórico 0,0089M; EDTA 0,002M pH 8,0), 0,5µg/mL de solução de brometo de etídeo (Invitrogen, EUA), e água de grau molecular q.s.p 250mL. A mistura dos componentes (exceto a solução de brometo de etídeo) foi feita em Erlenmeyer com capacidade para 500mL, que foi aquecido em forno microondas em intervalos de 30 segundos até a completa solubilização da agarose. A mistura no Erlenmeyer foi resfriada à temperatura ambiente até atingir cerca de 45°C, e a solução de brometo de etídeo foi então adicionada. Após a adição da solução de brometo de etídeo, a mistura foi imediatamente vertida no gel casting de 20x20cm (Kasvi, Brasil), com dois pentes para formação de poços de 6x1 mm posicionados a cerca de 10 cm um do outro. O Quadro 3 mostra a composição do gel de agarose corado em brometo de etídeo.

Quadro 3: Composição do gel de agarose corado em brometo de etídeo

Componente	Concentração inicial	Concentração final	Volume/Peso
Agarose	100%	1,2%	3g
Tampão TBE	10x	0,5 x (5%)	12,5mL
Brometo de etídeo	10mg/mL	0,5µg/mL	12,5µL
Água de grau molecular	-	-	q.s.p 250mL

A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal em tampão TBE 1x (Tris 0,089M; ácido bórico 0,0089M; EDTA 0,002M pH 8,0). O volume adicionado em

casa poço do gel foi de 10µL, sendo 7,5µL do produto da PCR homogeneizados a 2,5µL de corante azul de bromofenol (0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%) (Blue Juice®, Invitrogen, EUA) diluído 1:10. A corrente aplicada foi de 145V por 60 minutos. Em todos os géis foi adicionado o padrão de peso molecular de escala 100pb (Invitrogen, EUA) para identificação do tamanho dos fragmentos gerados pela PCR a partir das amostras clínicas, quando presentes. Após eletroforese, o gel foi observado em transiluminador em luz ultravioleta (UV) acoplado a um fotodocumentador AlphaImager HP (Protein Simple, EUA).

3.8. Validação da etapa de PCR

A validação da técnica foi realizada com o intuito de otimização da mesma, com a maior sensibilidade e especificidade possíveis. Os parâmetros que mais influenciam na reação de PCR foram variados a fim de encontrar a maior valia para cada um deles. Para cada teste de variação de parâmetro da reação, cepas controle foram amplificadas para verificar o impacto da modificação. Todas as alterações foram feitas somente a partir de gerado o cDNA, ou seja, após a etapa de RT. A seguir está detalhado como foi a variação de cada parâmetro.

3.9. Determinação do limite de detecção (LD)

As cepas controle positivo do HRV-1 foram diluídas em série em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . As diluições das cepas controle, bem como os controles puros, tiveram seu material genético extraído e foram submetidos à RT-PCR. A determinação do LD foi realizada pela observação da presença ou ausência das bandas correspondentes a cada diluição das cepas controle no gel de agarose após a eletroforese (549pb). O LD foi considerado como a maior diluição das cepas controle visualizável no gel.

3.9.1. Determinação da temperatura de hibridização dos primers

Utilizando o programa do aparelho termociclador, foi realizado um gradiente de temperaturas de hibridização dos primers, variando de 54 a 62°C na reação de PCR com as cepas controle do HRV-1. A temperatura de hibridização dos primers determinada como ótima foi a que gerou a visualização da banda correspondente às cepas controle amplificadas no gel de agarose com maior intensidade de brilho e sem a presença de bandas inespecíficas (em outras posições, que não sejam a que representa 549pb).

3.9.2. Determinação da concentração de primers

Foi realizada uma curva de concentração dos primers 9895 e 9565 na etapa de PCR com as cepas controle do HRV-1 em diluição 10^{-2} , variando de 0,2 a 0,8 μ Mol/L, com escala 0,2 μ Mol/L. A concentração determinada como ótima foi a que gerou uma banda correspondente a 549pb visualizável no gel com maior intensidade de brilho e sem a presença de bandas inespecíficas.

3.9.3. Determinação da concentração de dNTPs

Foi realizada uma curva de concentração do mix dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) na etapa de PCR com as cepas controle do HRV-1 em diluição 10^{-2} , variando de 0,2 a 0,8mMol/L, com escala 0,2mMol/L. A concentração determinada como ótima foi a que gerou uma banda correspondente a 549pb visualizável no gel com maior intensidade de brilho e sem a presença de bandas inespecíficas.

3.9.4. Determinação da concentração de MgCl₂

Foi realizada uma curva de concentração de MgCl₂ na etapa de PCR com as cepas controle do HRV-1 em diluição 10^{-2} , variando de 2,5 a 4,0mMol/L, com escala 0,5mMol/L. A concentração determinada como ótima foi a que gerou uma banda correspondente a 549pb visualizável no gel com maior intensidade de brilho e sem a presença de bandas inespecíficas.

3.9.5. Determinação da concentração de *Taq* DNA Polimerase

Foi realizada uma curva de concentração da enzima *Taq* DNA polimerase na etapa de PCR com as cepas controle do HRV-1 em diluição 10^{-2} , variando de 1,5 a 3,0U, com escala 0,5U. A concentração determinada como ótima foi a que gerou uma banda correspondente a 549pb visualizável no gel com maior intensidade de brilho e sem a presença de bandas inespecíficas.

3.9.6. Determinação da quantidade de cDNA

O método utilizado não é quantitativo, porém, partiu-se de cepas controle do HRV puras e diluídas em água de grau molecular. Foi realizada uma curva de concentração do cDNA da cepa controle do HRV-1 em 10^{-2} , variando de 2,5 a 10 μ L, com escala 2,5 μ L. A quantidade de cDNA determinada como ótima foi a que gerou uma banda

correspondente a 549pb visualizável no gel com maior intensidade de brilho e sem a presença de bandas inespecíficas.

3.9.7. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foram procedidas com o software SPSS versão 22.0 (IBM, EUA). As diferenças entre os grupos foram comparadas com o teste de Qui Quadrado de Pearson, foram essas: a) frequência de uso de medicamentos por grupos de idade, b) detecção do HRV por sexo; c) detecção do HRV por grupos de idade; d) frequência de sintomas em pacientes infectados pelo HRV e não infectados e, e) frequência de ILI em pacientes vacinados infectados pelo HRV e não infectados. Em todas as comparações valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Reação inicial de RT-PCR com as cepas controle HRV-1

A reação foi realizada conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 e revelada conforme o item 3.7, tendo sido repetida nas mesmas condições por 3 dias consecutivos. A cepa HRV-1 gerou resultado positivo referente a banda correspondente a 549pb (devido a resolução da imagem do gel gerada, a banda está marcada como 550pb – Figura 9), e passou então a ser utilizada como controle para a padronização e também para os testes com as amostras clínicas.

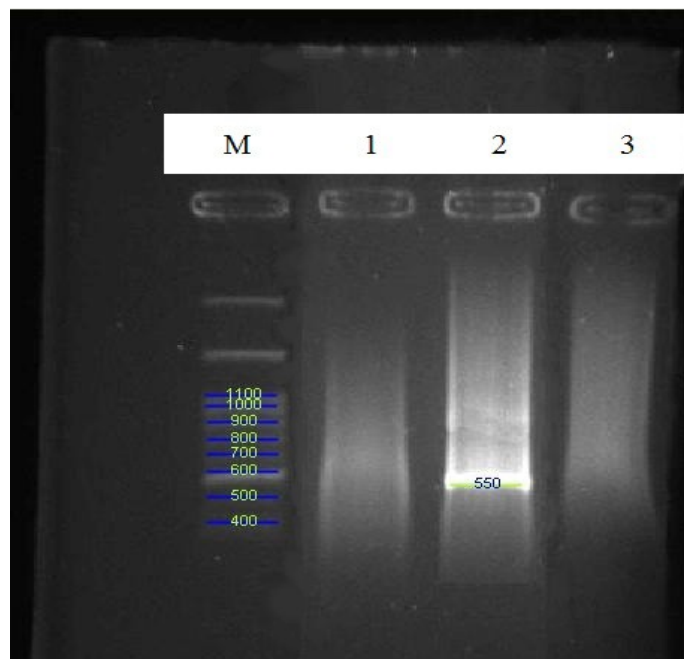


Figura 9 - Coluna M: marcador de peso molecular de escala 100 pb; coluna 1: controle negativo; coluna 2: cepa controle HRV-1 pura; coluna 2: controle negativo.

4.2. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi determinado a partir das cepas controle do HRV-1 em diluições de 10^{-1} a 10^{-4} . A maior diluição que a reação de PCR foi capaz de amplificar com eficiência para gerar uma banda suave, mas claramente visível no gel foi a diluição 10^{-2} do HRV-1, sendo esta estabelecida como LD. A figura 10 mostra a imagem do gel de agarose corado em brometo de etídeo após a eletroforese dos produtos da PCR do teste de determinação do LD.

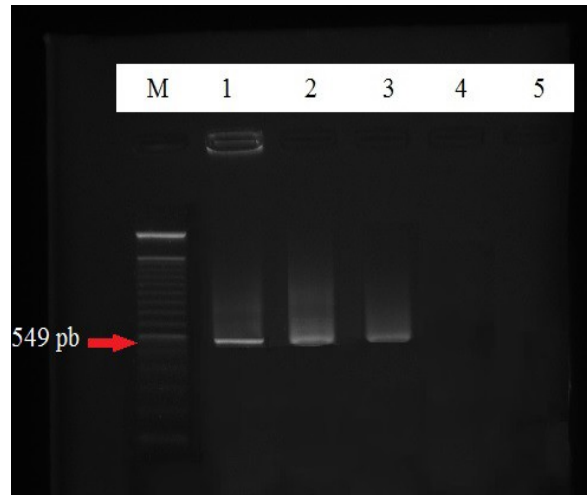


Figura 10 - determinação do LD. Coluna M: marcador de peso molecular de escala 100pb; coluna 1: cepa controle HRV pura; coluna 2: cepa controle HRV-1 10^{-1} ; coluna 3: cepa controle HRV-1 10^{-2} ; coluna 4: cepa controle HRV-1 10^{-3} ; coluna 5: cepa controle do HRV 10^{-4} .

4.3. Determinação da temperatura de hibridização dos primers

A temperatura de hibridização dos primers determinada como ótima foi a de 59°C , que foi a mais alta temperatura de hibridização que não gerou diminuição do rendimento da reação, favorecendo também a diminuição da hibridização inespecífica.

4.4. Determinação da concentração de primers

A concentração de primers que apresentou o melhor rendimento para a reação sem prejuízo à especificidade foi a de $0,6\mu\text{Mol/L}$ para a diluição 10^{-2} da cepa controle HRV-1. Essa concentração foi determinada como padronizada para os testes com amostras clínicas.

4.5. Determinação da concentração de dNTPs

A concentração de mix dNTPs que apresentou o melhor rendimento para a reação sem prejuízo à especificidade foi a de $0,6\text{mMol/L}$ para a diluição 10^{-2} da cepa controle HRV-1. Essa concentração foi determinada como padronizada para os testes com amostras clínicas.

4.6. Determinação da concentração de MgCl_2

A concentração de MgCl_2 que apresentou melhor rendimento sem prejuízo à especificidade da PCR para a detecção das cepas controle HRV-1 em diluição 10^{-2} foi a de $3,5\text{mMol/L}$.

4.7. Determinação da concentração de *Taq* DNA Polimerase

Não foi observada diferença no rendimento das reações com as concentrações 2,5U e 3,0U, uma vez que as duas concentrações geraram bom rendimento à reação de PCR. Por razão de evitar desperdício de reagentes, a concentração de *Taq* DNA Polimerase determinada como padronizada foi a de 2,5U.

4.8. Determinação da quantidade de cDNA

Utilizando o volume de 2,5µL a cepa controle HRV em diluição 10^{-2} , observou-se uma diminuição no rendimento da reação quando comparada à mesma utilizando maiores volumes do cDNA. Não foi observada diferença significativa no rendimento da reação com os volumes de 5µL, 7,5µL e 10µL. Para evitar o desperdício de amostras clínicas, bem como das cepas controle, o volume padronizado se manteve o inicial, 5µL.

4.9. Reação de PCR otimizada para a detecção do HRV em amostras clínicas

Em relação à reação inicial da etapa de PCR, a temperatura de hibridização dos primers foi alterada, bem como alguns dos parâmetros testados. O quadro 4 mostra a concentração final de cada componente da reação otimizada. A termociclagem final se manteve a mesma da inicial, exceto a temperatura de hibridização dos primers que baixou de 61 para 59°C. A figura 7 mostra a imagem do gel de agarose corado em brometo de etídeo após a eletroforese dos produtos da PCR padronizada.

Quadro 4. Concentração e volume dos componentes da PCR após a padronização

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final	Volume
Tampão para PCR	10 x	1 x	2,5µL
MgCl ₂	50mMol/L	3,5mMol/L	1,75µL
Mix dNTPs	20mMol/L	0,6mMol/L	0,75µL
Primers	20µMol/L	0,6µMol/L	0,75µL
Água de Grau Molecular	-	-	14,25µL
cDNA	-	-	5,0µL

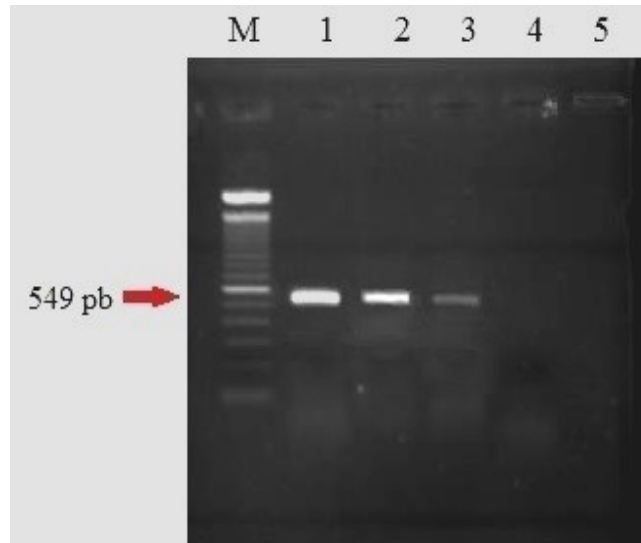
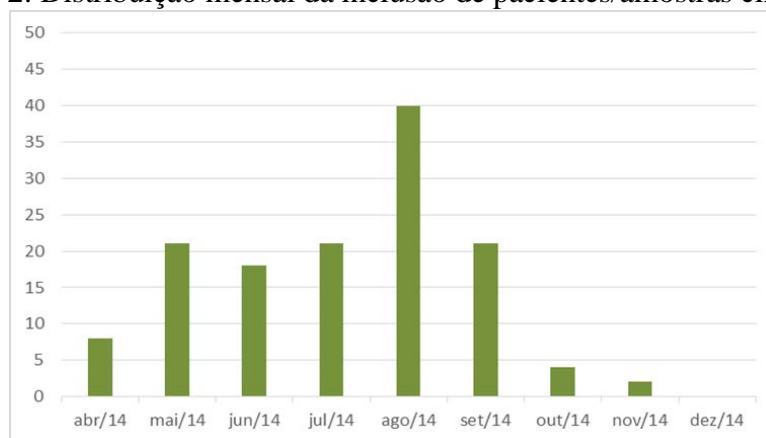


Figura 11 - Coluna M: marcador de peso molecular de escala 100pb; coluna 1: cepa controle HRV pura; coluna 2: cepa controle HRV-1 10^{-1} ; coluna 3: cepa controle HRV-1 10^{-2} ; coluna 4: cepa controle HRV-1 10^{-3} ; coluna 5: cepa controle do HRV 10^{-4} .

4.9.1. Dados dos pacientes incluídos no estudo

Ao fim do período de vigilância no posto de saúde à procura de pacientes com sintomas de IRA, foram coletadas 135 amostras de swab nasal, sendo uma por paciente. Foram coletadas 8 amostras no mês de abril, 21 em maio, 18 em junho, 21 em julho, 40 em agosto, 22 em setembro, 3 em outubro, 2 em novembro, e nenhuma no mês de dezembro. O gráfico 2 representa a inclusão mensal de pacientes durante o período de estudo.

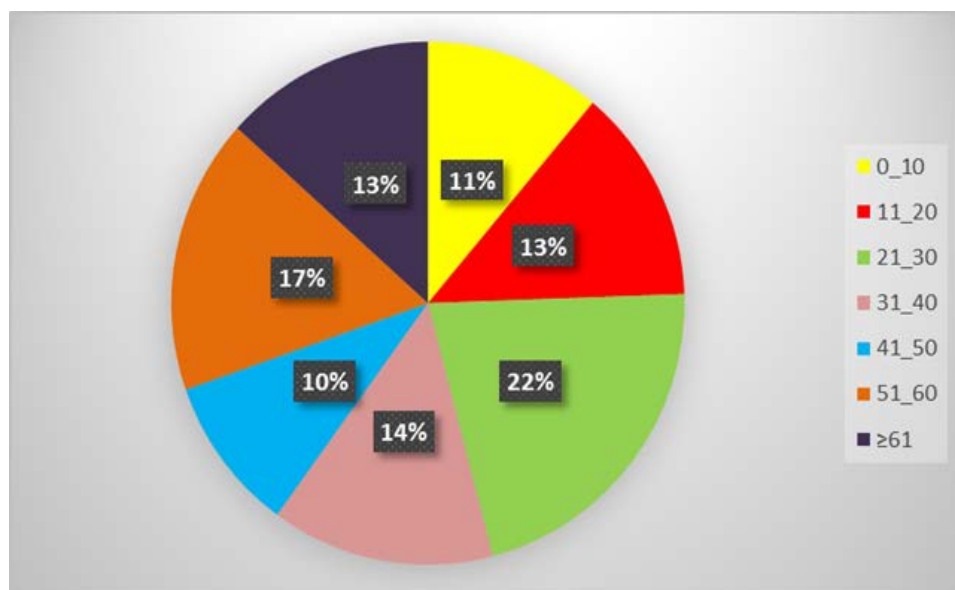
Gráfico 2: Distribuição mensal da inclusão de pacientes/amostras clínicas



A média geral dos pacientes incluídos foi 36 anos (mediana de 33 anos). Foram incluídos pacientes de todas as faixas etárias, e foram então separados em grupos de 10 em 10

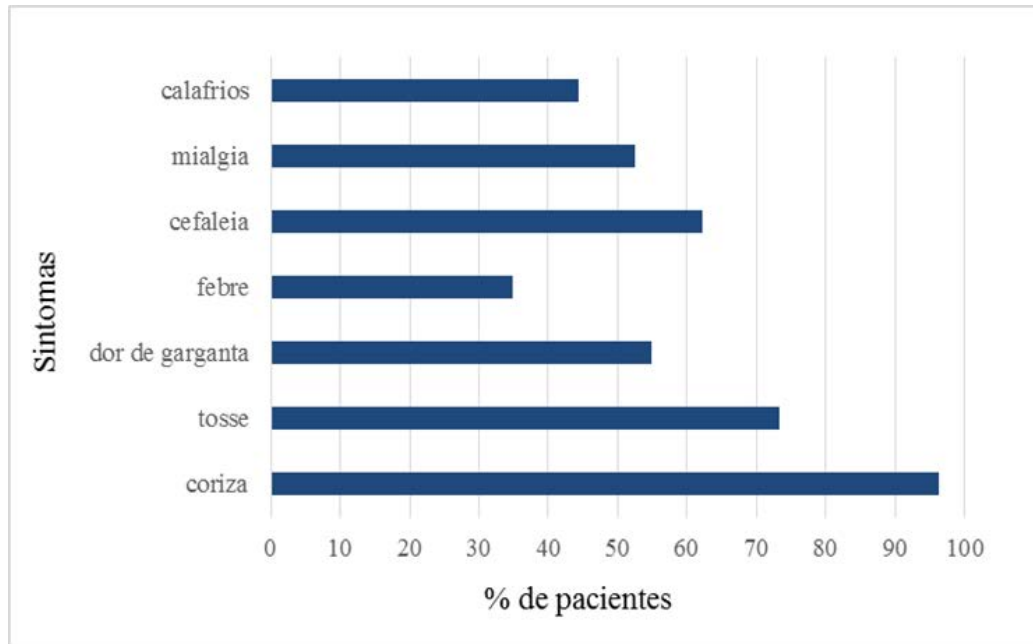
anos, e um grupo para os pacientes com idade igual ou superior a 61 anos de idade. Foram inclusos 15 pacientes no grupo de 0 a 10 anos, 18 no grupo de 11 a 20 anos, 29 no grupo de 21 a 30 anos, 19 no grupo de 31 a 40 anos, 13 no grupo de 41 a 50 anos, 23 no grupo de 51 a 60 anos, e 18 no grupo com idade igual ou superior a 61 anos. O gráfico 3 representa a distribuição dos pacientes entre os grupos separados por faixa etária. A maioria dos pacientes inclusos foram do sexo feminino, representando 73% do total, e os outros 27% foram do sexo masculino

Gráfico 3: Distribuição dos pacientes por faixa etária



O tempo médio de coleta das amostras após o início dos sintomas foi de 6 dias, variando de 1 a 30 dias (mediana de 5 dias).

Foram colhidos dados sobre a sintomatologia e uso de medicamentos pelos pacientes, baseados em relato dos mesmos, ou, quando tratou-se de crianças muito jovens, dos responsáveis. No momento da coleta, 96,3% dos pacientes relataram coriza, 73,3% tosse, 54,8% dor de garganta, 34,8% febre, 62,2% cefaleia, 52,6% mialgia, e 44,4% calafrios. Uma parcela de 31,8% (43/135) dos pacientes relatou uma sintomatologia mais grave, caracterizando “doença semelhante à gripe causada pelo Influenza” (febre alta além dos sintomas constitucionais e respiratórios comuns de IRA), cujo termo mais utilizado vem do inglês “*Influenza –Like Illness*” (ILI). O gráfico 4 mostra a distribuição da frequência dos sintomas relatados pelos pacientes.

Gráfico 4: Distribuição da frequência de sintomas por porcentagem do total de pacientes

Entre os pacientes incluídos no período de estudo, 63% (85/135) afirmaram ter feito uso de pelo menos um tipo de medicamento para tratar a IRA. Não houve diferença com significância estatística entre o uso de nenhuma classe de medicamentos em relação à faixa etária, porém, uma ligeira tendência a um maior uso de antibióticos no grupo de pacientes com até 10 anos foi observada ($p=0,057$). A tabela 1 mostra a distribuição das classes de medicamentos utilizadas pelos pacientes.

Tabela 1. Medicamentos utilizados pelos pacientes para tratamento de IRA

Idade (anos)	AINE (%)	Analg* (%)	Antib (%)	Antig** (%)	Anti-H (%)	Antit/Ex (%)	Bronc (%)	Cort (%)	Desc (%)	Alt*** (%)	Algun (%)
≤10	26,7	33,3	26,7	6,7	6,7	13,3	0,0	0,0	0,0	6,7	73,3
11-20	11,1	22,2	16,7	16,7	5,6	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0	61,1
21-30	20,0	30,0	3,3	23,3	3,3	6,7	3,3	13,3	6,7	0,0	53,3
31-40	5,6	33,3	22,2	5,6	16,7	11,1	5,6	5,6	0,0	0,0	66,7
41-50	7,7	58,8	0,0	23,1	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	84,6
51-60	13,0	30,4	4,3	13,0	0,0	8,7	0,0	0,0	4,3	8,7	52,2
≥61	11,1	11,1	5,6	33,3	5,6	11,1	0,0	5,6	0,0	5,6	67,7
Geral	14,1	29,6	10,4	17,8	5,9	10,4	1,5	4,4	2,2	3,0	63,0

AINE = Anti-inflamatório não esteroide; Analg = analgésico; Antib = antibiótico; Antig = antigripal; Anti-H = anti-histamínico; Antit/Ex = antitussígenos/expectorantes; Bronc = broncodilatadores; Desc = descongestionantes; Alt = terapias alternativas; Algun = pelo menos uma classe de

Uma parcela composta de 14 pacientes relatou uso de antibióticos, apenas 1 dos pacientes em uso de antibióticos relatou uso em associação à corticoides. Em adição, 4 deles foram vacinados contra o Influenza A/B na temporada corrente. Entre os pacientes em uso de antibióticos, 11 apresentavam tosse frequente e dor de garganta, entre eles, 7 apresentavam ILI. Um outro paciente apresentava ILI sem dor de garganta. Outros 2 pacientes apresentavam apenas sintomas de resfriado comum (ambos possuíam 10 anos ou menos). A tabela 2 mostra algumas informações sobre os pacientes em uso de antibióticos. Quanto a faixa etária, quatro dos pacientes em uso de antibióticos estão no grupo com até 10 anos de idade, três, um, quatro, zero e um, estão nos grupos de 11 a 20, 21 a 30, 31 a 40, 41 a 50 e 51 a 60, respectivamente, e um paciente pertence ao grupo com 61 anos ou mais. Alguns dos pacientes relataram ser portadores de doenças crônicas.

Tabela 2. Informações básicas dos pacientes em uso de antibióticos

Idade	Sexo	Sintomas	Doenças crônicas/Fatores de risco	Vacinado (a) contra Influenza A/B
6	Feminino	Resfriado comum	-	Não
6	Feminino	Resfriado comum	-	Não
28	Feminino	ILI	Cardiopatia	Sim
58	Feminino	Coriza + tosse + dor de garganta	Hipertensão	Não
16	Feminino	ILI	-	Não
39	Feminino	Coriza + tosse + dor de garganta	Doença pulmonar	Sim
5	Masculino	Coriza + tosse + dor de garganta	-	Não
38	Masculino	ILI	-	Não
62	Feminino	ILI	Diabetes + hipertensão	Sim
14	Feminino	ILI	-	Sim
19	Feminino	ILI	-	Não
31	Feminino	ILI	Tabagismo	Não
36	Feminino	Coriza + tosse + dor de garganta		Não
8	Masculino	ILI		Não

Quanto ao status de vacinação geral contra a gripe (InfluenzaA/B), 37% dos pacientes relataram ter sido vacinados para a temporada corrente no momento da

coleta. Em relação ao porte de comorbidades e/ou fatores de risco, 9,6% dos pacientes relataram ser portadores de diabetes tipo I ou II, 17,8% hipertensão, 13,3% tabagismo, 2,2% doenças pulmonares, e 11,1% relataram portar algum tipo de cardiopatia.

4.9.2. Pacientes infectados pelo HRV

O percentual de 18,5% das amostras (25/135) produziu resultado positivo para a presença do HRV, sendo 1 do mês de abril, 7 de maio, 1 de junho, 2 de julho, 10 de agosto, 1 de setembro, 3 de outubro e nenhuma no mês de novembro.

O HRV foi detectado em 21,6% dos indivíduos do sexo masculino (8/37) e 17,3% dos indivíduos do sexo feminino (17/98). Não houve diferença estatisticamente significativa. Quanto aos grupos de idade, a detecção do vírus foi aparentemente mais frequente entre as crianças com até 10 anos de idade, conforme mostra a tabela 3. A diferença entre a detecção do HRV entre os grupos de idade não foi estatisticamente significativa.

Tabela 3 – Detecção do HRV entre os grupos de idade

Grupos de idade (anos)	HVR positivo % (n/n total)
≤10	40,0 (6/15)
11-20	22,2 (4/18)
21-30	23,3 (7/30)
31-40	11,1 (2/18)
41-50	7,7 (1/13)
51-60	4,3 (3/23)
≥61	3,3 (2/18)

Quanto à apresentação de sintomas, a única diferença estatisticamente significativa observada foi referente a cefaleia, sendo que os pacientes não infectados pelo HRV apresentaram esse sintoma com maior frequência. Uma leve tendência de apresentar febre e ILI com maior frequência foi observada nos pacientes infectados pelo HRV, porém, sem significância estatística. A tabela 4 mostra a frequência dos sintomas entre os dois grupos.

Tabela 4 – Apresentação de sintomas pelos pacientes infectados e não infectados pelo HRV

Sintomas	HRV positivo % (n/n total)	HRV negativo % (n/n total)
Coriza	96,0 (24/25)	96,4 (106/110)
Tosse	80,0 (20/25)	72,7 (80/110)
Dor de garganta	52,0 (13/25)	56,4 (62/110)
Febre	44,0 (11/25)	33,4 (37/110)
Cefaleia	40,0 (10/25)*	66,4 (73/110)*
Mialgia	60,0 (15/25)	50,9 (56/110)
Calafrios	40,0 (10/25)	45,5 (50/110)
ILI	40,0 (10/25)	30,0 (33/110)

*Estatisticamente significativo (p<0,05)

Uma diferença estatisticamente significativa foi observada quanto a apresentação de ILI no grupo dos pacientes vacinados contra o Influenza A/B, no qual foi mais frequente nos pacientes infectados pelo HRV, conforme mostra o quadro 4. Foram 7 (28%) pacientes vacinados, dos quais 4 apresentavam sintomas de ILI no momento da coleta. Das amostras negativas para o HRV, 43 foram de pacientes vacinados, e apenas 9 apresentavam sintomas de ILI no momento da coleta.

Quadro 5 – Frequência de detecção do HRV e apresentação de ILI em pacientes vacinados contra o Influenza A/B

Pacientes vacinados	HRV positivo % (n)	HRV negativo % (n)
ILI presente % (n/n total)	57,1 (4)	20,9 (9)
ILI ausente % (n/n total)	42,9 (3)	79,1 (34)

p<0,05

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a taxa de detecção do HRV foi de 18,5%, taxa que condiz com os resultados encontrados com outros estudos realizados no Brasil (CAMARA, SILVA, *et al.*, 2004; BEZERRA, BRITO, *et al.*, 2011; WATANABE, CARRARO, *et al.*, 2011; SILVA, PITREZ, *et al.*, 2013; FAWKNER-CORBETT, DUARTE, *et al.*, 2012). Diversos fatores podem interferir na taxa de detecção viral, como população de estudo, local, condições climáticas e época do ano (CHEW, DORAISINGHAM, *et al.*, 1998). Martins-Junior e seu grupo conduziram um estudo no Estado do Espírito Santo com pacientes apresentando IRA e febre e detectaram o HRV em 8,6% das amostras (MARTINS JÚNIOR, CARNEY, *et al.*, 2014). Nascimento e colaboradores realizaram um estudo no Estado de São Paulo com crianças de até 2 anos de idade com fibrose cística, no qual detectaram o HRV em 33,8% das amostras (NASCIMENTO, SOUZA, *et al.*, 2010). Um outro estudo realizado pelo grupo de Moreira, também em São Paulo, detectou o HRV em 46,7% das amostras provenientes de pacientes com até 14 anos de idade (MOREIRA, KAMIKAWA, *et al.*, 2011). Neste estudo, o HRV foi detectado em amostras provenientes de pacientes de todos os grupos de faixa etária, levemente mais frequente na população infantil, porém sem significância estatística.

Os quadros sintomáticos de pacientes positivos para o HRV foram muito variáveis, caracterizando desde de um resfriado comum até ILI. A parcela de 40% dos pacientes HRV positivos do presente estudo relataram os sintomas que caracterizam ILI, resultados condizentes com outros estudos realizados no Brasil (BELLEI, CARRARO, *et al.*, 2008; WATANABE, CARRARO, *et al.*, 2010; SILVA, MENDES, *et al.*, 2015). Foi observada uma relação entre ILI e a infecção pelo HRV no grupo dos pacientes vacinados contra o Influenza A/B. Uma vez que a vacina atualmente disponível pode apresentar eficácia de aproximadamente 75%, os pacientes vacinados têm grande chance de estarem protegidos contra o Influenza A/B (MARTÍNEZ-BAZ, NAVASCUÉS, *et al.*, 2015). Entretanto, boa parte dos pacientes vacinados apresentou ILI, e nossos resultados indicam que possivelmente o HRV foi o responsável em alguns dos casos, visto que a chance de um paciente vacinado apresentar ILI foi consideravelmente maior quando o mesmo teve resultado positivo para a presença do HRV. A diferença observada foi estatisticamente significativa. Além do resfriado comum e ILI, a infecção pelo HRV pode causar muitos outros quadros clínicos, como otite média (BLOMQUIST, ROIVAINEN, *et al.*, 2002), bronquiolite aguda (TEERATAKULPISARN, PIENTONG, *et al.*, 2014), exacerbação de

DPOC (BECKHAM, CADENA, *et al.*, 2005), pneumonia (NASCIMENTO-CARVALHO, RIBEIRO, *et al.*, 2008), exacerbação e iniciação de asma (MARTIN, SIDDIQUI e HASSAN, 2006; JACKSON, GANGNON, *et al.*, 2008; GERN, 2009)

Quanto a um possível comportamento sazonal do HRV, a estimativa se tornou difícil devido ao curto espaço de tempo do estudo. A maior taxa relativa de detecção do HRV foi nos meses de maio e agosto, período correspondente à segunda metade do outono e do inverno, respectivamente, no Brasil. Resultados análogos foram relatados por Albuquerque e colaboradores, em estudo conduzido no Estado do Rio de Janeiro entre 2006 e 2007, em que detectaram o HRV com maior frequência de junho a setembro, com pico em agosto (ALBUQUERQUE, VARELLA e SANTOS, 2012). O grupo de Gardinassi realizou um estudo de sazonalidade viral no Estado de SP entre 2004 e 2005, e encontrou uma associação entre maiores taxas de circulação do HRV e períodos de baixas temperaturas e humidade relativa, período, em seu estudo, correspondente ao fim da primavera e meses de outono e inverno. O grupo também constatou uma diminuição da circulação do vírus nos meses de verão (GARDINASSI, SIMAS, *et al.*, 2012). Outros estudos conduzidos no país indicam que o HRV circula durante todas as estações do ano, com discretos picos de incidência nos meses mais frios (ARRUDA, HAYDEN, *et al.*, 1991; COSTA, YOKOSAWA, *et al.*, 2006; BELLEI, CARRARO, *et al.*, 2008; WATANABE, CARRARO, *et al.*, 2010; BEZERRA, BRITO, *et al.*, 2011).

Aproximadamente dois terços dos pacientes relataram estar fazendo ou ter feito uso de medicamentos para tratamento da IRA. A maioria dos pacientes relatou uso de medicamentos para tratamento sintomático da condição, principalmente com analgésicos, antigripais combinatórios, e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (tabela 1), entre outros. Alguns pacientes relataram uso de antibióticos, com ou sem associação a corticoides. Não houve variação com significância estatística entre o uso de medicamentos e a faixa etária dos pacientes. Resultados semelhantes quanto às classes de medicamentos e frequência de uso pela comunidade em tratamento de IRA foram observados em estudos anteriores (BERQUÓ, BARROS, *et al.*, 2004; CRUZ, DOURADO, *et al.*, 2014)

O tratamento de IRA ainda é muito controverso, ficando limitado ao alívio dos sintomas na maioria dos casos. Quanto à eficácia das classes de medicamentos mais utilizadas por nossa população de estudo, segundo a literatura atual, estão entre as que apresentam melhores resultados. O uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) no resfriado comum apresenta alguma eficácia no combate à dor e mal-estar geral, mas não apresentam a mesma frente aos sintomas respiratórios (KIM, CHANG, *et al.*, 2015). O uso combinatório de AINE

(ibuprofeno) e um analgésico (paracetamol), seja de forma simultânea ou alternada parece apresentar melhores resultados na redução da febre do que o uso dos fármacos em monoterapia, (WONG, STANG, *et al.*, 2014). O uso de anti-histamínicos em monoterapia não apresenta melhora significativa em comparação à melhora dos sintomas do resfriado comum pelo curso natural da infecção (SANTOS, 2012), já o seu uso em antigripais (em combinação com analgésicos e descongestionantes) tem apresentado bons resultados na redução do tempo e gravidade dos sintomas (PICON, COSTA, *et al.*, 2013; DE SUTTER, VAN DRIEL, *et al.*, 2012). O acetaminofeno (paracetamol) é eficaz em reduzir os níveis de cefaleia e mialgia, e, em menor proporção, de febre. Quanto aos sintomas respiratórios parece não ter eficácia (LI, YUE, *et al.*, 2013). A mesma eficácia frente a minimização de dores e febre vale para a dipirona, que embora amplamente utilizada no Brasil e outros países, foi banida em alguns países europeus, bem como nos EUA e Canadá, devido ao risco de toxicidade medular (BRICKS, 2014).

Cerca de 10% dos pacientes relataram uso de antitussígenos e/ou expectorantes para alívio da tosse, e apenas 2 pacientes relataram uso de broncodilatadores adrenérgicos para tratar dificuldade respiratória. Segundo Smith e colaboradores, o uso de expectorantes tem um discreto efeito na redução da tosse frequente, bem como os antitussígenos. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos adversos que esses fármacos podem causar (SMITH, SCHROEDER e FAHEY, 2014). Quanto aos broncodilatadores adrenérgicos, há poucas evidências que indicam uma ligeira eficácia do tratamento da tosse aguda, e somente em casos de obstrução de vias aéreas (BECKER, HOM, *et al.*, 2015).

Um pequeno número de pacientes relatou uso de tratamentos alternativos, entre eles preparações de alho, chá de ervas não especificadas, e de laranja (devido ao teor de vitamina C). Há evidências limitadas sobre o uso de alho no combate ao resfriado comum que apontam para um leve efeito preventivo (LISSIMAN, BHASALE e COHEN, 2014). Existem indícios de que a ingestão de ácido ascórbico (vitamina C), se iniciada em até 24 horas após início dos sintomas de IRA, pode diminuir a duração e gravidade dos sintomas. O uso de ácido ascórbico é considerado seguro e possui baixo custo (HEMILÄ e CHALKER, 2013). Preparações com plantas do gênero *Echinacea* e também de misturas de ervas chinesas tem sido usadas no combate ao resfriado comum, e parecem apresentar um pequeno efeito preventivo, porém, os riscos não podem ser descartados, visto que essas preparações são muito heterogêneas (CARR e NAHATA, 2006; KARSCH-VÖLK, BARRETT, *et al.*, 2014). Outras alternativas ao tratamento convencional encontradas na literatura são o uso de zinco, com alguns efeitos benéficos, mas ainda em discussão (DAS e SINGH, 2014), e a ingestão de

mel antes de dormir, que parece reduzir a frequência de tosse noturna, entretanto é contraindicado para crianças menores de 1 ano (BALLENGEE e TURNER, 2014).

O tratamento de IRA com antibióticos é bastante questionável, visto que a maioria dos agentes etiológicos são vírus e não bactérias. No entanto, em alguns casos a IRA pode evoluir para uma condição mais grave, como pneumonia e faringoamigdalite aguda bacterianas, potencialmente fatais (BENGUIGUI e STEIN, 2006). O algoritmo para condução de pacientes com IRA da Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a distinção entre ITRS e ITRI para prescrição de antibióticos, sendo recomendada para o segundo caso (NASCIMENTO-CARVALHO, 2006). Em nosso estudo, cerca de 10% dos pacientes relataram o uso de antibióticos para tratar a IRA, e 78,5% (11/14) deles apresentavam tosse frequente e dor de garganta, com ou sem dificuldade respiratória (dado não mostrado). Dados da literatura indicam que o uso de antibióticos pode reduzir a duração dos sintomas de dor de garganta em até 1 dia em pacientes com IRA, e reduz a chance de febre reumática e algumas outras consequências da infecção bacteriana na garganta. Porém, segundo os mesmos dados, a melhora é mais significativa em pacientes com infecção bacteriana confirmada (SPINKS, GLASZIOU e DEL MAR, 2013). A associação de antibióticos à corticoides parece apresentar melhores resultados em tratamento de IRAs bacterianas do que o uso de antibióticos somente (RAHMATI, MOHEBI, *et al.*, 2013). Em infecções virais, os corticoides não possuem eficácia comprovada, e possivelmente podem prolongar o tempo de viabilidade do vírus no organismo do hospedeiro, porém sem implicação clínica comprovada (HAYWARD, THOMPSON, *et al.*, 2015).

Em estudos anteriores com pacientes não hospitalizados no Brasil, uma frequência mais alta de uso de antibióticos foi observada, de cerca de 40%, porém a população desses estudos foi exclusivamente pediátrica (ZHANG, MENDOZA, *et al.*, 2005; KAMIKAWA, GRANATO e BELLEI, 2015). Em um outro estudo com população de faixa etária heterogênea, a frequência de uso de antibióticos para tratamento de gripe/resfriado foi de 14% (BERQUÓ, BARROS, *et al.*, 2004), ficando mais próxima à encontrada em nosso estudo. A maioria dos pacientes que fizeram uso de antibióticos eram crianças com até 10 anos de idade, embora essa tendência tenha sido observada, a diferença entre o uso de antibióticos por grupos de idade não foi estatisticamente significativa ($p=0,057$). Dois dos pacientes pediátricos em uso de antibióticos apresentavam sintomatologia branda de ITRS (resfriado comum). A população infantil representa um alvo significativo no combate ao uso inadequado de antibióticos, pois frequentam ambientes propícios para a transmissão de patógenos infecciosos, como creches e escolas, e uma vez que uma bactéria infectante adquira

resistência a antibióticos, a mesma pode ser transmitida facilmente para outras crianças (CHERIAN, STEINHOFF, *et al.*, 1994). O atendimento feito pelo profissional de especialidade adequada para a situação do paciente pode surtir efeito no combate a prescrição excessiva de antibióticos. No estudo de Nyquist e colaboradores, as crianças que se consultaram com pediatras receberam significativamente menos prescrições de antibióticos para IRA do que as que se consultaram com médicos clínicos gerais ou de outras especialidades (NYQUIST, GONZALES, *et al.*, 1998)

As doenças crônicas podem ser agravantes para complicação de uma IRA, alguns pacientes em uso de antibióticos relataram ser portadores de doenças crônicas, como diabetes, hipertensão, doenças do sistema cardiovascular e pulmonar. No estudo de Muller e colaboradores, os pacientes portadores de diabetes foram mais propensos a serem acometidos por ITRI em relação ao grupo controle (MULLER, GORTER, *et al.*, 2005). Além disso, os portadores de diabetes possuem maior risco de agravamento de uma IRA, possivelmente devido à habilidade reduzida do sistema imune em combater uma infecção (ZHONG, QIN, *et al.*, 2015). As anomalias cardiovasculares subjacentes aumentam o risco de ataques cardíacos, e algumas condições como o quadro de hipertensão e o tabagismo podem ser fatores de risco. As IRAs podem aumentar significativamente o risco de infarto agudo do miocárdio (IAM) em pacientes portadores de doenças cardiovasculares (CLAYTON, THOMPSON e MEADE, 2008). O uso de antibióticos contra IRA não possui benefício comprovado para diminuir esse risco, uma vez que o mecanismo pelo qual uma IRA pode desencadear um IAM é possivelmente mediado pelo processo de inflamação (VU, FARISH, *et al.*, 2002). As doenças pulmonares subjacentes são sem dúvida fatores de risco para complicações graves e potencialmente fatais frente a uma IRA, seja de etiologia viral ou bacteriana (WALSH, FALSEY e HENNESSEY, 1999; MIRAVITLLES, 2002; SAPEY e STOCKLEY, 2006). A co-infecção de VRs e bactérias pode ser um agravante ainda maior (MACDONALD, KORMAN, *et al.*, 2013). O que sugere que a vacinação disponível contra os VRs nesse grupo é altamente recomendada e o uso de antibióticos em caso de IRA com sintomatologia grave é justificável.

Mais da metade dos pacientes em uso de antibióticos (8/14) de nossa população de estudo apresentava ILI, a suspeita de infecção pelo vírus Influenza aumenta o risco de infecções bacterianas secundárias, o que poderia justificar a prescrição de antibióticos em casos particulares, como o de idosos e portadores de doenças pulmonares (SMITH e MCCULLERS, 2014). Porém, os resultados de nosso estudo, em concordância com estudos anteriores (BELLEI, CARRARO, *et al.*, 2008; WATANABE, CARRARO, *et al.*, 2010;

SILVA, MENDES, *et al.*, 2015), mostram que além do Influenza A/B, o HRV também possivelmente causa a sintomatologia de ILI. Apesar de ainda não existir um tratamento efetivo contra o HRV, o diagnóstico desse patógeno evita o tratamento errôneo para outras etiologias de uma IRA. No presente estudo, 2 pacientes positivos para o HRV relataram uso de antibióticos para tratamento da IRA. Vale ressaltar que o uso de antibióticos para tratar uma infecção viral é ineficiente, além disso, o emprego inadequado dos mesmos é a principal causa de resistência microbiana (ROQUE, HERDEIRO, *et al.*, 2014; FREDERICKS, HOLLINGWORTH, *et al.*, 2015).

O diagnóstico causal de uma IRA feito de forma rápida e acessível poderia ajudar a adequar a antibioticoterapia. As técnicas de PCR são específicas e sensíveis, porém uma compilação de dados publicada há uma década mostrou que seu custo é elevado e o método é trabalhoso para a prática rotineira (OOSTERHEERT, VAN LOON, *et al.*, 2005). Mesmo com o surgimento de PCR multiplex, detectando vários patógenos simultaneamente e trazendo resultados mais rápidos, pouco mudou na conduta de prescrição de antibióticos. Talvez porque essas metodologias são muito sensíveis, e a detecção de um VR pode não significar necessariamente que este é o agente causal da IRA, dificultando a decisão dos médicos (KRAUSE, PANNING, *et al.*, 2014). Uma avaliação da implantação de uma plataforma rápida de PCR multiplex para detecção de 11 vírus respiratórios e 3 bactérias em um hospital nos EUA apontou para uma diminuição no tempo de hospitalização e de uso de antibióticos pelos pacientes com testes positivos para VRs entregues em até 4 horas. A rotina de testes era procedida 24 horas por dia e 7 dias por semana para agilizar os resultados que geraram redução de custos para os pacientes e para o hospital. (ROGERS, SHANKAR, *et al.*, 2015). A implantação de tais medidas seria cabível somente a hospitais de grande porte e boas condições financeiras iniciais. Um outro estudo realizado em hospitais da Holanda, avaliando uma plataforma multiplex PCR que gerou resultados a partir de 12 horas, mostrou que não houve mudança significativa no tempo de estadia dos pacientes ou de uso de antibióticos (WISHAUPT, RUSSCHER, *et al.*, 2011). O que indica que a velocidade da entrega de resultados é crucial para a decisão dos médicos no manejo dos pacientes.

Em nosso estudo, não tivemos o propósito de diagnóstico, apenas epidemiológico. Notavelmente, utilizando a metodologia de RT-PCR convencional para apenas um patógeno viral, observamos a alta prevalência do mesmo. Embora a detecção do HRV nas amostras não confirme que este agente é o responsável pela sintomatologia de IRA, é um forte indício, e talvez a melhoria das técnicas moleculares quantitativas e o aprendizado

sobre sua correta interpretação possa trazer essa resposta. Se considerarmos uma hipótese em que todos os pacientes positivos para o HRV estavam realmente infectados pelo vírus (e não apenas colonizados), a detecção desse VR apenas teria esclarecido quase 20 % da etiologia dos casos de IRA do estudo. Essa hipótese reforça a ideia de que a implantação de um painel de PCR de rápida execução para detecção de vários patógenos respiratórios, incluindo bactérias, poderia esclarecer uma parcela muito maior das etiologias de IRA, e, se aplicados para fim de diagnóstico, poderia ajudar a adequar o manejo de pacientes. Todavia, cabe denotar que os pacientes inclusos nesse estudo foram pacientes da comunidade, e a implantação de tal medida poderia ter custo elevado para aplicação nesses casos, sendo mais viável para o manejo de pacientes hospitalizados.

6. CONCLUSÕES

A técnica de RT-PCR para detecção molecular do HRV foi padronizada com êxito e mostrou resultados satisfatórios quando aplicada às amostras clínicas. A prevalência do HRV foi estimada em cerca de 20 % dos casos de IRA de nossa população de estudo, com sintomatologia que variou de resfriado comum a ILI. A detecção do vírus ocorreu em pacientes de todas as idades, ligeiramente mais frequente no grupo de crianças com até 10 anos. O HRV foi detectado durante todo o período de estudo, com pico nos meses de maio e agosto de 2014, época correspondente às estações de outono e inverno no Brasil. O tratamento sintomático de IRA praticado pelos pacientes não se distanciou do que a literatura atual preconiza, apresentando um bom nível de adequação à mesma. Quanto à antibioticoterapia, observou-se alguns casos de uso inadequado da medicação, o que é um fato preocupante principalmente devido à questão de surgimento de resistência bacteriana.

Constatando, este fica sendo o primeiro estudo epidemiológico de HRV em Guarapuava. Considerando a não inclusão até a data desse vírus no sistema de vigilância nacional de infecções respiratórias e a inexistência de outros estudos sobre o mesmo na região, as informações que esse trabalho traz poderão ser úteis para o entendimento inicial da epidemiologia do HRV no município e embasamento para estudos futuros.

7. REFERÊNCIAS

Bibliografia

- ALBUQUERQUE, M. C. M. et al. Novel respiratory virus infections in children, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 806-808, May 2009.
- ALBUQUERQUE, M. C. M.; VARELLA, R. B.; SANTOS, N. Acute Respiratory Infections in Children in Rio de Janeiro and Teresópolis, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 5, p. 249-255, September-October 2012.
- ALMEIDA, M. B. et al. Rhinovirus C and Respiratory Exacerbation in Children With Cystic Fibrosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 996-999, June 2010.
- ALPER, C. M. et al. Prechallenge antibodies moderate disease expression in adults experimentally exposed to rhinovirus strain hanks. **Clinical Infectious Diseases**, 27, n. 1, Julho 1998. 119-128.
- AMINEVA, S. P. et al. Comparison of rhinovirus A infection in human primary epithelial and HeLa cells. **The Journal of General Virology**, 92, n. 11, Novembro 2011. 2549-2557.
- ARDEN, K. E. et al. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 9, p. 1232-1240, September 2006.
- ARDEN, K. E. et al. Molecular characterization and distinguishing features of a novel human rhinovirus (HRV) C, HRVC-QCE, detected in children with fever, cough and wheeze during 2003. **Journal of Clinical Virology**, 47, n. 3, Março 2010. 219-223.
- ARRUDA, E. et al. Comparative susceptibilities of human embryonic fibroblasts and HeLa cells for isolation of human rhinoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, 34, n. 5, Maio 1996. 1277-1279.
- ARRUDA, E. et al. Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn. **Journal of Clinical Microbiology**, 35, n. 11, Novembro 1997. 2864-2868.
- ARRUDA, E. N. et al. Acute Respiratory Viral Infection in Ambulatory Children of Urban Northeast Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 2, p. 252-258, August 1991.
- ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G. Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, 7, n. 5, Outubro 1993. 373-379.
- BALLENGEE, C. R.; TURNER, R. B. Supportive treatment for children with the common cold. **Current Opinion in Pediatrics**, 26, n. 1, Fevereiro 2014. 114-118.
- BARCLAY, W. S. et al. The time course of the humoral immune response to rhinovirus infection. **Epidemiology and Infection**, 103, n. 3, Dezembro 1989. 659-669.

- BECKER, L. A. et al. Beta2-agonists for acute cough or a clinical diagnosis of acute bronchitis. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 3, n. 9, Setembro 2015.
- BECKHAM, J. D. et al. Respiratory viral infections in patients with chronic, obstructive pulmonary disease. **The Journal of Infection**, 50, n. 4, Maio 2005. 322-330.
- BELLA, J.; ROSSMANN, M. G. ICAM-1 receptors and cold viruses. **Pharmaceutica acta Helvetica**, 74, n. 2-3, Março 2000. 291-297.
- BELLEI, N. et al. Acute Respiratory Infection and Influenza-Like Illness Viral Etiologies in Brazilian Adults. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 10, p. 1824-1827, October 2008.
- BELLEI, N. et al. Influenza and Rhinovirus Infections Among Health-care Workers. **Respirology**, v. 12, n. 1, p. 100-103, January 2007.
- BENIGUI, Y.; STEIN, F. Integrated management of childhood illness: an emphasis on the management of infectious diseases. **Seminars in pediatric infectious diseases**, 17, n. 2, Abril 2006. 80-98.
- BENITES, E. C. A. et al. Acute respiratory viral infections in pediatric cancer patients undergoing chemotherapy. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 90, n. 4, p. 370-376, July-August 2014.
- BERQUÓ, L. S. et al. Utilização de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias na comunidade, 38, n. 3, 2004. 358-364.
- BERTINO, J. S. Cost Burden of Viral Respiratory Infections. **American Journal of Medicine**, 112, n. 6A, April 2002. 42S-49S.
- 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, April 2011.
- BLOMQUIST, S. et al. Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. **Journal of Clinical Microbiology**, 40, n. 11, Novembro 2002. 4218-4223.
- BLOMQUIST, S. et al. Virological and serological analysis of rhinovirus infections during the first two years of life in a cohort of children. **Journal of Medical Virology**, 66, n. 2, Fevereiro 2002. 263-268.
- BOCHKOV, Y. A. et al. Molecular modeling, organ culture and reverse genetics for a newly identified human rhinovirus C. **Nature Medicine**, 17, n. 5, Maio 2011. 627-632.
- BOCHKOV, Y. A. et al. Improved molecular typing assay for rhinovirus species A, B, and C. **Journal of Clinical Microbiology**, 57, n. 2, Julho 2014. 2461-2471.
- BOCHKOV, Y. A. et al. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. **Proceedings of the National**

- Academy of Sciences of the United States of America**, 112, n. 7, 28 Abril 2015. 5485-5490.
- BONFIM, C. M. et al. Frequent respiratory pathogens of respiratory tract infections in children attending daycare centers. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 5, p. 439-444, September-October 2011.
- BRICKS, L. F. **How is Fever and Pain Treated in Children with Acute Respiratory Infections?** VI IAPO MANUAL OF PEDIATRIC OTORHINOLARINGOLOGY. [S.l.]: [s.n.]. 2014.
- CAMARA, A. A. et al. Risk factors for wheezing in a subtropical environment: role of respiratory viruses and allergen sensitization. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 551-557, March 2004.
- CARR, R. R.; NAHATA, M. C. Complementary and alternative medicine for upper-respiratory-tract infection in children. **American journal of health-system pharmacy**, 63, n. 1, Janeiro 2006. 33-39.
- CARVALHO, L. M. et al. Prospective surveillance study of acute respiratory infections, influenza-like illness and seasonal influenza vaccine in a cohort of juvenile idiopathic arthritis patients. **Pediatric Rheumatology**, v. 11, n. 10, March 2013.
- CHERIAN, T. et al. A cluster of invasive pneumococcal disease in young children in child care. **JAMA**, 271, n. 9, Março 1994. 695-697.
- CHEW, F. T. et al. Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. **Epidemiology and Infection**, 12, n. 1, Agosto 1998. 121-128.
- CHOI, E. H. et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. **Clinical Infectious Diseases**, 43, n. 5, 1 Setembro 2006. 585-592.
- CLAYTON, T. C.; THOMPSON, M.; MEADE, T. W. Recent respiratory infection and risk of cardiovascular disease: case-control study through a general practice database. **European heart journal**, 29, n. 1, Janeiro 2008. 96-103.
- COSTA, L. F. et al. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 301-306, May 2006.
- COUCH, R. B. Rhinoviruses, eLS, Abril 2006.
- CRUZ, M. J. B. et al. Medication use among children 0-14 years old: population baseline study. **Jornal de Pediatria**, 90, n. 6, 2014. 608-615.
- DAS, R. R.; SINGH, M. Oral zinc for the common cold. **Journal of American Journal Association**, 311, n. 14, Abril 2014. 1140-1441.

- DE 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 316-321, May 2011.
- DE SUTTER, A. I. M. et al. Oral antihistamine-decongestant-analgesic combinations for the common cold (Review). **The Cochrane database of systematic reviews**, 2, Fevereiro 2012.
- DENLINGER, L. C. et al. Lower airway rhinovirus burden and the seasonal risk of asthma exacerbation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 184, n. 9, p. 1007-1114, November 2011.
- DICK, E. C. et al. Aerosol transmission of rhinovirus colds. **The Journal of Infectious Diseases**, 156, n. 3, Setembro 1987. 442-448.
- DUNN, J. J.; MILLER, M. B. Emerging Respiratory Viruses Other than Influenza. **Clinics in Laboratory Medicine**, 34, n. 2, Junho 2014. 409-430.
- ECCLES, R. An explanation for the seasonality of acute upper respiratory tract viral infections. **Acta Otolaryngol**, 122, n. 2, March 2002. 183-191.
- FAUX, C. E. et al. Usefulness of published PCR primers in detecting human rhinovirus infection. **Emerging Infectious Diseases**, 17, n. 2, Fevereiro 2011. 296-298.
- FAWKNER-CORBETT, D. W. et al. The impact of the H1N1 influenza pandemic on clinical presentations and viral epidemiology of acute respiratory infection in preschool children in Brazil. **Pediatrics Infectious Diseases Journal**, v. 31, n. 6, p. 653-655, June 2012.
- FAWKNER-CORBETT, D. W. et al. Rhinovirus-C detection in children presenting with acute respiratory infection to hospital in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. doi: 10.1002/jmv.24300. [Epub ahead of print], June 2015.
- FENDRICK, A. M. et al. The Economic Burden of Non-Influenza-Related Viral Respiratory Tract Infection in the United States. **Archives of Internal Medicine**, 163, n. 4, 24 Fevereiro 2003. 487-494.
- FREDERICKS, I. et al. Consumer knowledge and perceptions about antibiotics and upper respiratory tract infections in a community pharmacy. **International Journal of Clinical Pharmacy**, 37, n. 6, Dezembro 2015. 1213-1221.
- GAMA, R. E. et al. Amplification of rhinovirus specific nucleic acids from clinical samples using the polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, 28, n. 2, Junho 1989. 73-77.
- GARDINASSI, L. G. et al. Seasonality of viral respiratory infections in southeast of Brazil: the influence of temperature and air humidity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 98-108, January 2012.

- GERN, J. E. Rhinovirus and the initiation of asthma. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 9, n. 1, p. 73-78, February 2009.
- GILLIM-ROSS, L.; SUBBARAO, K. Emerging Respiratory Viruses: Challenges and Vaccine Strategies. **Clinical Microbiology Reviews**, 19, n. 4, October 2006. 614-36.
- GONZALES, R. et al. Excessive Antibiotic Use for Acute Respiratory Infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, 33, n. 6, 15 Setembro 2001. 757-762.
- GWALTNEY, J. M. et al. Computed tomographic study of the common cold. **The New England Journal of Medicine**, 330, n. 1, 6 Janeiro 1994. 25-30.
- HARSKAMP, R. E.; VAN GINKEL, M. W. Acute respiratory tract infections: a potential trigger for the acute coronary syndrome. **Annals of Medicine**, 40, n. 2, 2008. 121-128.
- HAYWARD, G. et al. Corticosteroids for the common cold. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 10, Outubro 2015.
- HEMILÄ , H.; CHALKER, E. Vitamin C for preventing and treating the common cold. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 1, Janeiro 2013.
- HENDLEY, J. O.; GWALTNEY, J. J. Mechanisms of transmission of rhinovirus infections. **Epidemiologic Reviews**, 10, 1988. 243-258.
- HYYPÄÄ, T.; AUVINEN, P.; MAARONEN, M. Polymerase chain reaction for human picornaviruses. **Journal of General Virology**, 70, n. 12, Dezembro 1989. 3261-3268.
- ISHIZUKA, S. et al. Effects of rhinovirus infection on the adherence of Streptococcus pneumoniae to cultured human airway epithelial cells. **Journal of Infectious Diseases**, 188, n. 12, 15 Dezembro 2003. 1928-1939.
- JACKSON, D. J. et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 178, n. 7, 1 Outubro 2008. 667-672.
- JACOBS, S. E. et al. Human Rhinoviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 135-162, January 2013.
- JENNINGS, L. C. et al. Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults. **Thorax**, 63, n. 1, Janeiro 2008. 42-48.
- JOHNSTON, S. L. et al. Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms. **Journal of Clinical Microbiology**, 31, n. 1, Janeiro 1993. 111-117.
- KAMIKAWA, J.; GRANATO, C. F. H.; BELLEI, N. Viral aetiology of common colds of outpatient children at primary care level and the use of antibiotics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110, n. 7, Novembro 2015. 884-889.

- KARSCH-VÖLK, M. et al. Echinacea for preventing and treating the common cold. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 2, Fevereiro 2014.
- KELLY, J. T.; BUSSE, W. W. Host immune responses to rhinovirus: mechanisms in asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 122, n. 4, Outubro 2008. 671-682.
- KENNEDY, J. L. et al. Pathogenesis of rhinovirus infection. **Current Opinion in Virology**, 2, n. 3, Junho 2012. 287-293.
- KHETSURIANI, N. et al. Novel human rhinoviruses and exacerbation of asthma in children. **Emerging Infectious Diseases**, 14, n. 11, Novembro 2008. 1793-1796.
- KIM, S. Y. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the common cold. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 9, n. CD006362, September 2015.
- KRAUSE, J. C. et al. The role of multiplex PCR in respiratory tract infections in children. **Deutsches Ärzteblatt international**, 111, n. 38, Setembro 2014. 639-645.
- LA ROSA, G. et al. Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, 49, n. 2, 2013. 124-132.
- LAMSON, D. et al. MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005. **Journal of Infectious Diseases**, 194, n. 10, 15 Novembro 2006. 1398-1402.
- LANDRY, M. L. Rhinoviruses. In: VERSALOVIC, J., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10. ed. Washington DC: [s.n.], 2011. p. 1400-1409.
- LAU, S. K. et al. Human rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species. **Emerging Health Threats Journal**, 3, n. 2, 2010.
- LAU, S. K. P. et al. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. **Journal of Clinical Microbiology**, 45, n. 11, Novembro 2007. 3655-3664.
- LI, S. et al. Acetaminophen (paracetamol) for the common cold in adults. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 7, Julho 2013.
- LIN, J.-Y. et al. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. **Journal of Biomedical Sciences**, 20, n. 103, 20 Novembro 2009.
- LISSIMAN, E.; BHASALE, A. L.; COHEN, M. Garlic for the common cold. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 11, Novembro 2014.
- LOENS, K. et al. Improved detection of rhinoviruses by nucleic acid sequence-based amplification after nucleotide sequence determination of the 5' noncoding regions of

- additional rhinovirus strains. **Journal of Clinical Microbiology**, 41, n. 5, Maio 2003. 1971-1976.
- LU, X. et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 533-539, February 2008.
- MACDONALD, M. et al. Exacerbation phenotyping in chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology**, 18, n. 8, Novembro 2013. 1280-1281.
- MÄKELÄ, M. J. et al. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 539-542, February 1998.
- MARTIN, J. G.; SIDDIQUI, S.; HASSAN, M. Immune responses to viral infections: Relevance for asthma. **Paediatric respiratory reviews**, 7, n. 1, 2006. S125-S127.
- MARTÍNEZ-BAZ, I. et al. Influenza vaccine effectiveness in preventing inpatient and outpatient cases in a season dominated by vaccine-matched influenza B virus. **Human vaccines & immunotherapeutics**, 11, n. 7, 2015. 1626-1633.
- MARTINS JÚNIOR, R. B. et al. Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 716-721, September 2014.
- MCERLEAN, P. et al. Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (HRV C). **PLoS One**, 3, n. 4, 2 Abril 2008. e1847.
- MCINTYRE, C. L.; KNOWLES, N. J.; SIMMONDS, P. Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. **Journal of General Virology**, 94, n. 8, Agosto 2013. 1791-1806.
- MCLEAN, G. R. Developing a vaccine for human rhinoviruses. **Journal of vaccines & immunization**, 2, n. 3, Outubro 2014. 16-20.
- MILLER, E. K. et al. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. **Journal of Infectious Diseases**, 195, n. 6, Março 2007. 773-781.
- MILLER, E. K. et al. Host and viral factors associated with severity of human rhinovirus-associated infant respiratory tract illness. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 4, p. 883-891, April 2011.
- MIRAVITLLES, M. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: when are bacteria important? **The European respiratory journal. Supplement**, 36, Julho 2002. 9s-19s.
- MONTO, A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. **American Journal of**

Medicine, 112, n. 6A, 22 April 2002. 4S-12S.

MOREIRA, L. P. et al. Frequency of human rhinovirus species in outpatient children with acute respiratory infections at primary care level in Brazil. **Pediatrics Infectious Diseases Journal**, v. 30, n. 7, p. 612-614, July 2011.

MORI, J.; CLEWLEY, J. P. Polymerase chain reaction and sequencing for typing rhinovirus. **Journal of Medical Virology**, 44, n. 4, Dezembro 1994. 323-329.

MULLER, L. M. A. J. et al. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clinical Infectious Diseases**, 41, n. 3, Agosto 2005. 281-288.

MYATT, T. A. et al. Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments. **American Journal of Respiratory and Critical care Medicine**, 169, n. 11, 1 Junho 2004. 1187-1190.

NACLERIO, R. M. et al. Kinins are generated during experimental rhinovirus colds. **Journal of Infectious Diseases**, 157, n. 1, Janeiro 1988. 133-142.

NAKAMURA, M. et al. Detection and phylogenetic analysis of human rhinoviruses in Okinawa, Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 63, n. 3, Maio 2010. 221-223.

NASCIMENTO, J. P. et al. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 287-293, July-August 1991.

NASCIMENTO, M. S. et al. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 65, n. 11, p. 1133-1137, 2010.

NASCIMENTO-CARVALHO, C. M. Outpatient antibiotic therapy as a predisposing factor for bacterial resistance: a rational approach to airway infections. **Jornal de Pediatria**, 82, n. 5, Novembro 2006. S146-152.

NASCIMENTO-CARVALHO, C. M. et al. The role of respiratory viral infections among children hospitalized for community-acquired pneumonia in a developing country. **Pediatrics Infectious Diseases Journal**, v. 27, n. 10, p. 939-941, October 2008.

NICHOLSON, K. G. et al. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, population based study of disease burden. **British Medical Association**, 315, n. 7115, 25 Outubro 1997. 1160-1664.

NOKSO-KOIVISTO, J. et al. Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. **Journal of Medical Virology**, 66, n. 3, Março 2002. 417-420.

NYQUIST, A.-C. et al. Antibiotic prescribing for children with colds, upper respiratory tract infections, and bronchitis. **JAMA**, 279, n. 11, Março 1998. 875-877.

- OLIVE, D. M. et al. Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. **Journal of General Virology**, 71, n. 9, Setembro 1990. 2141-2147.
- OLIVER, B. G. et al. Rhinovirus exposure impairs immune responses to bacterial products in human alveolar macrophages. **Thorax**, 63, n. 6, Junho 2008. 519-525.
- OOSTERHEERT, J. J. et al. Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection. **Clinical Infectious Diseases**, 41, n. 10, Novembro 2005. 1438-1444.
- ÖSTERBACK, R. et al. Simultaneous detection and differentiation of human rhino- and enteroviruses in clinical specimens by real-time PCR with locked nucleic Acid probes. **Journal of Clinical Microbiology**, 51, n. 12, Dezembro 2013. 3960-3967.
- PALMENBERG, A. C.; RATHE, J. A.; LIGGETT, S. B. Analysis of Complete Genome Sequences of Human Rhinovirus. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 125, n. 6, June 2010. 1190-1199.
- PALMER, L. A. et al. Effect of influenza-like illness and other wintertime respiratory illnesses on worker productivity: The child and household influenza-illness and employee function (CHIEF) study. **Vaccine**, 28, n. 31, 12 Julho 2010. 5049-5056.
- PAPADOPOULOS, N. G. et al. Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperatures. **Jurnal of Medical Virology**, 58, n. 1, Maio 1999. 100-104.
- PAPADOPOULOS, N. G. et al. Rhinoviruses infect the lower airways. **Journal of Infectious Diseases**, 181, n. 6, Junho 2000. 1875-1884.
- PAPI, A.; CONTOLI, M. Rhinovirus vaccination: the case against. **The European Respiratory Journal**, 37, n. 1, Janeiro 2011. 5-7.
- PAPPAS, D. E. et al. Symptom profile of common colds in school-aged children. **The Pediatric infectious Disease Journal**, 27, n. 1, Janeiro 2008. 8-11.
- PAULINO, R. S. et al. Differential diagnosis of respiratory viruses by using real time RT-PCR methodology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 6, p. 432, November-December 2013.
- PELTOLA, V. et al. Rhinovirus transmission within families with children: incidence of symptomatic and asymptomatic infections. **Journal of Infectious Diseases**, 197, n. 3, Fevereiro 2008. 382-389.
- PICON, P. D. et al. Symptomatic treatment of the common cold with a fixed-dose combination of paracetamol, chlorphenamine and phenylephrine: a randomized, placebo-controlled trial. **BMC infectious diseases**, 13, n. 556, Novembro 2013.

- PITKÄRANTA, A. et al. Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion. **The Journal of Pediatrics**, 133, n. 3, Setembro 1998. 390-394.
- PITREZ, P. M. C. et al. Bronquiolite aguda por rinovírus em lactentes jovens. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 81, n. 5, p. 417-420, September 2005.
- PORTES, S. A. R. et al. Enteroviruses isolated from patients with acute respiratory infections during seven years in Rio de Janeiro (1985-1991). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 6, p. 337-342, November-December 1998.
- PRICE, W. H. THE ISOLATION OF A NEW VIRUS ASSOCIATED WITH RESPIRATORY CLINICAL DISEASE IN HUMANS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 42, n. 12, Dezembro 1956. 892-896.
- PROENÇA-MODERNA, J. L. et al. High rates of detection of respiratory viruses in tonsillar tissues from children with chronic adenotonsillar disease. **PloS One**, v. 7, n. 8, August 2012.
- RABONI, S. M. et al. Laboratory diagnosis, epidemiology, and clinical outcomes of pandemic influenza A and community respiratory viral infections in southern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1287-1293, April 2011.
- RAHMATI, M. B. et al. Fluticasone nasal spray as an adjunct to Amoxicillin for acute sinusitis in children: a randomized controlled trial. **European review for medical and pharmacological sciences**, 17, n. 22, Novembro 2013. 3068-3072.
- RENWICK, N. et al. A recently identified rhinovirus genotype is associated with severe respiratory-tract infection in children in Germany. **Journal of Infectious Diseases**, 196, n. 12, Dezembro 2007. 1754-1760.
- ROELEN, C. A. M. et al. Job satisfaction and short sickness absence due to the common cold. **Work**, 39, n. 3, 2011. 305-313.
- ROGERS, B. B. et al. Impact of a rapid respiratory panel test on patient outcomes. **Archives of pathology & laboratory medicine**, 139, n. 5, Maio 2015. 636-641.
- ROHDE, G. G. Rhinovirus vaccination: the case in favour. **The European Respiratory Journal**, 37, n. 1, Janeiro 2011. 3-4.
- ROQUE, F. et al. Educational interventions to improve prescription and dispensing of antibiotics: a systematic review. **BMC Public Health**, 14, n. 1276, 15 Dezembro 2014.
- SAMUELSON, A. et al. Development and application of a new method for amplification and detection of human rhinovirus RNA. **Journal of Virology Methods**, 71, n. 2, Abril 1998. 197-209.
- SANTOS, J. A. Anti-histamínicos no resfriado comum: uma prescrição igualmente comum.

- Revista Portuguesa de Medicina Geral Familiar**, 28, 2012. 43-48.
- SAPEY, E.; STOCKLEY, R. A. COPD exacerbations. 2: aetiology, 61, n. 3, Março 2006. 250-258.
- SAVOLAINEN, C.; MULDER, M. N.; HOVI, T. Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons. **Virus Research**, 85, n. 1, 23 Abril 2002. 41-46.
- SAVOLAINEN-KOPRA, C. et al. Single treatment with ethanol hand rub is ineffective against human rhinovirus--hand washing with soap and water removes the virus efficiently. **Journal of Medical Virology**, 84, n. 3, Março 2012. 543-547.
- SCOTT II, R. D. **The Direct Medical Costs of Healthcare-Associated Infections in U.S. Hospitals and the Benefits of Prevention**. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta. 2009.
- SELWYN, B. J. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison of findings from several developing countries. Coordinated Data Group of BOSTID Researchers. **Reviews of infectious diseases**, 12, n. 8, Novembro-Dezembro 1990. 870-888.
- SIDOTI, F. et al. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence-based amplification assay with an internal control using molecular beacon probes for selective and sensitive detection of human rhinovirus serotypes. **Molecular Biotechnology**, 50, n. 3, Março 2012. 221-228.
- SILVA, D. R. et al. Respiratory viral infections and effects of meteorological parameters and air pollution in adults with respiratory symptoms admitted to the emergency room. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 8, n. 1, p. 42-52, January 2014.
- 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, n. 41, January 2013.
- SILVA, R. C. et al. Frequency of viral etiology in symptomatic adult upper respiratory tract infections. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 30-35, January-February 2015.
- SMITH, A. M.; MCCULLERS, J. A. Secondary bacterial infections in influenza virus infection pathogenesis. **Current topics in microbiology and immunology**, 385, 2014. 327-356.
- SMITH, S. M.; SCHROEDER, K.; FAHEY, T. Over-the-counter (OTC) medications for acute cough in children and adults in community settings. **Cochrane Database Systematic**

Reviews, 24, n. 11, Novembro 2014.

SOLLET, J.-P. Respiratory tract infections: at-risk patients, who are they? Implications for their management with levofloxacin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2, 28 Setembro 2006. 113-114.

SOUZA, S. F. et al. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. **Pediatrics Pulmonology**, v. 35, n. 3, p. 184-191, March 2003.

SPINKS, A.; GLASZIOU, P. P.; DEL MAR, C. B. Antibiotics for sore troath. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 11, Novembro 2013.

STEININGER, C.; ABERLE, S. W.; POPOW-KRAUPP, T. Early detection of acute rhinovirus infections by a rapid reverse transcription-PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 129-133, January 2001.

TAPPAREL, C. et al. New molecular detection tools adapted to emerging rhinoviruses and enteroviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, 47, n. 6, Junho 2009. 1742-1749.

TEERATAKULPISARN, J. et al. Rhinovirus infection in children hospitalized with acute bronchiolitis and its impact on subsequent wheezing or asthma: a comparison of etiologies. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, 32, n. 3, Setembro 2014. 226-234.

TORGERSEN, H.; SKERN, T.; BLAAS, D. Typing of human rhinoviruses based on sequence variations in the 5' non-coding region. **Journal of General Virology**, 70, n. 11, Novembro 1989. 3111-3116.

TRIANTAFILOU, K. et al. Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by Toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic pro-inflammatory immune response. **Virulence**, 2, n. 1, Janeiro-Fevereiro 2011. 22-29.

TURNER, R. B. et al. A randomized trial of the efficacy of hand disinfection for prevention of rhinovirus infection. **Clinical Infectious Diseases**, 54, n. 10, Maio 2012. 1422-1426.

TURNER, R. B.; HENDLEY, O. Virucidal hand treatments for prevention of rhinovirus infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 56, n. 5, Novembro 2005. 805-807.

TURNER, R. B.; LEE, W. M. Rhinovirus. **Clinical Virology**, 2009. 1063-1082.

VU, T. et al. A meta-analysis of effectiveness of influenza vaccine in persons aged 65 years and over living in the community. **Vaccine**, 20, n. 13-14, Março 2002. 1831-1836.

WALSH, E. E.; FALSEY, R.; HENNESSEY, P. A. Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 160, n. 3, Setembro 1999. 791-795.

WATANABE, A. et al. Rhinovirus species and their clinical presentation among different risk groups of non-hospitalized patients. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 12, p. 2110-2115,

December 2010.

WATANABE, A. S. A. et al. Respiratory virus infections among hospitalized patients with suspected influenza A H1N1 2009 virus during the first pandemic wave in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 220-224, May-June 2011.

WATANABE, A. S. A. et al. Viral etiology among the elderly presenting acute respiratory infection during the influenza season. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 18-21, January-February 2011.

WHO. **The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life.** World Health Organization. Geneva. 2002.

WINTHER, B. et al. Viral-induced rhinitis. **American journal of rhinology**, 12, n. 1, Janeiro-Fevereiro 1998. 17-20.

WINTHER, B. et al. Environmental contamination with rhinovirus and transfer to fingers of healthy individuals by daily life activity. **Journal of Medical Virology**, 79, n. 10, Outubro 2007. 1606-1610.

WISHAUPT, J. O. et al. Clinical impact of RT-PCR for pediatric acute respiratory infections: a controlled clinical trial. **Pediatrics**, 128, n. 5, Novembro 2011. e1113-1120.

WONG, T. et al. Combined and alternating paracetamol and ibuprofen therapy for febrile children. **Evidence-based child health : a Cochrane review journal**, 9, n. 3, September 2014. 675-729.

WRIGHT, P. F. et al. Comparison of results of detection of rhinovirus by PCR and viral culture in human nasal wash specimens from subjects with and without clinical symptoms of respiratory illness. **Journal of Clinical Microbiology**, 45, n. 7, Julho 2007. 2126-2129.

XIANG, Z. et al. Human rhinovirus group C infection in children with lower respiratory tract infection. **Emerging Infectious Diseases**, 14, n. 10, Outubro 2008. 1665-1667.

ZHANG, L. et al. Antibiotic Use in Community-Based Pediatric Outpatients in Southern Region of Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, 51, n. 5, Outubro 2005. 304-309.

ZHONG, Y. et al. Avian influenza virus infection risk in humans with chronic diseases. **Scientific reports**, 5, Março 2015.

Anexo A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem por objetivo investigar o impacto clínico e epidemiológico da infecção por rinovírus humano no município de Guarapuava, PR.

Para a sua participação, deverá autorizar que a amostra clínica coletada para a detecção de rinovírus seja utilizada também para a genotipagem desse vírus e responder um questionário sobre avaliação de aspectos clínicos e demográficos da família. Se concordar em participar, garantimos sigilo das informações e o não aparecimento do seu nome. Sua participação é voluntária, o Sr (a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. O Sr (a.) tem liberdade de participar do estudo ou desistir a qualquer momento. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade ou saúde, isto é, não envolve riscos diretos ao Sr (a.). Os resultados deste estudo serão utilizados e divulgados em eventos científicos, nos quais pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

Pesquisador responsável: Emerson Carraro

Email: emersoncarraro@bol.com.br

Fone: 36298137 Horário: 8:00 às 11:00 e das 13:30 às 17:30.

Eu _____ declaro que estou dispondo-me a conceder esta entrevista, li o termo acima e entendi o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e autorizo voluntariamente a utilização do meu material clínico e/ou de meu dependente _____ nas atividades da pesquisa.

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do responsável

Guarapuava, _____, de _____ de _____.

Anexo B

INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS RESPIRATÓRIAS EM
GUARAPUAVA-PR:

DATA DA COLETA:

Nome do paciente: n°:

Telefone:

Idade (anos):

Comorbidades/Fatores de risco:

Diabetes Hipertensão Tabagismo

Doença pulmonar Cardiopatia

Início dos sintomas (dias):

Febre: Sim Não Medida (temperatura):

Coriza: Sim Não

Tosse: Sim Não

Dor de garganta: Sim Não

Cefaleia: Sim Não

Mialgia: Sim Não

Calafrios: Sim Não

Vacinado (a) contra o Influenza A/B: Sim Não

Uso de Medicamentos: