

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PEDIATRIA

**CONCENTRAÇÕES DE INTERLEUCINA-2 NA  
SECREÇÃO NASOFARÍNGEA DE CRIANÇAS  
ACOMETIDAS DE BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA  
PELO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Aluna: KATIA MARIA GIUGNO

Orientador: Prof. Dr. **Sérgio Menna Barreto**

Co-Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luís Amantéa

“A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre”

## FICHA CATALOGRÁFICA

**G537c**

Giugno, Katia Maria

Concentrações de interleucina-2 na secreção nasofaríngea de crianças acometidas de bronquiolite viral aguda pelo vírus sincicial respiratório. / Katia Maria Giugno; orient. Sérgio Saldanha Menna Barreto; co-orient. Sérgio Luís Amantéa. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

fls. 102

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina: Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria.

1. Interleucina : Bronquiolite Viral 2. Secreção Nasofaríngea : Interleucina-2. 3. Bronquiolite Viral : Vírus Sincicial Respiratório. I. Sérgio Saldanha Menna Barreto. II. Sérgio Luís Amantéa. III. Título.

CDU: 616.233-02-053.2

CDD: 616.23302

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Saldanha Menna Barreto, pela confiança e paciência.

À Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado, por abrir as portas do Laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, e pela participação fundamental na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luís Amantéa, pelo estímulo constante e contribuições preciosas.

Aos Drs.: Helena Müller, Ângela Winck Bagatini, Cláudia Costa e Silva e Luciano Guerra, pela contribuição na colheita de dados.

À Equipe Médica e de Enfermagem da Emergência do Hospital da Criança Santo Antônio, pela acolhida e interesse.

Ao Dr. Sílvio Drebes, por permitir a participação do Centro de Tratamento Intensivo Pediátrico do Hospital Moinhos de Vento neste trabalho.

À Dra. Sônia Valéria Scherer Mastela, pelas colheitas no Bloco Cirúrgico do Hospital da Criança Santo Antônio.

À Equipe de Enfermagem da Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital da Criança Santo Antônio, pelo apoio.

À Secretária Maria Loiva Lino da Silva, pela competente contribuição com o material bibliográfico.

À Sra. Marta da Silva Rainho, pela doação do material para diagnóstico viral,  
*TestPack RSV* da Abbott.

À Dra. Lúcia Pelanda, pela revisão do trabalho e pelas contribuições.

Ao Prof. Dr. Mário Wagner, pela participação na análise dos dados.

À Dra. Soraya Colares pela participação e apoio ao projeto.

## SUMÁRIO

|   |       |
|---|-------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                           | p. 1  |
| <b>1.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO</b> .....       | p. 3  |
| <b>1.1.1 Histórico</b> .....                        | p. 3  |
| <b>1.1.2 Virologia</b> .....                        | p. 4  |
| <b>1.2 EPIDEMIOLOGIA</b> .....                      | p. 6  |
| <b>1.2.1 Frequência</b> .....                       | p. 6  |
| <b>1.2.2 Sazonalidade</b> .....                     | p. 7  |
| <b>1.2.3 Idade</b> .....                            | p. 7  |
| <b>1.2.4 Fatores de risco</b> .....                 | p. 8  |
| <b>1.2.5 Transmissão</b> .....                      | p. 10 |
| <b>1.3 PATOGENIA</b> .....                          | p. 11 |
| <b>1.3.1 Imunidade Mediada por Anticorpos</b> ..... | p. 12 |
| <b>1.3.2 Imunidade Celular</b> .....                | p. 16 |
| <b>1.3.3 Citoquinas</b> .....                       | p. 18 |
| <b>1.4 PATOLOGIA</b> .....                          | p. 21 |
| <b>1.5 QUADRO CLÍNICO</b> .....                     | p. 22 |
| <b>1.6 DIAGNÓSTICO</b> .....                        | p. 25 |
| <b>1.7 TRATAMENTO</b> .....                         | p. 26 |
| <b>1.7.1 Terapias Específicas</b> .....             | p. 27 |

|  |              |
|--|--------------|
| <b>1.7.2 Terapias Inespecíficas</b> .....          | p. 28        |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....                       | p. 31        |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....                           | p. 33        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                 | <b>p. 34</b> |
| <b>4.1 DELINEAMENTO</b> .....                      | p. 34        |
| <b>4.2 CRONOGRAMA</b> .....                        | p. 35        |
| <b>4.3 AMOSTRA</b> .....                           | p. 35        |
| <b>4.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE</b> .....        | p. 36        |
| <b>4.4.1 Casos</b> .....                           | p. 36        |
| 4.4.1.1 <i>Critérios de Inclusão</i> .....         | p. 36        |
| 4.4.1.2 <i>Critérios de Exclusão</i> .....         | p. 37        |
| 4.4.1.3 <i>Amostra de Casos</i> .....              | p. 37        |
| <b>4.4.2 Controles</b> .....                       | p. 38        |
| 4.4.2.1 <i>Critérios de Inclusão</i> .....         | p. 38        |
| 4.4.2.2 <i>Critérios de Exclusão</i> .....         | p. 38        |
| 4.4.2.3 <i>Amostra de Controles</i> .....          | p. 38        |
| <b>4.5 LOGÍSTICA</b> .....                         | p. 39        |
| <b>4.5.1 Casos</b> .....                           | p. 39        |
| <b>4.5.2 Controles</b> .....                       | p. 40        |
| <b>4.6 COLHEITA DA SECREÇÃO NASOFARÍNGEA</b> ..... | p. 41        |
| <b>4.7 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO VIRAL</b> .....   | p. 42        |
| <b>4.7.1 Imunofluorescência indireta</b> .....     | p. 42        |

|   |       |
|---|-------|
| <b>4.7.2 Imunoensaio enzimático</b> .....               | p. 43 |
| <b>4.8 VARIÁVEIS EM ESTUDO</b> .....                    | p. 45 |
| <b>4.8.1 Saturação de Oxigênio da Hemoglobina</b> ..... | p. 45 |
| <b>4.8.2 Escore Clínico</b> .....                       | p. 46 |
| <b>4.8.3 Outras Variáveis Estudadas</b> .....           | p. 48 |
| <b>4.9 INTERLEUCINA-2</b> .....                         | p. 48 |
| <b>4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....                   | p. 52 |
| <b>4.11 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA</b> .....         | p. 52 |
| <b>4.12 PROTEÇÃO AOS DIREITOS HUMANOS</b> .....         | p. 53 |
| <br>  |       |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....                               | p. 55 |
| <b>5.1 IDADE, PESO E SEXO</b> .....                     | p. 55 |
| <b>5.2 SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO DA HEMOGLOBINA</b> .....   | p. 56 |
| <b>5.3 SISTEMA DE ESCORE CLÍNICO MODIFICADO</b> .....   | p. 56 |
| <b>5.4 TEMPO DE USO DE OXIGÊNIO</b> .....               | p. 57 |
| <b>5.5 USO DE VENTILAÇÃO MECÂNICA</b> .....             | p. 58 |
| <b>5.6 TEMPO DE HOSPITALIZAÇÃO</b> .....                | p. 58 |
| <b>5.7 PREVALÊNCIA DO VSR</b> .....                     | p. 59 |
| <b>5.8 INTERLEUCINA-2</b> .....                         | p. 60 |
| <br>  |       |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....                                | p. 62 |
| <br>  |       |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....                               | p. 86 |
| <br>  |       |
| <b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....               | p. 88 |

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| <b>9 ANEXOS</b> ..... | p. 102 |
|-----------------------|--------|



## LISTA DE ABREVIATURAS

AVB - *Acute viral bronchiolitis*

BVA – Bronquiolite viral aguda

CTIP – Centro de tratamento intensivo pediátrico

ELISA – Ensaio imunoenzimático

HCSA – Hospital da Criança Santo Antônio

HMV – Hospital Moinhos de Vento

IL – Interleucina

MCSS – *Modified Clinical Score System*

ng – nanograma

nm -nanômetro

PBS – Solução tampão fosfato salina

RNA – Ácido ribonucléico

RSV – *Respiratory syncytial virus*

SECM- Sistema de Escore Clínico Modificado

UTI –Unidade de tratamento intensivo

VM – Ventilação mecânica

VSR – Vírus sincicial respiratório

VSR-IGVIG – Imunoglobulina humana para o vírus sincicial respiratório

## LISTA DE FIGURAS

|   |       |
|---|-------|
| FIGURA 1 - Sistema de colheita da secreção nasofaríngea.....    | p. 41 |
| FIGURA 2 - Imunofluorescência indireta positiva para o VSR..... | p. 42 |
| FIGURA 3 - Discos de reação do Test Pack RSV .....              | p. 45 |
| FIGURA 4 - Placa de ELISA .....                                 | p. 51 |
| FIGURA 5 - Gráfico de ventilação mecânica .....                 | p. 58 |
| FIGURA 6 - Gráfico com as concentrações de IL-2 .....           | p. 60 |

## LISTA DE TABELAS

|  |              |
|--|--------------|
| <b>TABELA I - Sistema de Escore Clínico .....</b>                      | <b>p. 47</b> |
| <b>TABELA II - Sistema de Escore Clínico Modificado ...</b>            | <b>p. 48</b> |
| <b>TABELA III - Distribuição de idade, peso e sexo .....</b>           | <b>p. 55</b> |
| <b>TABELA IV - Saturação de oxigênio da hemoglobina</b>                | <b>p. 56</b> |
| <b>TABELA V - Sistema de Escore Clínico Modificado-<br/>Resultados</b> | <b>p. 57</b> |
| <b>TABELA VI - Tempo de uso de oxigênio .....</b>                      | <b>p. 57</b> |
| <b>TABELA VII - Tempo de hospitalização .....</b>                      | <b>p. 59</b> |
| <b>TABELA VIII - Prevalência do VSR - HCSA.....</b>                    | <b>p. 59</b> |
| <b>TABELA IX - Prevalência do VSR - HMV .....</b>                      | <b>p. 60</b> |

## RESUMO

**A bronquiolite viral aguda (BVA) é uma doença que acomete as vias aéreas de pequeno calibre durante os primeiros dois anos de vida, com um pico de incidência por volta dos seis meses de idade. O vírus sincicial respiratório (VSR) é considerado o principal agente desta infecção. Existem inúmeras evidências sugerindo que esta doença ocorre por um processo imunomediado.**

**Entre os muitos aspectos que poderiam ser levantados em relação à BVA pelo VSR, decidimos pesquisar sobre o envolvimento das células T do tipo Th1, na fase aguda da doença, medido pelo comportamento da Interleucina-2 (IL-2) na secreção nasofaríngea.**

O objetivo principal de nosso trabalho foi de estudar as concentrações de IL-2 na secreção nasofaríngea de crianças hospitalizadas por BVA causada pelo VSR. Os objetivos secundários foram: comparar as concentrações de IL-2 dos doentes com as de crianças hígdas, de mesma faixa etária, determinar a gravidade da doença na amostra estudada e descrever a prevalência do VSR na população internada por BVA em dois hospitais de Porto Alegre.

Realizamos um estudo descritivo com crianças entre 0 e 24 meses, previamente hígdas, nas primeiras 12 horas de hospitalização por BVA causada pelo VSR. Desenhamos

um estudo de caso-controle aninhado ao estudo principal, visando comparar as concentrações de IL-2 dos casos com as de crianças híidas, de mesma faixa etária. Avaliamos a gravidade da doença por meio dos seguintes parâmetros: medida da saturação de oxigênio da hemoglobina em ar ambiente, por oximetria de pulso, Sistema de Escore Clínico Modificado (SECM), tempo de uso de oxigênio, tempo de hospitalização e uso de ventilação mecânica.

Este estudo foi realizado durante o inverno de 1999, em Porto Alegre. Incluímos em nosso estudo os pacientes internados pela emergência do Hospital da Criança Santo Antônio e no centro de tratamento intensivo do Hospital Moinhos de Vento com diagnóstico de BVA, nos quais foi identificado o VSR na secreção nasofaríngea, por imunofluorescência indireta ou imunoenensaio enzimático. Os controles foram crianças previamente híidas submetidas a procedimentos cirúrgicos eletivos, no Hospital da Criança Santo Antônio. Medimos as concentrações de IL-2 em 62 casos e 31 controles, por meio de ensaio imunoenzimático.

A mediana das concentrações de IL-2 dos casos foi de 86 ng/ml (4,4 – 457,3) e dos controles foi de 30,5 ng/ml (0 - 269,6). A comparação entre as medianas das concentrações de IL-2 dos dois grupos pelo teste de Mann-Whitney mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre casos e controles ( $P= 0,143$ ). A média de idade nos casos foi de 2,97 meses e de 8,3 meses nos controles ( $P = 0,0001$ ). O sexo masculino predominou entre os casos (54,8%) e entre os controles (51,6%). A saturação de oxigênio da hemoglobina na admissão encontrava-se abaixo de 95% em 66,1%. A avaliação da gravidade da doença por meio do SECM mostrou: 43,5% de casos leves, 37,1% moderados e 8,1% graves, sendo que 11,3% apresentaram valores de escore fisiológico. O tempo de uso de oxigênio entre os casos foi de 4,7 dias (DP 3,54). O tempo médio de hospitalização

foi de 4,25 dias (DP 1,76). Ventilação mecânica foi utilizada em 4,8% dos pacientes. A prevalência do VSR na população internada por BVA nos dois hospitais estudados foi de 62,5% e 53,1%.

Concluimos que a IL-2 na secreção nasofaríngea apresentou valores heterogêneos tanto nos pacientes com BVA como nas crianças sem doença respiratória. Não houve associação entre aumento das concentrações de IL-2 e BVA pelo VSR. A avaliação da gravidade na população internada por BVA pelo VSR em dois hospitais de Porto Alegre, por meio do SECM no inverno de 1999, sugeriu um predomínio de quadros de menor gravidade. Entretanto, este não foi o perfil dos pacientes sugerido pelos demais parâmetros de avaliação que utilizamos. O VSR foi o agente predominante entre os pacientes internados por BVA, nos hospitais estudados.

## SUMMARY

Acute viral bronchiolitis (AVB) is a disease that attacks the small airways during the first two years of age, with the highest incidence around six months of age. The respiratory syncytial virus (RSV) is considered as the main etiologic agent of this infection. The mechanisms responsible for the pathological changes in AVB by RSV are not yet clearly understood. There is plenty of evidence suggesting that the disease occurs by an immunomediated process. From among the many aspects that could be raised concerning AVB by RSV, we have chosen to investigate the involvement of T cells (type Th1) in the acute phase of the disease as measured by the behavior of interleukin-2 (IL-2) in the nasopharyngeal secretion.

Our primary aim here was to assess the concentrations of IL-2 in the nasopharyngeal secretion of children that were hospitalized due to AVB caused by RSV. Secondary aims were: to compare IL-2 concentrations in sick individuals with those of healthy individuals in the same age group, determine illness severity in the sample studied, and report the prevalence of RSV in the population that was hospitalized because of AVB in two hospitals in Porto Alegre.

A descriptive study was performed with children previously healthy 0-24 months-old, within 12 hours of hospitalization to assess the concentrations of IL-2. A parallel case-



control study was designed to compare IL-2 concentrations with those of healthy children of the same age group. Severity of illness was assessed through oxygen saturation by pulse oximetry, Modified Clinical Score System, time of oxygen use, hospitalization duration, and use of mechanical ventilation.

The present study was carried out during the winter of 1999 and included patients that were hospitalized through the emergency ward of the Hospital da Criança Santo Antônio and in the intensive care unit of the Hospital Moinhos de Vento with an AVB diagnosis, with RSV detected in the nasopharyngeal secretion by immunofluorescence or immunoenzymatic assay. Controls were children in the same age group that were previously healthy and who underwent elective surgical procedures in the Hospital da Criança Santo Antônio. IL-2 concentrations were measured in 62 patients and 31 controls by immunoenzymatic assay.

The median of IL-2 concentrations was 86 ng/ml (4,4 – 457,3) and 30,5 ng/ml (0 - 269,6) in patients and controls, respectively. Comparison of the median of IL-2 concentrations by the Mann-Whitney test in both groups showed no statistical difference between patients and controls ( $P = 0.143$ ). Mean age among patients was 2.97 months and 8.3 months in controls ( $P = 0.0001$ ). Males comprised 54,8% of the cases and 51,6% of controls. Hemoglobin oxygen saturation at hospital admission was below 95% in 66.1% of patients. Illness severity as measured by the Modified Clinical Score System (MCSS) showed that 43.5% of cases were mild, 37.1% were moderate and 8.1% were severe, and 11.3% showed physiological scores. Time of oxygen use among cases was 4.7 days (SD = 3.54). Hospitalization duration was 4.25 days (SD 1.76). Mechanical ventilation was used in 4.8% of patients. RSV prevalence in the population hospitalized in the two hospital studied was 62.5% and 53.1%.

We concluded that IL-2 in the nasopharyngeal secretion showed a heterogeneous behavior both in patients with AVB and in healthy children. No association was observed between increased IL-2 concentrations and AVB by RSV. Most of the AVB cases by RSV that occurred in two hospitals in Porto Alegre in the winter of 1999 were mild to moderate in severity as measured by the MCSS and more severe when measured through the other parameters. The RSV was the chief etiologic agent of AVB, in the studied patients.

# 1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição do quadro clínico da doença aguda nas vias aéreas inferiores, hoje conhecida como bronquiolite viral aguda (BVA) ocorreu em 1901, no livro escrito por HOLT\* apud WOHL & CHERNICK (1978). A descrição clínica correspondente à BVA, recebeu no texto acima referido, a denominação de bronquite aguda catarral das pequenas vias aéreas. Várias outras denominações foram utilizadas para esta doença. EAGLE & NEWNS\*, em 1940, apud WOHL & CHERNICK (1978), foram os primeiros autores a designar o termo bronquiolite e a sugerir a etiologia viral. A aceitação do termo bronquiolite pelos pediatras só ocorreu no final dos anos 40, início dos anos 50. Vários agentes foram associados à síndrome clínica da BVA. Entre eles estão: Vírus sincicial respiratório (VSR), Adenovírus 7, 3 e 21, Rinovírus, vírus Parainfluenza, menos freqüentemente o vírus da cachumba e o vírus Influenza e, ocasionalmente o Mycoplasma pneumoniae (WOHL & CHERNICK, 1978). O VSR é considerado o principal agente das infecções do trato respiratório inferior em lactentes e crianças pequenas (DARVILLE & YAMAUCHI, 1998; EVERARD & MILNER, 1992; FRANKEL & DERISH, 1999; KIMPEN & HEYMANS, 1993; RUUSKANEN & OGRA, 1993; SHEERAN et al., 1999; SIMOES, 1999).

---

\* Holt LE. The diseases of infancy and childhood. New York: Appleton; 1901.

\* Eagle S, Newns GH. Proliferative mural bronchiolitis. Arch Dis Child 1940;15:219.

A maioria das infecções pelo VSR tem um curso leve. Porém, um número pequeno de crianças infectadas, 0,5 a 2%, desenvolve doença grave necessitando de hospitalização (EVERARD & MILNER, 1992). Os quadros mais graves de BVA pelo VSR acontecem nos lactentes menores (GLEZEN & DENNY, 1973). É estimado que nos Estados Unidos da América, a cada ano, cem mil crianças são hospitalizadas e, cerca de duas mil crianças pequenas morrem, em consequência de infecções pelo VSR (RUUSKANEN & OGRA, 1993). Enquanto nos países desenvolvidos a mortalidade dos pacientes hospitalizados por BVA atinge taxas menores que 1% nas crianças previamente híginas, e 3,5% nas crianças com história prévia de problemas cardíacos ou respiratórios (NAVAS et al., 1992; WANG et al., 1995), há relato de números alarmantes, como 9% de óbitos na Índia (CHERIAN et al., 1990).

Um fator de importância na BVA causada pelo VSR está relacionado à demonstração de que entre 40 a 90% das crianças que apresentaram a doença em fase precoce da vida, subsequentemente desenvolveram episódios de tosse e sibilância, sugestivos de asma brônquica (EVERARD & MILNER, 1992; HUSSELL et al., 1996; KIMPEN, 1996b; McCONNOCHIE & ROGHMANN, 1984; OGRA, 1989; PULLAN & HEY, 1982; SLY & HIBBERT, 1989). Apesar de descrito por um grande número de pesquisadores, este conceito sobre a evolução dos pacientes que precocemente sofreram BVA pelo VSR para quadros de asma brônquica no futuro, foi recentemente questionado por STEIN et al. (1999), embasados no acompanhamento de um grupo de pacientes até os 13 anos de idade.

**Outro aspecto relevante diz respeito ao custo relacionado às infecções causadas pelo VSR, sendo que o Instituto de Medicina dos Estados**

**Unidos da América estima um custo anual de trezentos milhões de dólares (U\$ 300.000.000) em hospitalizações naquele país, em função de infecções por esse vírus (HEILMAN, 1990). Também nos Estados Unidos da América há relato na literatura sobre o crescente número de hospitalizações, nos últimos anos, relacionadas a BVA desencadeada pelo VSR (SHAY et al., 1999).**

O conhecimento sobre as interações do VSR com o hospedeiro humano é muito limitado e o comportamento clínico da BVA causada por este vírus desperta curiosidade sobre vários aspectos intrigantes na relação VSR-hospedeiro. Experimentos recentes e evidências clínicas sugerem que a BVA causada pelo VSR seja uma doença imunomediada (KIMPEN & HEYMANS, 1993).

O pouco entendimento sobre os mecanismos responsáveis pelas alterações encontradas nas vias aéreas dos pacientes portadores de BVA causada pelo VSR, tem dificultado o progresso na abordagem terapêutica específica, que persiste com pouco impacto na evolução dos pacientes.

**A alta prevalência das infecções pelo VSR em lactentes e crianças, e a ausência de entendimento sobre os mecanismos que desencadeiam a patologia na BVA, tornam de grande interesse clínico a pesquisa nessa área.**

## **1.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

### **1.1.1 Histórico**

O vírus sincicial respiratório foi isolado pela primeira vez, em chimpanzés com doença respiratória, em 1955. Na publicação que descreveu o vírus, foi sugerida a associação deste com a doença respiratória apresentada por um funcionário de laboratório, e houve referência a dados sorológicos sugestivos de que outros seres humanos poderiam

ter sido infectados pelo vírus da coriza do chimpanzé, ou por um agente muito semelhante a ele (MORRIS et al., 1956). No ano seguinte, o mesmo vírus foi identificado em dois lactentes com doença respiratória, em Baltimore, nos Estados Unidos da América (CHANOCK et al., 1957). O quadro clínico desses pacientes era muito semelhante ao apresentado pelos chimpanzés, e as características laboratoriais dos vírus isolados eram indistinguíveis daquelas do agente da coriza do chimpanzé.

Na época em que foi isolado dos animais, o vírus foi denominado de “agente da coriza do chimpanzé”. Logo a seguir, foi rebatizado de vírus sincicial respiratório, em função de sua habilidade para induzir à formação de sincício (massa de protoplasma multinucleada produzida pela fusão de células), em cultura de tecidos. Desde a sua descrição original, em 1956 – 1957, o VSR tem sido muito estudado em função de sua alta prevalência e pela importância das infecções no trato respiratório inferior que causa.

### **1.1.2 Virologia**

O VSR é classificado no gênero Pneumovirus, que pertence à família Paramixoviridae. Possui uma cadeia simples de RNA em seu genoma e seu diâmetro é de 150 a 300 nm. Características do VSR incluem o número e a ordem de seus genes e a ausência de atividade de hemaglutinina e neuraminidase (COLLINS et al., 1995). Na capa viral encontram-se várias proteínas, sendo as glicoproteínas F e G, as mais importantes. São proteínas de superfície e as maiores responsáveis pela determinação antigênica do vírus. São estas proteínas do VSR que induzem à formação de anticorpos neutralizantes e protetores. A proteína G é responsável pela ligação do vírus à célula do hospedeiro e a

proteína F é responsável pela penetração do vírus e a formação de sincício (HALL & McCARTHY, 2000).

O VSR é muito sensível às mudanças de temperatura. HAMBLING (1964) demonstrou que apenas 10% dos VSR resistiram após a exposição por 5 minutos a uma temperatura de 55 °C; a 37 °C o vírus permaneceu estável por 1 hora e apenas 10% da infectividade permaneceu após 24h; a 25 °C, 10% da infectividade se manteve presente após 48h e, a 4 °C, 1% da infectividade se manteve, após 7 dias. O VSR também tolera mal os meios ácidos sendo que o pH 7,5 é o ideal para a preservação do mesmo.

Durante muito tempo acreditou-se que o VSR possuía pouca heterogeneidade antigênica. Apesar de evidências de comportamento antigênico diferente, avaliado pela cinética de neutralização usando soro animal, todas as cepas pareciam muito relacionadas entre si e foi acreditado que elas se comportavam epidemiologicamente como um único sorotipo (PRINCE et al., 1985b). Pouco depois, usando imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais, foram analisadas as variações antigênicas e demonstrada a existência de pelo menos dois subtipos distintos de VSR, A e B, inicialmente chamados de 1 e 2. (ANDERSON et al., 1985; HENDRY et al., 1986; MUFSON et al., 1985). Entre os subtipos A e B foram descritas diferenças antigênicas nas proteínas G, F, N, e P (ANDERSON et al., 1985; MUFSON et al., 1985). Foram descritos seis subgrupos no grupo A e três no grupo B (ANDERSON et al., 1991). Embora as cepas A e B possam co-circular numa mesma estação do VSR, o subtipo A é mais prevalente na maioria das epidemias (ANDERSON et al., 1985; HEILMAN, 1990; HENDRY et al., 1986; KNEYBER et al., 1996). Na coorte realizada por WANG et al. (1995), no Canadá, o subgrupo de maior prevalência foi o B. O predomínio das infecções pelo grupo A poderia ser explicado pelos achados que sugerem que o vírus do grupo A induz a maior proteção

contra infecções subseqüentes pelo grupo B, do que o inverso (MUELENAER et al., 1991). Aparentemente o subgrupo A é responsável por quadros mais graves de doença (HALL et al., 1990; TAYLOR et al., 1989). Outros autores, porém, não observaram diferenças quanto à evolução no quadro clínico dos pacientes com infecções pelos diferentes subgrupos do VSR (HENDRY et al., 1986; KNEYBER et al., 1996; WANG et al., 1995), enquanto outros detectaram doença mais grave com o subtipo B (HORNSLETH et al., 1998).

## **1.2 EPIDEMIOLOGIA**

### **1.2.1 Freqüência**

É estimado que o VSR seja responsável por 40 a 50% das hospitalizações por bronquiolite, nos Estados Unidos da América (HEILMAN, 1990). Outros autores relataram 87% de positividade do VSR em crianças hospitalizadas por doença das vias aéreas inferiores (HALL & DOUGLAS, 1975). Um estudo realizado em Washington mostrou 43% de infecções pelo VSR em todas as crianças internadas por BVA (KIM et al., 1973). Os relatos sobre a prevalência do VSR no Brasil são de 53% das hospitalizações por BVA, em Porto Alegre (FISCHER, 1994) e de 38 % em pacientes com infecção viral do trato respiratório, no Rio de Janeiro (SUTMÖLLER et al., 1995).

Permanece ainda obscura a razão pela qual o VSR pode reinfetar os indivíduos, várias vezes, durante a vida. Infecções repetidas pelo vírus são comuns e nenhum grupo etário está protegido (HALL et al., 1991; HENDERSON et al., 1979).

Encontra-se na literatura o relato de que quase todas as crianças são infectadas pelo VSR até o segundo ano de vida (GLEZEN et al., 1986).

### **1.2.2 Sazonalidade**

Evidências de infecções pelo VSR foram encontradas em todas as áreas do mundo estudadas. Em regiões com grandes diferenças climáticas, a infecção pelo VSR parece apresentar características muito semelhantes (BERMAN, 1991; GLEZEN & DENNY, 1973;



PARROT et al., 1973). A infecção pelo VSR apresenta um comportamento sazonal característico de natureza epidêmica, com picos de maior ocorrência durando entre 2 e 4 meses. A sazonalidade varia consideravelmente nas diferentes regiões. Em clima temperado, mediterrâneo e desértico as epidemias são associadas com o inverno. Nos climas tropicais há associação com a estação das chuvas (WEBER et al., 1998). A razão pela qual os picos de infecção pelo vírus ocorrem em situações climáticas distintas, frio e seco e, quente e úmido, não é conhecida.

### **1.2.3 Idade**

O VSR é o único vírus que preferencialmente induz a infecções respiratórias graves nos primeiros meses de vida. A infecção primária pelo VSR ocorre mais frequentemente entre as 6 semanas e os 2 anos de idade. O pico de incidência da BVA é entre os 2 e 6 meses de idade. Infecção pelo VSR é rara antes de 1 mês de vida (GLEZEN et al., 1981; HOLBERG et al., 1991). AVENDAÑO (1991), entretanto, encontrou 28% das crianças abaixo de 1 mês de idade, em sua amostra de pacientes infectados pelo VSR.

No estudo realizado em Houston com acompanhamento de 125 crianças desde o nascimento até 1 ano de idade e, 92 acompanhadas por 24 a 60 meses, foi observado que: a infecção ocorreu em 68,8% das crianças abaixo de 12 meses de idade e em 82,6% até o segundo ano de vida. Virtualmente todas as crianças foram infectadas pelo menos uma vez até 24 meses de idade e cerca de metade delas experimentaram duas infecções. As reinfecções foram geralmente mais leves e, o risco para reinfecção decresceu para 33,3%, no quarto ano de vida e 25% em adultos (GLEZEN et al., 1986, HALL et al., 1991).

### **1.2.4 Fatores de Risco**

Vários fatores de risco têm sido relacionados à doença de vias aéreas inferiores pelo VSR. Entre os fatores de risco já bem definidos estão: lactentes saudáveis menores de 3 meses de idade, pacientes com história de prematuridade, lactentes portadores de doença

pulmonar (displasia bronco-pulmonar, fibrose cística), lactentes portadores de cardiopatias congênitas e imunodeficiências (SIMOES, 1999).

Nos primeiros meses de vida a infecção é mais comum no sexo masculino. Em estudos realizados com pacientes abaixo de 6 meses de idade, nos quais foi estabelecido o diagnóstico de BVA por VSR, os autores verificaram uma incidência da doença de 2,4% em meninos e 1,5% em meninas (GLEZEN et al., 1971; GLEZEN & DENNY, 1973). Estima-se que os meninos desenvolvam uma forma mais grave de doença, em função do predomínio de hospitalizações em pacientes do sexo masculino (HOLBERG et al., 1991; PARROT et al., 1973).

Além do grupo de maior risco para doença pelo VSR citado anteriormente, alguns outros fatores de risco também foram implicados no desenvolvimento de BVA mais grave, entre eles: baixo nível sócio-econômico, poluição por fumo dentro de casa, ambiente com aglomerados, família com história de asma ou atopia e, talvez, infecção pelo subgrupo A (ANDERSON et al., 1988; GLEZEN et al., 1981; HOLBERG et al., 1991; LAING et al., 1982; SIMOES, 1999). No estudo de WANG et al. (1995) o nível sócio-econômico e a frequência à creche não mostraram significância em relação à morbidade.

Embora pouco seja conhecido sobre a epidemiologia do VSR em regiões tropicais e nos países em desenvolvimento, a revisão sobre o material disponível na literatura, realizada por WEBER et al. (1998), mostrou que a distribuição etária é similar à dos países desenvolvidos, sendo que dois terços dos pacientes hospitalizados em consequência de infecções pelo VSR têm menos de 1 ano de idade.

Nos países em desenvolvimento, os fatores de risco não estão definidos, embora os aglomerados, poluição por fumo em casa e desnutrição possam contribuir para o desenvolvimento de formas mais graves da doença (SELWYN, 1990; SIMOES, 1999).

Quanto à desnutrição, entretanto, no levantamento dos dados disponíveis na literatura sobre os países em desenvolvimento, este fator não se mostrou como um risco para infecções mais graves das vias aéreas inferiores, pelo VSR (WEBER et al., 1998).

Os níveis de anticorpos maternos mostraram correlação com a maior proteção contra o VSR, nos primeiros meses de vida. Também foi demonstrado que os lactentes que apresentaram formas mais graves de BVA pelo VSR tinham níveis mais baixos de anticorpos, no soro coletado próximo ao início do quadro (GLEZEN et al., 1981).

Em adultos idosos, o baixo nível de anticorpos também se mostrou um fator de alto risco para o desenvolvimento de doença sintomática pelo VSR (FALSEY & WALSH, 1998).

Aleitamento materno por mais de 1 mês mostrou efeito protetor, especialmente nas crianças de mais baixo nível sócio-econômico (HOLBERG et al., 1991).

### **1.2.5 Transmissão**

O VSR é transmitido por gotículas grandes, contaminação de objetos ou por contato direto com secreções contaminadas. Contato muito próximo parece ser necessário para ocorrer a passagem da infecção de uma pessoa para outra. No estudo realizado por HALL et al. (1980), não houve relato de contaminação entre as pessoas que permaneceram a uma distância superior a 1,8 m das crianças infectadas pelo VSR. A via mais importante de transmissão parece ser a auto-inoculação através dos dedos contaminados com secreção infectada. O vírus pode permanecer de forma viável em aventais de 45 minutos a 6 horas, em luvas de borracha por 1 hora e 30 minutos e na pele por 20 minutos (HALL et al., 1980). Acredita-se que estes tempos de sobrevivência do vírus sejam suficientes para transferi-lo para as pessoas, principalmente para a equipe hospitalar. As mãos transmitem o vírus

para a mucosa nasal ou conjuntiva, de onde ele se dissemina para o trato respiratório superior.

Um paciente infectado pelo VSR pode permanecer eliminando vírus por um período médio de 7 a 10 dias (HALL et al., 1976; WARIS et al., 1992).

O período de incubação é de 2 a 8 dias, usualmente. A infecção atinge o trato respiratório inferior em poucos dias, a partir do início dos sintomas (HALL & McCARTHY, 2000).

### **1.3 PATOGENIA**

A maneira como o VSR desencadeia os achados patológicos da BVA, continua um mistério (HALL & McCARTHY, 2000). As informações existentes sobre a patogenia da BVA pelo VSR são fragmentadas e, os mecanismos da doença não são totalmente entendidos. Estudos em humanos são limitados em função da pouca idade dos pacientes mais comumente acometidos, assim como pela baixa taxa de mortalidade.

Alguns autores sugeriram que a gravidade da BVA nos lactentes pequenos pudesse ser explicada com base em princípios anatômicos, sem o envolvimento de mecanismos imunológicos. A simples exposição a grandes concentrações virais associada ao pequeno calibre das vias aéreas, poderia ser suficiente para determinar a gravidade da doença, neste grupo etário. As vias aéreas dos lactentes pequenos são particularmente vulneráveis a qualquer grau de inflamação e obstrução. Isto se conclui ao considerar que a resistência ao fluxo de ar na via aérea é relacionada inversamente ao cubo do raio desta mesma via aérea. Infecções das vias aéreas pequenas de lactentes resultam, portanto, em maiores alterações fisiológicas do que em crianças maiores e a situação fica agravada ainda mais, em função

dos mecanismos compensatórios estarem menos desenvolvidos nesta etapa precoce da vida (HOGG et al., 1970).

Este enfoque, porém, parece insuficiente para explicar as diferentes alterações e evoluções apresentadas pelas crianças que desenvolvem a BVA pelo VSR.

Na tentativa de chegar ao entendimento da patogenia da BVA causada pelo VSR, a resposta imune a este vírus, tem recebido maior atenção de clínicos e pesquisadores. Uma parte importante das informações sobre a imunologia do VSR tem derivado de experimentos em animais. Inúmeros achados clínicos e experimentos sofisticados em animais, sugerem um efeito chave da resposta imune ao VSR, na patogenia da infecção (KIMPEN & HEYMANS, 1993). Parece haver um delicado balanço entre a imunopatologia e a imunoproteção (RUUSKANEN & OGRA, 1993). Mecanismos de imunidade específica (anticorpos e células T), assim como de imunidade inespecífica (células exterminadoras naturais, monócitos/macrófagos, granulócitos: neutrófilos, basófilos e eosinófilos), fazem parte da imunidade contra o VSR e provavelmente também da patogenia (KIMPEN & HEYMANS, 1993).

### **1.3.1 Imunidade Mediada por Anticorpos**

O primeiro fato na BVA que despertou questionamentos sobre a resposta imune, foi a peculiaridade de acontecer de forma mais grave na época em que os anticorpos maternos recebidos por via placentária estão invariavelmente presentes, e de forma abundante. Outro fato marcante foi a gravidade observada na doença que ocorreu por infecção natural, em lactentes e crianças que tinham altos títulos de anticorpos circulantes, após receberem a vacina com VSR inativado, na década de 60 (FULGINITI et al., 1969). A vacina do VSR inativado provocou o surgimento de anticorpos fixadores de complemento nas crianças

antes soronegativas, e levou a aumentos de 4 vezes ou mais nos títulos de anticorpos em pacientes inicialmente soropositivos. Apesar disto, a exposição natural ao vírus resultou num aumento da incidência da doença, assim como na gravidade do quadro, nos pacientes hospitalizados. A publicação destes dados, trouxe questionamentos sobre o papel dos anticorpos na doença das vias aéreas inferiores pelo VSR (FULGINITI et al., 1969; KIM et al., 1969).

Os primeiros estudos para entender a patogenia da infecção pelo VSR aconteceram a partir do reexame do soro armazenado, de pacientes que haviam recebido a vacina de VSR inativado em formalina, nos anos 60. MURPHY et al. (1986) demonstraram que as crianças vacinadas tinham anticorpos tanto para a glicoproteína de fusão F, como para a glicoproteína de superfície G. A informação principal foi que, embora o título de anticorpos fosse 25 vezes maior que o dos pacientes com mesma idade submetidos a infecções naturais, a resposta à glicoproteína G foi pobre ou ausente nos lactentes menores. O que havia na verdade era um excesso de anticorpos não funcionantes, sem habilidade neutralizante específica. Mais tarde MURPHY & WALSH (1988) demonstraram que esta falta de proteção era associada a anticorpos sem capacidade de neutralização, assim como sem capacidade de inibição da atividade de fusão.

O envolvimento dos níveis séricos de anticorpos na imunidade contra o VSR permaneceu por muito tempo sem entendimento. Enquanto para alguns autores, os níveis de anticorpos séricos não demonstraram valor preditivo do risco de infecção, gravidade da doença ou recuperação (PARROT et al., 1973; TOMS & SCOTT, 1987), outros autores concluíram que os altos níveis de anticorpos maternos estão relacionados com menor número de infecções e com menor gravidade da doença (GLEZEN et al., 1981).

Além da resposta sistêmica com anticorpos, BESREDKA\*, em 1927 apud WALDMAN & GANGULY (1974) já se referia à existência de um sistema imune local residindo na superfície das mucosas. Durante algum tempo acreditou-se que os anticorpos séricos chegavam até as secreções externas e assim acontecia a imunidade mucosa. WALSH & CANNON\*, na década de 30 apud WALDMAN & GANGULY (1974), através de experimento em animais demonstraram que os anticorpos da cavidade nasal eram produzidos localmente. Há na literatura, inúmeros relatos demonstrando a resposta com anticorpos específicos IgM, IgG e IgA, no soro como também nas mucosas, em crianças que sofreram infecção primária ou reinfecções pelo VSR (KAUL et al., 1981; MCINTOSH et al., 1979; MEURMAN et al., 1984; WELLIVER et al., 1980b). Outro achado comum a parte destes autores foi o da presença de maiores títulos de anticorpos na convalescença, naqueles pacientes com 6 meses de idade ou mais quando desenvolveram a doença (KAUL et al., 1981; WELLIVER et al., 1980b). Os dois últimos grupos de pesquisadores citados, igualmente constataram uma resposta com anticorpos mais rápida e mais duradoura na reinfecção, o que poderia explicar a natureza mais leve da doença clínica associada a reinfecção pelo VSR. A capacidade de resposta local com anticorpos, correspondendo às mucosas citadas acima, parece ser importante uma vez que o vírus se dissemina de célula a célula e, em estudos animais, os anticorpos séricos circulantes não preveniram a replicação viral na cavidade nasal (TAYLOR et al., 1984).

Estudos mais recentes definiram melhor a resposta com anticorpos a proteínas específicas do VSR e não conseguiram implicar a imunidade humoral na patogenia da

---

\* Besredka A. Local immunization. Baltimore: Williams and Wilkins; 1927.

\* Walsh TE, Cannon PR. Immunization of the respiratory tract: a comparative study of the antibody content of the respiratory and other tissues following active, passive and regional immunization. J Immunol 1938;35:31-46.

doença pelo VSR, mas mostraram o efeito potencialmente benéfico e protetor dos anticorpos específicos (WALSH et al., 1987).

Embora as infecções graves pelo VSR tipicamente ocorram em crianças com anticorpos para o VSR em seu sangue, vindos da mãe ou de infecções prévias pelo vírus, existem hoje evidências convincentes de que anticorpos contra o VSR podem proteger o paciente das infecções por este vírus. Primeiro, porque pacientes que desenvolveram BVA pelo VSR mostraram possuir níveis mais baixos de anticorpos neutralizantes deste vírus, em relação às crianças que nasceram no mesmo período e não desenvolveram a doença (GLEZEN et al., 1981). Segundo, porque foi demonstrado que soro de animais imunes ao VSR protege os animais receptores da agressão pelo vírus e, o nível de proteção está correlacionado com o título de anticorpos transfundido (PRINCE et al., 1985a). Terceiro, em função das evidências de que imunoglobulina humana para o VSR (VSR-IGIV), protege os lactentes humanos de infecções pelo VSR, demonstrado por dois importantes trabalhos (GROOTHIUS et al., 1993; THE PREVENT STUDY GROUP, 1997).

Quanto aos anticorpos IgE específicos contra o VSR, é sugerido que sejam predominantemente produzidos nas superfícies mucosas (WELLIVER et al., 1985), e que a magnitude dos níveis de resposta com este tipo de anticorpos na fase aguda da BVA pelo VSR, seja um indicador prognóstico para sibilância subsequente (WELLIVER et al., 1986). Em 1980a, WELLIVER et al. também sugeriram que a produção de IgE e a subsequente liberação de mediadores químicos do broncoespasmo, poderiam contribuir na patogenia da doença aguda. E, em 1981, WELLIVER et al. relataram que a formação de IgE e liberação de histamina mostraram-se relacionadas com maior prevalência de sibilância e sugeriram o provável envolvimento de outros mediadores.



Contrariamente ao pensamento vigente há cerca de três décadas e apesar de não haver uma explicação adequada para o fato de a doença ocorrer na presença de anticorpos maternos, é aceito hoje que a imunidade humoral contra o VSR atua protegendo o hospedeiro, mesmo que não seja de uma forma completa.

### **1.3.2 Imunidade Celular**

Durante a década de 60 começou o interesse sobre a imunidade celular mediada, um aspecto da resposta imune anteriormente muito menos compreendido que o sistema de imunoglobulinas. Estudos nesta área resultaram no entendimento do fato que a sensibilização de células seria importante na proteção contra certas infecções (WALDMAN & GANGULY, 1974).

Conforme já comentamos, um possível envolvimento do sistema imune específico, na patogenia da BVA pelo VSR, foi sugerida ao ser comparada a gravidade da evolução clínica dos pacientes que contraíram a infecção após serem vacinados, na década de 60, em comparação com as crianças não vacinadas. Os achados anátomo-patológicos de um paciente que foi ao óbito revelaram broncopneumonia extensa, áreas de atelectasia intercaladas com zonas de enfisema e pneumotórax. Na microscopia foi encontrado infiltrado de células mononucleares e eosinófilos (KIM et al., 1969). Até esta época, todos os raciocínios sobre a gênese da doença incluíam anticorpos não funcionantes ou complexos imunes IgG-VSR, e não o envolvimento da imunidade celular.

Em 1980, McINTOSH & FISHAUT fizeram uma revisão das teorias sobre a imunopatologia da doença das vias aéreas inferiores causada pelo VSR e concluíram que a participação da imunidade celular na resposta do hospedeiro à infecção pelo VSR havia até então sido alvo de investigação limitada e muita especulação.

A demonstração em modelo animal (BANGHAM et al., 1985) das células T citotóxicas, VSR-específicas, tornou evidente que as células T deveriam ser importantes na defesa antiviral. Posteriormente, em modelo animal, as células T citotóxicas foram associadas, tanto com a eliminação do vírus dos pulmões, como com o desenvolvimento da patologia pulmonar (GRAHAM et al., 1991; HUSSEL et al., 1996). A destruição direta das células infectadas, por citólise após reconhecimento, parece envolver a participação de vários tipos de células, incluindo: linfócitos T, linfócitos não T dependentes de anticorpos ou células citotóxicas, células não específicas ou exterminadoras naturais e macrófagos (FISHAUT et al., 1980).

Acredita-se hoje, que a imunidade celular é o mecanismo clássico de defesa contra as infecções virais. O envolvimento da imunidade celular na imunopatogênese da BVA causada pelo VSR continua, entretanto, ainda indefinida. Em humanos, a participação da imunidade celular na gênese da doença, é ainda menos entendida que no modelo animal (BONT et al., 1999).

Os modelos experimentais utilizados pelos pesquisadores têm, com freqüência, avaliado de maneira independente as diferentes células ativadas pelo VSR. Porém, à medida que o conhecimento evolui para o envolvimento das citocinas na resposta inflamatória, torna-se interessante notar que diferentes tipos de células, incluindo células epiteliais, macrófagos e linfócitos T são potenciais orquestradores da cascata imune iniciada com a infecção pelo VSR (KIMPEN, 1996a).

### **1.3.3 Citoquinas**

As citocinas são comunicadoras primárias do sistema imune inespecífico. Citoquina é o termo utilizado para denominar um número rapidamente crescente de

proteínas ou glicoproteínas (mais de 250 até o momento) que servem como mensageiras químicas entre as células (OBERHOLZER et al., 2000).

Inicialmente as citocinas foram descritas amplamente como sendo produzidas ou atuando nas células do sistema imune e sistema hematopoiético, mas hoje é sabido que a participação das citocinas é igualmente importante para outros tipos de células, como as epiteliais. A ação é mediada usualmente por receptores específicos na mesma célula (autócrina) ou de células adjacentes (parácrina). Os efeitos podem ser estimuladores ou inibidores e tipicamente incluem ativação, proliferação ou diferenciação das células alvo, que estão freqüentemente envolvidas com a defesa do hospedeiro e processos de recuperação (BANKS, 2000).

As citocinas inflamatórias são essenciais para o funcionamento ótimo do sistema de defesa e restabelecimento do ser humano. As mesmas citocinas, entretanto, são mediadores potencialmente danosos de reações infecciosas e imuno-inflamatórias. Muitas citocinas induzem à produção de outras citocinas e, algumas aumentam a sua própria produção e secreção. Algumas citocinas também inibem a produção e ou função de outras citocinas (BENDTZEN, 1994).

Vários autores têm concentrado seus esforços na tentativa de esclarecer a participação de diferentes citocinas na patogenia da BVA causada pelo VSR. O modelo animal tem sido a maneira mais utilizada para os estudos, em função das limitações da pesquisa em humanos, que é consequência do grupo etário mais atingido pela doença. As evidências demonstradas pelos pesquisadores sugerem que a gênese da doença está relacionada a um processo de grande complexidade.

Pesquisas em modelo animal têm sugerido a importância das células T na resposta imune ao VSR. Os linfócitos T auxiliares (*T helper*) do tipo Th1 se mostraram importantes na eliminação viral (GRAHAM et al., 1991; HUSSEL et al., 1996).

A medida da resposta ao estímulo com VSR em células do sangue periférico de adultos evidenciou resposta do tipo Th1, expressa pela produção de Interleucina-2 (IL-2) e interferon gama, no estímulo com VSR vivo, e respostas do tipo Th1 e Th2 expressas pela produção de IL-2, Interferon gama, Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-10 (IL-10), no estímulo com VSR inativado (JACKSON & SCOTT, 1996).

Em seres humanos, diferentes citocinas estão sendo pesquisadas tanto no soro como, principalmente, na secreção nasofaríngea.

Relatos das avaliações séricas da resposta imune ao VSR em crianças acometidas de BVA, revelaram resposta do tipo Th2 (RENZI et al., 1997), assim como ausência de resposta tanto Th2 quanto Th1 (BONT et al., 1999). Por outro lado, níveis elevados de Interleucina-8 (IL-8) sérica foram referidos como marcadores de gravidade da doença (BONT et al., 1999).

As publicações disponíveis sobre concentrações de citocinas na secreção nasofaríngea de pacientes com infecções graves das vias aéreas inferiores pelo VSR são recentes.

ABU-HARB et al. (1999), dosando IL-8 na secreção nasofaríngea de lactentes com a doença em questão, constataram níveis mais altos nesses do que nos controles, porém não correlacionaram este achado à gravidade da doença.

SHEERAN et al. (1999) dosaram IL-6, IL-8 e IL-10, na secreção nasal e aspirado traqueal na admissão dos pacientes acometidos de BVA, comparando casos graves que corresponderam a pacientes em ventilação mecânica, casos menos graves e crianças hígdas

como controles. Demonstraram em seus resultados que os níveis de interleucinas eram significativamente maiores nos pacientes doentes, e que as concentrações de IL-8 e IL-10 no aspirado traqueal guardaram uma relação inversa com a gravidade da doença. Concluíram questionando se os achados indicariam que essas citocinas estariam associadas com fatores que limitam a gravidade da doença pelo VSR ou, de maneira alternativa esta correlação inversa entre a concentração de interleucinas e a gravidade da doença, poderia ser apenas indicação de um certo estágio na progressão da cascata inflamatória induzida pelo VSR.

HORNSLETH et al. (1998) publicaram um estudo no qual observaram que altos níveis de IL-6 na secreção nasofaríngea estavam relacionados com doença de menor gravidade.

JOSHI et al. (1998) publicaram um estudo comparando níveis de IL-2 na secreção da nasofaringe e aspirado traqueal de crianças submetidas à ventilação mecânica por BVA causada pelo VSR. Esses autores descreveram haver correlação entre as concentrações de IL-2 na secreção nasofaríngea e no aspirado traqueal, e os mesmos concluíram ser a secreção nasofaríngea, um adequado material para a dosagem e, a IL-2 uma importante interleucina no processo de avaliação da inflamação no trato respiratório.

A IL-2 derivada das células T atinge uma variedade de células para induzir seu crescimento, diferenciação e ativação funcional. Uma das maiores funções desta interleucina é a ativação, crescimento e diferenciação das células T (CURFS et al., 1997). A IL-2 produzida por uma célula T ativada de maneira autócrina, estimula o crescimento e a proliferação de linfócitos T antígeno-específicos, assim como de células B. A subclasse de células T que mais produz IL-2 é a das células CD4+, embora as células CD8+ também possam produzir pequenas quantidades de IL-2. Além do efeito autócrino, a IL-2 induz à

produção de outras citocinas derivadas das células T como o Interferon gama e o Fator de necrose tumoral beta, que resulta em ativação de monócitos, neutrófilos e células exterminadoras naturais. É evidente que desta forma a IL-2 também contribui para a geração e propagação da resposta imune antígeno-específica (CURFS et al., 1997).

A real importância das citocinas no processo de doença, na BVA causada pelo VSR, é um assunto ainda em fase de investigação e com inúmeras perguntas a serem respondidas.

#### **1.4 PATOLOGIA**

Em 1970, AHERNE et al. relataram as alterações patológicas identificadas em lactentes que morreram de BVA, causada pelo VSR. A primeira lesão da BVA é a necrose do epitélio respiratório. Em consequência ocorre infiltrado peribronquiolar por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Ocorre edema submucoso, sem grandes alterações no tecido elástico ou na musculatura lisa.

A destruição do epitélio ciliado leva à dificuldade para manejar as secreções, que estão freqüentemente aumentadas. Estas alterações provocam a formação de tampões de muco e fragmentos celulares, levando a regiões de obstrução total ou parcial das vias aéreas, por um ou mais mecanismos: obstrução valvular permitindo somente a entrada de ar, o que leva a hiperinsuflação; obstrução com completo bloqueio do fluxo aéreo levando a atelectasias; e, mecanismo valvular somente com saída de ar levando a atelectasia rápida (LA VIA et al., 1992).

A regeneração epitelial dos bronquíolos acontece a partir da membrana basal, geralmente em cerca de 3 a 4 dias e, a regeneração dos cílios ocorre após 2 semanas ou mais (AHERNE et al., 1970).

Pneumonia intersticial pode ocorrer, com espessamento dos septos interalveolares causado por edema e infiltração linfocitária. As alterações variam de hiperplasia a descamação, raramente ocorrendo uma destruição grave e difusa do epitélio respiratório. Camadas de epitélio estratificado indiferenciado podem ser vistas. Também pode haver resposta inflamatória brônquica pronunciada que se estende do espaço peribrônquico até as paredes alveolares. Este tipo de lesão é raro quando o agente etiológico é o VSR, ocorrendo mais freqüentemente com o Adenovírus (AHERNE et al., 1970).

### **1.5 QUADRO CLÍNICO**

As manifestações clínicas das infecções pelo VSR variam desde um resfriado até quadros graves de pneumonia e bronquiolite aguda (STEINHORN & GREEN, 1990; SMITH et al., 1991). O envolvimento das pequenas vias aéreas é a característica principal da infecção pelo VSR, sendo a bronquiolite viral aguda a mais importante e distinta síndrome clínica produzida (CHERIAN et al., 1990).

Infecção pelo VSR usualmente inicia pela nasofaringe, manifestando-se com coriza e congestão, freqüentemente associadas a febre. No período subsequente de 2 a 5 dias pode ocorrer progressão da doença levando ao envolvimento do trato respiratório inferior. A intensidade e duração da febre não guardam correlação com a gravidade da doença e, usualmente a febre já desapareceu quando o paciente é levado para cuidados médicos. Tosse é freqüente e costuma ser um sinal predominante, podendo ter comportamento paroxístico e associar-se a vômitos. O envolvimento do trato respiratório inferior fica evidente com o surgimento de disfunção respiratória, aumento da freqüência respiratória e tiragem. Nos pacientes acometidos de BVA, ocorre obstrução das vias aéreas de pequeno calibre, tanto na fase inspiratória como na expiratória. Na ausculta pulmonar encontram-se

estertores crepitantes e sibilos que podem ter intensidade flutuante (HALL & McCARTHY, 2000).

Lactentes no primeiro mês de vida podem apresentar um curso clínico atípico, caracterizado por: febre baixa, irritabilidade, pouco apetite e ocasionalmente apnéia, ao invés dos sintomas respiratórios descritos acima (HALL et al., 1979).

Apnéia pode ser o primeiro sinal de infecção pelo VSR em lactentes pequenos. A incidência de apnéia associada com infecção pelo VSR em lactentes pequenos é estimada em 16 a 20%. Os fatores de risco sugeridos por ANAS et al. (1982), BRUHN et al. (1977) e CHURCH et al. (1984) para apnéia associada ao VSR, incluem baixa idade e prematuridade. No estudo de KNEYBER et al. (1998), entretanto, prematuridade não foi correlacionada com apnéia na BVA causada pelo VSR e, idade abaixo de 2 meses foi o maior fator de risco independente. História de apnéia na admissão hospitalar aumentou o risco de apnéia recorrente e, esta, aumentou significativamente o risco para ventilação mecânica. A etiologia da apnéia permanece desconhecida. CHURCH et al. (1984) e KNEYBER et al. (1998) sugerem a associação da apnéia na BVA pelo VSR à imaturidade do centro respiratório.

Desidratação pode ser encontrada como resultado de má ingestão oral e aumento das perdas insensíveis de líquidos.

Hipoxemia caracterizada por uma saturação arterial de oxigênio entre 85 e 90% é freqüentemente vista, sem evidência de hipercapnia (LA VIA et al., 1992).

O leucograma é usualmente normal, exceto eventual aumento nas formas jovens em consequência de estresse agudo (LA VIA et al., 1992).

O exame radiológico do tórax pode apresentar diferentes alterações, sendo a hiperinsuflação e o infiltrado intersticial os achados mais típicos. As anormalidades,



entretanto, podem ser mínimas e desproporcionais à gravidade da doença (HALL & McCARTHY, 2000).

A permanência hospitalar dos pacientes com BVA varia desde períodos muito breves, como descrito no levantamento realizado por GREEN et al. (1989), em que o tempo médio de hospitalização foi de 3,4 dias, até períodos mais longos, que podem estar relacionados a evoluções mais graves. Segundo dados disponíveis na literatura, cerca de 11% dos lactentes hospitalizados podem necessitar de internação em UTI e até 8% necessitar de intubação e ventilação mecânica por falência respiratória. Encontram-se também descritos na literatura, cursos muito graves, incluindo a evolução para a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (HAMMER et al., 1997).

Várias publicações da literatura tentam sugerir a melhor forma de avaliação dos pacientes com BVA, para predizer a gravidade da evolução clínica. Entre os dados disponíveis na admissão hospitalar, os que foram correlacionados isoladamente com evolução de maior gravidade, por mais de um grupo de pesquisadores, foram: a idade pós-natal, inversamente relacionada com gravidade e, a saturação de oxigênio da hemoglobina, medida por oximetria de pulso (MULHOLLAND et al., 1990; SHAW et al., 1991).

Um grande número de estudos publicados faz referência à utilização de dados agrupados, nas mais diferentes formas de escores, como forma de avaliar a gravidade da doença (BEVER et al., 1995; ENGLUND et al., 1994; HORNSLETH et al., 1998; KLASSEN et al., 1997; RICHTER & SEDDON, 1998; RODRIGUEZ et al., 1997; TAL et al., 1983). Estas tentativas de tornar mais objetiva a avaliação clínica, podem ser facilmente explicadas em função de ser a BVA uma doença obstrutiva, com inúmeros sinais clínicos potencialmente associados à sua gravidade, o que torna muito difícil estabelecer de maneira individualizada, qual variável clínica exerce maior impacto na gravidade da doença.

## **1.6 DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico de BVA pelo VSR é baseado no quadro clínico do paciente e, em testes para identificação viral. O comportamento sazonal do VSR é, usualmente, uma importante chave para o diagnóstico.

Existem no mercado, vários testes rápidos para a detecção de antígeno do VSR em: células epiteliais das secreções nasofaríngeas, lavado bronco-alveolar ou tecido pulmonar. Esses testes são realizados através de imunofluorescência indireta ou imunoensaio enzimático. A identificação do vírus vivo pode ser feita através de culturas em células (SIMOES, 1999).

### 1.7 TRATAMENTO

**A abordagem terapêutica da BVA causada pelo VSR varia marcadamente entre diferentes países assim como entre hospitais de um mesmo país. Essas variações vão desde o tipo de terapêutica empregada até os critérios para a internação e permanência em hospitais. Vários trabalhos importantes foram realizados e conseguiram demonstrar estas diferenças. WANG et al. (1996) realizaram no Canadá, um estudo acompanhando 1516 pacientes com BVA causada pelo VSR em 9 hospitais terciários. Os autores relataram diferenças entre os hospitais analisados, quanto a: tipo de paciente admitido, tipo de intervenções e tempo de permanência hospitalar, que variou de 8,6 a 11,8 dias nos pacientes com problemas prévios de saúde e de 4,6 a 6,7 nos pacientes previamente hígidos. BEHRENDT et al. (1998) analisaram as internações de 1563 pacientes, de 41 hospitais, situados em 7 países da Europa, Estados Unidos e Austrália, e igualmente**

**verificaram grandes diferenças na abordagem terapêutica, sendo que o tempo de hospitalização variou de 4 a 9 dias. KIMPEN & SCHAAD (1997) através de um questionário enviado aos membros da Sociedade Européia de Doenças Infecciosas Pediátricas, igualmente constataram a grande controvérsia e inconsistência nos tratamentos utilizados em diferentes serviços. A publicação de BRAND & VAESSEN-VERBERNE (2000), baseada num questionário enviado aos serviços de pediatria de 110 hospitais, na Holanda, igualmente revela atitudes terapêuticas muito variadas dos profissionais, diante de pacientes com BVA.**

Além dos cuidados gerais a serem instituídos, as estratégias de tratamento da BVA causada pelo VSR podem ser enfocadas de duas maneiras: terapias específicas que visam atuar sobre o vírus, e medidas inespecíficas, ou seja, terapias comuns a outras situações clínicas.

### **1.7.1 Terapias Específicas**

São representadas pela ribavirina e a imunoglobulina com altos títulos de VSR.

A ribavirina é uma droga antiviral com poder virustático. O entusiasmo inicial com o uso de ribavirina deveu-se a algumas informações muito importantes sobre a melhora de lactentes com quadros graves de doença pelo VSR (SMITH et al., 1991). Entretanto, posteriormente surgiu grande controvérsia sobre as publicações que relataram a sua eficácia e, isto fez com que o uso desta droga não ficasse definitivamente estabelecido (FRANKEL & DENISH, 1999; LAW et al., 1997). Outro fator que se somou dificultando o uso da ribavirina foi o seu alto custo (WANG et al., 1996).

A imunoglobulina com altos títulos de VSR que se mostrou efetiva na prevenção da doença (GROOTHUIS et al., 1993), no tratamento das crianças com BVA causada pelo VSR e que eram previamente hígidas, demonstrou ser uma droga segura, mas não efetiva. No grupo estudado por RODRIGUEZ et al. (1997) não houve mudança no tempo de hospitalização e permanência em UTI com o uso de imunoglobulina VSR-específica.

### **1.7.2 Terapias Inespecíficas**

São representadas pelo oxigênio, broncodilatadores e corticosteróides.

Desde o relato de REYNOLDS (1963) sobre o benefício para os pacientes com BVA através do uso de oxigênio, este tem se mantido como a terapêutica fundamental da doença. Evidentemente, o progresso na área do tratamento intensivo, nos últimos 30 anos, serviu para melhorar o atendimento a estes pacientes.

A abordagem da insuficiência respiratória utilizando monitorização eletrônica, vem permitindo intervenção mais segura e precoce, assim como a abordagem terapêutica tem incluído equipamentos e técnicas a cada dia mais sofisticados (FRANKEL & DERISH, 1999), já havendo relatos inclusive do uso de oxigenação de membrana extracorpórea (STEINHORN & GREEN, 1990). O uso de mistura gasosa de hélio e oxigênio (Heliox) também foi relatado como tendo evitado intubação e ventilação mecânica em apenas um paciente (PARET et al., 1996), e mais tarde foi demonstrado que esta mistura gasosa melhorou as condições gerais respiratórias de pacientes com disfunção respiratória leve a moderada, desencadeada por BVA pelo VSR (HOLLMAN et al., 1998). As novas modalidades terapêuticas visando a adequada oxigenação, já citadas, assim como o uso de óxido nítrico e de surfactante, são de eficácia ainda questionada (FRANKEL & DERISH, 1999). Provavelmente será necessário um longo tempo para concluir sobre a eficácia das novas modalidades terapêuticas para a BVA citadas acima, pois elas deverão permanecer com indicação de uso muito restrito, direcionado ao pequeno número de pacientes que não respondem às medidas usuais.

O largo uso de broncodilatadores na BVA tem sido inspirado na grande semelhança entre os quadros clínico e radiológico desta doença, com os encontrados nos pacientes em

crise de asma brônquica. Seu uso, entretanto é cercado por controvérsias. KELLNER et al. (1996) realizaram uma meta-análise de 15 trabalhos selecionados e concluíram que o uso de broncodilatadores produziu melhora do escore clínico por curto tempo, em pacientes com BVA leve a moderada, porém não reduziu o tempo de hospitalização.

Em 1993, SANCHEZ et al. publicaram um estudo que demonstrou que nebulizações com epinefrina racêmica em função de seu efeito alfa e beta agonistas, foram mais efetivas que as nebulizações com droga beta agonista, representada pelo salbutamol, na diminuição da frequência respiratória e melhora do escore clínico em lactentes com BVA. O estudo de MENON et al. (1995), igualmente encontrou melhor resposta com epinefrina levando à melhora na oxigenação, medida por oximetria de pulso, assim como diminuição no percentual de internações em relação ao grupo que usou salbutamol. Entretanto, na meta-análise de KELLNER et al. (1996), os resultados com o uso de droga beta agonista foram semelhantes aos encontrados, com o uso de droga de efeito alfa e beta agonistas.

Pouco existe na literatura sobre o uso de broncodilatadores em pacientes com insuficiência respiratória. Um dos estudos disponíveis, concluiu que nebulizações com beta adrenérgico produzem uma melhora na função das pequenas vias aéreas para muitos pacientes, mas não para todos (DERISH et al., 1998). HAMMER et al. (1995) estudando lactentes em insuficiência respiratória por BVA concluiu que o uso de droga beta agonista por via inalatória tem valor limitado e deve ser descontinuado se não for observado benefício.

Até o momento não há material disponível na literatura demonstrando se o uso de broncodilatadores na BVA teria algum benefício no curso da doença grave a mais longo prazo, interferindo nos parâmetros utilizados na ventilação mecânica ou no tempo de utilização desta modalidade de suporte terapêutico (FRANKEL & DERISH, 1999).

Os corticosteróides têm sido alvo de grande controvérsia no tratamento da BVA. Embora seu uso possa parecer lógico em função do que já abordamos sobre a participação de mediadores inflamatórios na patogenia da doença, não há, na literatura, evidência de que seu uso possa ser de benefício para os pacientes (DE BOECK et al., 1997; KLASSEN, 1997; ROOSEVELT et al., 1996).

Fica evidente ao discutir-se o tratamento da BVA causada pelo VSR, que há muito pouco a ser oferecido aos pacientes que desenvolvem esta doença, estando a escassez de recursos terapêuticos, em grande parte associada à ausência de entendimento sobre a patogenia da doença.

## 2 JUSTIFICATIVA

No exercício da clínica temos vivido, ano a ano, as dificuldades que envolvem a assistência médico-hospitalar aos pacientes com BVA causada pelo VSR, tanto na fase aguda da doença quanto no acompanhamento dos pacientes que desenvolvem doença pulmonar crônica.

Pouco progresso tem sido registrado no tratamento desta doença, que como discutimos anteriormente, tem alta prevalência na população pediátrica. A melhora no suporte aos pacientes acometidos de BVA causada pelo VSR vem ocorrendo em função dos progressos da medicina como um todo, e não em consequência de progressos específicos.

Chama a atenção o fato de não haver, até o momento, uma clara definição sobre a patogenia de uma doença descrita há um século. Esta falta de entendimento, seguramente, tem dificultado a possibilidade de avanços terapêuticos.

Embora muito venha sendo questionado e pesquisado sobre o envolvimento do sistema imune na evolução dos pacientes com BVA, pouco existe de conclusivo. Diferentes mediadores inflamatórios têm sido utilizados como forma de avaliação do sistema imune, visando o entendimento da correlação entre a BVA e a resposta imunomediada. Os resultados divergentes disponíveis na literatura médica determinam que o processo de pesquisa continue, na tentativa de no futuro podermos chegar ao entendimento desta questão.

Motivados pela importância do assunto para a população pediátrica, decidimos pesquisar sobre um dos muitos aspectos que poderiam ser levantados em relação à BVA pelo VSR, ou seja, o envolvimento das células T do tipo Th1 na fase aguda da doença, medido pela produção da IL-2 na secreção nasofaríngea.



## 3 OBJETIVOS

### 3.1 PRINCIPAL

Estudar as concentrações da IL-2 na secreção nasofaríngea de crianças entre zero e vinte e quatro meses, acometidas de bronquiolite viral aguda pelo vírus sincicial respiratório, nas primeiras 12 horas de hospitalização.

### 3.2 SECUNDÁRIOS

3.2.1 Comparar as concentrações da IL-2 na BVA pelo VSR com as de crianças da mesma faixa etária e sem doença respiratória.

3.2.2 Determinar a gravidade da BVA pelo VSR na amostra estudada.

3.2.3 Descrever a prevalência do VSR na população internada por BVA, em dois hospitais de Porto Alegre.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado durante o pico sazonal do VSR, no inverno de 1999, com pacientes admitidos para internação no Hospital da Criança Santo Antônio, através do setor de emergência, e pacientes internados no Centro de Tratamento Intensivo Pediátrico do Hospital Moinhos de Vento, em Porto Alegre.

As dosagens laboratoriais por ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizadas no Laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Os testes com imunofluorescência seguiram a rotina de ambos os hospitais.

### **4.1 DELINEAMENTO**

Para estudar as concentrações de IL-2, foi projetado um delineamento descritivo no qual o fator em estudo foi a BVA pelo VSR e o desfecho foi a presença de Interleucina-2 na secreção nasofaríngea.

Para atender ao objetivo de comparar as concentrações de IL-2 entre os doentes e as crianças sem doença respiratória, planejou-se um estudo de caso-controle aninhado ao estudo principal.

As outras variáveis estudadas de forma descritiva foram: saturação de oxigênio da hemoglobina em ar ambiente na admissão, escore clínico de gravidade na admissão, tempo de uso de oxigênio, tempo de internação, uso de ventilação mecânica, e a prevalência do VSR.

O sexo, a idade e o peso foram estudados para caracterizar a amostra.

## **4.2 CRONOGRAMA**

A colheita dos casos iniciou no dia 18 de junho e terminou no dia 27 de agosto de 1999. A decisão sobre o encerramento da colheita aconteceu após o período de 2 semanas sem que ocorressem admissões de pacientes com a doença em estudo, caracterizando o final do pico da epidemia sazonal do VSR.

Em 01 de setembro foi iniciada a colheita dos controles que se encerrou em 20 de dezembro de 1999.

## **4.3 AMOSTRA**

A amostragem foi seqüencial. Os dados foram colhidos nos sete dias da semana, nas primeiras doze horas de hospitalização dos pacientes.

Foram selecionados para o estudo, os pacientes admitidos por BVA em dois hospitais de Porto Alegre: Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) e Hospital Moinhos de Vento (HMV). Os dois hospitais citados apresentam características diferentes na prestação da assistência aos pacientes pediátricos.

O HCSA é um hospital pediátrico, que presta assistência predominantemente a pacientes do Sistema Único de Saúde e em menor proporção, a pacientes de convênios e privados. Todas as admissões hospitalares ocorrem através do serviço de emergência e, a partir de lá os pacientes são direcionados para os diferentes setores de internação. Os pacientes com instabilidade clínica evidente são encaminhados diretamente para a unidade de tratamento intensivo (UTI), enquanto os portadores de quadros menos graves são mantidos na sala de observação da emergência, de onde são posteriormente encaminhados para as unidades gerais de internação ou para a UTI, conforme a evolução clínica nas primeiras horas.

O HMV é um hospital geral que presta assistência a pacientes de convênios e privados, de todas as faixas etárias. A dinâmica de funcionamento do setor de emergência pediátrica do HMV é diferente da descrita acima. No HMV, a unidade de emergência presta atendimento a pacientes externos, e realiza o primeiro atendimento aos pacientes que devem hospitalizar, encaminhando-os a seguir para os setores de internação do hospital. As crianças que necessitam observação e/ou cuidados intermediários são encaminhadas ao centro de tratamento intensivo pediátrico (CTIP). Somente após estabilização do quadro, os pacientes são transferidos para as unidades de internação, não havendo um setor de internação exclusivamente pediátrico, além do CTIP. A maior parte das internações no CTIP, entretanto, ocorre de forma direta, a partir da solicitação de vaga feita por médicos de outras instituições, sem que haja a participação do setor de emergência do hospital.

Os dados da amostra foram obtidos por um grupo de pesquisadores composto por 2 médicos intensivistas e 3 médicos residentes de terceiro ano em tratamento intensivo pediátrico. Exclusivamente envolvido com os controles, esteve um médico anestesista da equipe do bloco cirúrgico do HCSA.

#### **4.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE**

##### **4.4.1 Casos**

###### *4.4.1.1 Critérios de Inclusão*

Foram incluídos no grupo de casos, os pacientes com idade entre zero e vinte e quatro meses, hospitalizados pela emergência do HCSA e no CTIP do HMV, com diagnóstico de BVA. Incluíram-se: pacientes previamente hígidos, que desenvolveram pródromos com coriza e/ou obstrução nasal nos últimos dias que antecederam a internação e que necessitaram hospitalização com pelo menos dois dos seguintes sinais: disfunção respiratória, taquipnéia, sibilos ou estertores crepitantes (DE BOECK et al.,

1997), e nos quais a presença do VSR foi detectada na secreção nasofaríngea por imunofluorescência indireta ou imunoensaio enzimático.

#### *4.4.1.2 Critérios de Exclusão*

Foi estabelecida como critério de exclusão para o grupo de casos, a história pregressa de condições clínicas que pudessem atuar como variáveis de confusão para o diagnóstico da doença em estudo. As seguintes situações foram consideradas: doença respiratória perinatal, uso prévio de ventilação mecânica, episódio anterior de sibilância, uso atual ou prévio de broncodilatadores e/ou corticosteróides, presença de cardiopatia congênita e refluxo gastro-esofágico em tratamento ou história sugestiva dessa doença.

#### *4.4.1.3. Amostra de Casos*

No período do estudo, 96 pacientes internados pelo setor de emergência do HCSA preenchiam critérios para o diagnóstico clínico de BVA. Destes pacientes, 51 (53.1%) tiveram resultado positivo da pesquisa do VSR na secreção nasofaríngea. Em função da exclusão de 2 pacientes que recebiam corticosteróides no momento da internação, foram 49 os pacientes desse hospital, incluídos em nosso estudo.

Durante o período do estudo, o número de admissões por diagnóstico clínico de BVA no CTIP do HVM foi de 24 pacientes. Desses doentes, 15 (62,5%) tiveram resultado positivo da pesquisa do VSR na secreção nasofaríngea. Ocorreram 2 perdas, passando 13 pacientes a compor a nossa amostra.

A soma dos 49 pacientes do HCSA com os 13 pacientes do HVM, totalizou os 62 casos que compuseram nossa amostra.

### **4.4.2 Controles**

#### *4.4.2.1 Critérios de Inclusão*

Incluimos no grupo de controles as crianças de zero a vinte e quatro meses de idade, previamente hígdas, que foram submetidas a cirurgias eletivas no bloco cirúrgico do HCSA.

#### *4.4.2.2 Critérios de Exclusão*

A preocupação ao definirmos os critérios de exclusão para este grupo, era a de evitar condições clínicas que pudessem induzir de alguma forma à resposta imune local, nas vias aéreas superiores, e com isso causar um viés em nossos resultados, favorecendo a hipótese de nulidade.

Foram considerados critérios de exclusão nesse grupo: história de doença aguda nas vias aéreas superiores nas últimas duas semanas, história pregressa de hiper-reatividade das vias aéreas superiores ou inferiores e realização de procedimento cirúrgico nas vias aéreas superiores.

#### *4.4.2.3 Amostra de Controles*

A amostra de controles foi composta por 31 crianças.

### **4.5 LOGÍSTICA**

#### **4.5.1 Casos**

**O grupo de pesquisadores mantinha contato com as unidades hospitalares envolvidas no projeto em três momentos do dia, na tentativa de acompanhar a admissão de pacientes elegíveis para o estudo. Assim que identificado um paciente com potencial para compor a amostra de casos, um dos membros do grupo da colheita dos dados se deslocava para o local a fim de efetuar a**

**colheita das informações da história e do exame físico, assim como para a obtenção do aspirado nasofaríngeo. A tarefa de colheita de dados encerrava-se às 22 horas e reiniciava às 7 horas e 30 minutos do dia seguinte, permitindo desta forma que todos os pacientes fossem avaliados nas primeiras doze horas da internação.**

**Ao chegar, o pesquisador esclarecia o familiar responsável pelo paciente sobre a pesquisa e obtinha o consentimento. A partir de então, era preenchida a ficha com dados de história do paciente e realizado o exame físico que incluía oximetria de pulso.**

**A ficha de história e avaliação clínica continha mais dados do que os previstos no projeto desta pesquisa, em função de um acordo estabelecido com um grupo de profissionais interessado em avaliar outros aspectos da doença estudada, e que passou a trabalhar em colaboração conosco. O mesmo grupo de pesquisadores citado anteriormente foi mantido na atividade de colheita dos dados,. A utilização de fichas individualizadas para cada projeto tornaria inviável esta colheita de dados em colaboração. Concluimos que os dados excedentes não representariam um problema para nós e, que a colaboração entre dois grupos com interesses comuns seria especialmente interessante, em se tratando de uma doença de comportamento sazonal.**

Os prontuários de todos os pacientes foram revisados após a alta hospitalar para obtenção dos dados das variáveis em estudo que envolviam a evolução hospitalar.

#### **4.5.2 Controles**

A seleção dos controles era executada de duas formas. A primeira, diretamente por um dos anestesistas da equipe do bloco cirúrgico do HCSA que conhecedor dos critérios de inclusão e exclusão do estudo, definia os pacientes dos quais deveria ser conservada a secreção nasofaríngea obtida durante a aspiração das vias aéreas superiores, por ocasião do procedimento anestésico. A segunda forma de seleção de controles era em pacientes transferidos diretamente do bloco cirúrgico para cuidados pós-operatórios na UTI, dos quais não havia sido coletada secreção nasofaríngea no bloco cirúrgico. Esta situação ocorreu algumas vezes, em função da participação de apenas um anestesista do grupo do referido hospital neste projeto. O médico anestesista que participou do projeto exercia suas atividades durante o dia, período em que ocorria a maioria das cirurgias em pacientes elegíveis para o nosso grupo controle.

Nos pacientes incluídos no grupo controle quando já se encontravam na UTI, os dados de história e a colheita do material da nasofaringe eram realizados pelos membros do grupo da pesquisa. Após a decisão de inclusão do paciente no grupo controle, efetuava-se o registro dos seguintes dados: idade, peso, sexo e tipo de cirurgia realizada.

#### **4.6 COLHEITA DA SECREÇÃO NASOFARÍNGEA**

Para a colheita da secreção nasofaríngea, os pacientes eram mantidos em posição supina. Uma sonda de aspiração estéril, de número 6 ou 8, conforme o tamanho do paciente, era introduzida gentilmente uma vez em cada narina, realizando sucção suave. A pressão utilizada para a aspiração das vias aéreas variava entre 50 e 100 mmHg (HATFIELD & RAUSCHUBER, 1984). Não era instilada solução salina antes da aspiração. Entre a sonda de aspiração e o tubo conectado ao sistema de vácuo, era



adaptada uma seringa estéril de 3ml, sem êmbolo, que funcionava como sistema coletor para o material (Figura 1).

A técnica de colheita da secreção nasofaríngea era a mesma para casos e controles.

### **Figura 1 - Sistema para colheita da secreção nasofaríngea**

A secreção obtida dos pacientes portadores da doença era armazenada em dois frascos, um encaminhado para a identificação viral seguindo a rotina dos hospitais incluídos no estudo, e o outro com 0,5ml de material, era congelado imediatamente e após mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior dosagem da IL-2.

A secreção obtida dos controles era congelada e da mesma forma que com os casos, era mantida a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem da IL-2.

## **4.7 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO VIRAL**

### **4.7.1 Imunofluorescência Indireta**

Esta técnica de identificação do antígeno do VSR era a forma utilizada para o diagnóstico etiológico viral na secreção nasofaríngea em ambos os hospitais incluídos no estudo. Não houve participação do grupo da pesquisa no encaminhamento do material assim como na realização da técnica laboratorial, uma vez que tal procedimento fazia parte da rotina assistencial determinada para os pacientes com diagnóstico de BVA.

**Figura 2 - Teste de imunofluorescência indireta positivo para VSR.**

O método de imunofluorescência indireta é realizado com a utilização de anticorpos monoclonais (Figura 2), sendo o método de escolha para o diagnóstico viral em nosso meio, por permitir o rápido diagnóstico diferencial com outros vírus e por apresentar uma sensibilidade e especificidade entre 57 a 90% ou mais (HALL & MCCARTHY, 2000).

#### **4.7.2 Imunoensaio Enzimático**

Durante o andamento do projeto, ocorreram problemas na rotina de identificação viral por imunofluorescência indireta nos pacientes do HCSA. A partir deste momento estabelecemos uma nova estratégia, passando a congelar e conservar a  $-80^{\circ}\text{C}$  também a amostra de secreção nasofaríngea destinada para o diagnóstico viral que seria feito posteriormente. Considerando que o congelamento do material inviabilizaria a realização

da imunofluorescência com os *kits* disponíveis no mercado, decidimos pela incorporação da técnica de imunoensaio enzimático à pesquisa, visando a identificação viral.

Utilizamos o Abbott *TestPack RSV* que é um imunoensaio enzimático para a detecção rápida do VSR em secreções de nasofaringe.

O Abbott *TestPack RSV* utiliza um imunoensaio enzimático de fase sólida para detectar o antígeno viral presente nas amostras nasofaríngeas colhidas por aspiração, lavado ou *swab*. O teste é realizado num disco de reação que contém vírus sincicial respiratório inativado.

Os testes na secreção nasofaríngea obtida dos casos eram executados da seguinte forma:

O tampão de tratamento da amostra (Ditiotretol 16 mg/ml) era adicionado ao material de nasofaringe colhido, para expressar o antígeno da amostra. A solução era então filtrada para purificar a amostra. As micro-partículas recobertas de anticorpo e o anticorpo eram adicionados à amostra para formar um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo, se o VSR estivesse presente. A solução era transferida para um disco de reação e o anticorpo marcado com enzima. Em seqüência era realizada uma lavagem, e adicionado um substrato. As amostras contendo VSR produziam um sinal positivo (+), enquanto as amostras que não continham VSR resultavam num sinal negativo (-). A adição do reagente D (Cloridrato de guanidina 1,0M) paralisava a reação.

Como medida adicional de qualidade, existem dois controles do procedimento. O usuário certifica-se de que adicionou o Reagente 1 (Ditiotretol 16 mg/ml) e 2 (Micro-partículas recobertas de anti-VSR bovino), observando um sinal positivo branco, contra um colorido (azul ou purpúreo) no local de reação, depois que a mistura de reação foi despejada através do focalizador. A aparição de um sinal negativo purpúreo ocorrerá se os Reagentes 3 (anti-VSR bovino e Biotina 0,5 µ/ml), A (anti-Biotina de coelho e Fosfatase alcalina 0,5 µ/ml), B (Cloridrato de guanidina 1,0 M) e C (Cromógeno 0,01%) tiverem sido

adicionados na seqüência adequada e se estiverem funcionalmente ativos. O formato de resultado + / -, fornece uma leitura clara para amostras positivas ou negativas (Figura 3).

A recomendação do fabricante é de que o teste seja utilizado imediatamente após a colheita do material ou em material armazenado na temperatura de 2 a -8 °C por até 24 horas ou ainda, em amostras congeladas de -20 a -80 °C quando a conservação ocorrer por períodos mais longos.

Acompanha o material um controle de resultado positivo, para permitir o controle de qualidade.

Em testes realizados com o *TestPack RSV* pelo fabricante, com amostras provenientes de cinco laboratórios independentes, coletadas de crianças maiores e lactentes com infecções do trato respiratório, foi demonstrada uma sensibilidade de 94,3% e especificidade de 95,3%. Em estudo realizado por OBEL et al. (1995), a sensibilidade e especificidade deste teste foram de 98%.

**Figura 3** - Discos de reação do *TestPack RSV*

#### **4.8 VARIÁVEIS EM ESTUDO**

#### **4.8.1 Saturação de Oxigênio da Hemoglobina**

A medida da saturação de oxigênio da hemoglobina era realizada através de oximetria de pulso, utilizando um oxímetro Ohmeda modelo 3800, USA. .

Efetuiu-se a medida da saturação durante um período de 5 minutos, com o paciente respirando ar ambiente, dormindo ou acordado e tranquilo. Eram toleradas medidas da saturação de até 90%, sem que fosse instituída oxigenoterapia. Quando detectadas medidas abaixo deste nível, era interrompida a avaliação, efetuado o registro para o estudo e imediatamente fornecido oxigênio ao paciente.

Os intervalos de oximetria utilizados para classificação dos pacientes foram embasados em tabela validada na literatura, para a doença em estudo: maior ou igual a 95%, 90 a 95%, menor que 90% e menor que 85% ( DE BOECK et al., 1997).

#### **4.8.2 Escore Clínico**

Inicialmente, no protocolo deste estudo não foi incluída a avaliação de gravidade da doença através de um escore. A idéia do uso de um escore foi aventada, mas não foi levada adiante num primeiro momento. Posteriormente, quando já havíamos iniciado as colheitas, reconsideramos. A inclusão de um escore clínico poderia nos fornecer uma informação complementar à avaliação clínica de nossos pacientes. Poderíamos desta forma, dispor de outra variável quantitativa de avaliação, apesar de reconhecermos algumas de suas limitações. A atribuição de valores aos dados clínicos por nós colhidos deveria partir de escores validados em pesquisas anteriores. A partir disto, fomos à literatura em busca de escalas já validadas, com baixa variabilidade interobservador e com graus de gravidade estabelecidos, a fim de que pudéssemos melhor avaliar nossa amostra.

Entre as inúmeras opções de escolha na literatura, está a escala originalmente criada por BIERMAN et al. (1974) para avaliar pacientes asmáticos, há mais de 25 anos, definida como Sistema de Escore Clínico (*The Clinical Score System*). Posteriormente este instrumento foi reproduzido por Tal et al (1983), e utilizado de maneira específica para avaliação de pacientes portadores de BVA. O Sistema de Escore Clínico (Tabela I) é o resultado da pontuação atribuída a quatro variáveis clínicas: frequência respiratória, sibilância, cianose e utilização da musculatura acessória. A cada variável pode ser atribuída uma pontuação que varia de zero (situação basal de normalidade) até 3. As maiores pontuações estariam relacionadas a quadros clínicos mais graves, sendo portanto, a situação de gravidade extrema caracterizada por um escore igual a 12.

**Tabela I - Sistema de Escore Clínico (The Clinical Scoring System)**

| <b>Escore</b> | <b>Frequência Respiratória (FR)</b> | <b>Sibilância</b>                               | <b>Cianose</b>          | <b>Uso musculatura acessória</b> |
|---------------|-------------------------------------|---|-------------------------|----------------------------------|
| 0             | < 30                                | Nenhuma   | Nenhuma                 | Nenhum                           |
| 1             | 31 a 45                             | Término da expiração (com estetoscópio)         | Perioral ao chorar      | +                                |
| 2             | 46 a 60                             | Expiração total e inspiração (com estetoscópio) | Perioral em repouso     | ++                               |
| 3             | > 60                                | Expiração e inspiração (sem estetoscópio)       | Generalizada em repouso | +++                              |

Mais recentemente, DE BOECK et al. (1997) propuseram uma pequena modificação no escore original, de TAL et al. (1983), substituindo a avaliação clínica da cianose pela agregação da medida da saturação de oxigênio da hemoglobina por oximetria de pulso. Essa proposta não modificou o sistema de pontuação, nem as variáveis clínicas

selecionadas, mas facilitou ainda mais o uso do escore, potencialmente aumentando a sua aplicabilidade e diminuindo possíveis diferenças interobservadores.

Tais características determinaram nossa opção pela utilização do Sistema de Escore Clínico Modificado (Tabela II)

**Tabela II - Sistema de Escore Clínico Modificado**

| <b>Escore</b> | <b>Frequência Respiratória (FR)</b> | <b>Sibilância</b>                               | <b>Saturação (%)</b> | <b>Uso musculatura acessória</b> |
|---------------|-------------------------------------|---|----------------------|----------------------------------|
| 0             | < 30                                | Nenhuma   | ≥ 95                 | Nenhum                           |
| 1             | 31 a 45                             | Término da expiração (com estetoscópio)         | 90 a 95              | +                                |
| 2             | 46 a 60                             | Expiração total e inspiração (com estetoscópio) | < 90                 | ++                               |
| 3             | > 60                                | Expiração e inspiração (sem estetoscópio)       | < 85                 | +++                              |

#### **4.8.3 Outras Variáveis Estudadas**

O tempo de uso de oxigênio, o uso de ventilação mecânica e o tempo de hospitalização eram também medidos como outras formas de avaliação da gravidade da doença. Estes dados eram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes, após a alta hospitalar dos mesmos.

Os critérios para a indicação e suspensão do oxigênio e da ventilação mecânica, assim como para a admissão e a alta hospitalares, eram decididos exclusivamente pela equipe médica responsável pela assistência aos doentes.

#### 4.9 INTERLEUCINA-2

As dosagens da IL-2 eram efetuadas utilizando o *kit* Human IL-2 OPT EIA Set do Laboratório Pharmingen, USA (cat. N° 2627 KI).

As dosagens da IL-2 na secreção nasofaríngea eram realizadas com amostras em duplicata, como forma de controle de qualidade.

Para a medida das concentrações da IL-2, o material colhido dos pacientes era descongelado em temperatura ambiente. Após o descongelamento, a secreção era diluída 1:1 com PBS 0,01 M pH 7,2 (13 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M; 37 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M; 50 ml NaCl 3M; 900ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Os frascos Eppendorf contendo a mistura da secreção nasofaríngea e PBS eram agitados, um a um, num aparelho Diagger Vortex Genie 2 TM, na tentativa de homogeneizar o material, muito difícil de ser pipetado em função de sua viscosidade. Para as dosagens era utilizada a parte fluida da secreção.

O OptEia Set para IL-2 humana contém os componentes necessários para desenvolver um ensaio imunoenzimático (ELISA) para IL-2 em soro, plasma e células sobrenadantes.

Os testes eram realizados nas seguintes etapas:

1. Tomava-se uma placa para ELISA, que contém 96 poços identificados na horizontal com as letras de A a H e, na vertical, pelos números de 1 a 12. As placas de ELISA eram sensibilizadas com 100  $\mu\text{l}$  por poço, de anticorpo de captura (anticorpo monoclonal anti-IL-2 humana) diluído em tampão (Carbonato 0.1M, 8.4g  $\text{NaHCO}_3$ , 3.56g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; qsp 1L; pH 9,5) em câmara úmida a 4<sup>o</sup>C, durante a noite.
2. Após a sensibilização as placas eram lavadas 3 vezes com 300  $\mu\text{l}$  de solução tampão PBS. Após a última lavagem, invertiam-se as placas e as mesmas eram colocadas sobre papel absorvente, para retirar qualquer resíduo de tampão.



3. Os sítios inespecíficos eram bloqueados com 200  $\mu$ l por poço, do diluente do ensaio (Pharmingen, cat. no 26411 E), à temperatura ambiente, por 1 hora.
4. Na etapa seguinte, procedia-se a aspiração e lavagem da placa com PBS por 3 vezes, conforme descrito acima.
5. Preparava-se as soluções para a curva padrão (IL-2 recombinante liofilizada com o diluente do ensaio) nas seguintes diluições: 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,4 e 7,8 pg/ml. Nesta etapa as amostras eram preparadas conforme o descrito acima.
6. Cem  $\mu$ l das soluções padrão e amostras eram adicionados na placa em duplicatas, seguido de incubação por 2 horas, em temperatura ambiente.
7. Após a incubação, novamente aspirava-se a placa e lavava-se com PBS conforme o já descrito, por 5 vezes.
8. Adicionava-se 100  $\mu$ l da solução com anticorpo detector (Anticorpo monoclonal anti-IL-2 humana biotilado conjugado Avidina-peroxidase, AV-HRP) a cada orifício e a placa era novamente mantida em incubação, na temperatura ambiente, por 1 hora.
9. Após essa incubação, efetuava-se outra sessão de lavagens com PBS, por 7 vezes.
10. Acrescentava-se, então, 100  $\mu$ l por poço da solução de substrato (Tetrametilbenzidina e Peróxido de Hidrogênio) a cada orifício e, mantinha-se a placa em incubação, por mais 30 minutos em temperatura ambiente, mas agora ao abrigo da luz.
11. Encerrados os 30 minutos, eram acrescidos 50  $\mu$ l de solução bloqueadora (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2N), a cada poço da placa. Neste momento, os orifícios com presença de IL-2 mostravam uma coloração azul, que mudava instantaneamente para amarelo, com o acréscimo da solução bloqueadora (Figura 4).

O passo seguinte era a leitura por espectofotometria, no equipamento Benchmarck Microplate Reader BIO-RAD com filtro de 450 nm e a obtenção automática do valor da

absorbância para cada poço (absorbância: co-logarítmo da transmitância de uma solução; transmitância: fração de energia luminosa que atravessa uma coluna de solução).

A seguir, calculava-se a média das leituras das duplicatas, tanto dos padrões como das amostras. Subtraía-se a média de absorbância do padrão zero, das médias de cada uma das amostras. Montava-se uma curva, a partir dos valores conhecidos das soluções padrão, determinadas pelo fabricante. Através de análise de regressão linear, identificava-se os valores desconhecidos de IL-2 de nossas amostras

Uma vez conhecendo o valor da IL-2 de cada amostra, efetuava-se a multiplicação para corrigir a diluição feita no material, e assim obter o valor real das concentrações de IL-2 na secreção nasofaríngea de cada paciente. O último passo era a conversão dos valores encontrados em picograma/ml para nanograma/ml, unidade escolhida para a apresentação dos resultados.

**Figura 4.** Placa de ELISA com poços contendo IL-2

#### **4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As variáveis categóricas foram descritas através de proporções. As variáveis contínuas com distribuição normal foram descritas através de médias e desvio-padrão. A interleucina, que apresentou uma distribuição assimétrica, foi descrita através de mediana e intervalo interquartil 25-75.

Os resultados obtidos das concentrações de IL-2 em casos e controles foram comparados entre si, através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

O sexo foi comparado entre os dois grupos através do teste do Qui-Quadrado.

A idade e o peso de casos e controles foram comparados entre si através do teste t de Student para amostras independentes.

A significância avaliada pelos testes estatísticos foi expressa através do valor P. Foram estabelecidos como significativos os valores de  $P \leq 0,05$ .

Utilizou-se o Statistical Package for Social Science: SPSS (NORUSSIS, 1994) como recurso de informática para a realização dos testes estatísticos.

#### **4.11 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA**

Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo controlado para pesquisa de IL-2 na secreção nasofaríngea, em crianças com BVA causada pelo VSR. Este fato, embora tenha aumentado o interesse nesta pesquisa, tornou impossível uma solução para o cálculo do tamanho da amostra.

Ao revisarmos a literatura em busca de uma resposta para esta questão, localizamos estudos controlados para avaliação de outras interleucinas na secreção nasofaríngea de pacientes com BVA desencadeada pelo VSR, todos com número pequeno de pacientes. Os estudos que encontramos utilizaram entre 9 e 27 casos e entre 7 e 20 controles (ABU-HARB et al., 1999; JOSHI et al., 1998; SHEERAN et al., 1999).

Mesmo sem dispor do cálculo do tamanho da amostra, decidimos levar adiante nosso projeto, que poderia representar uma resposta para o desenho de novos estudos.

Uma estratégia alternativa, em situações como esta, é calcular o tamanho da amostra a partir de um estudo piloto composto dos primeiros pacientes incluídos no estudo. Estimando um tamanho de efeito (diferença de médias) de aproximadamente 1000 ng ( $\pm 1800$ ) a partir dos dados de nosso estudo, e considerando um alfa de 0,05 e um beta de 0,20, seriam necessários entre 88 e 126 pacientes divididos em dois grupos (HULLEY & CUMMINGS, 1988).

#### **4.11 PROTEÇÃO AOS DIREITOS HUMANOS**

Nenhuma interferência do grupo da pesquisa ocorreu em relação à admissão ou permanência hospitalar, assim como na orientação terapêutica dos pacientes incluídos no estudo.

Embora a pesquisa não incluísse qualquer intervenção além do previsto para o atendimento normal aos pacientes (o aspirado de nasofaringe já é realizado como rotina em ambos os serviços, para diagnóstico etiológico na BVA), era solicitado consentimento para a utilização de parte da secreção de nasofaringe para o trabalho, assim como para o acompanhamento da evolução clínica do paciente. Nos casos do HMV o consentimento era solicitado verbalmente. No HCSA o consentimento era solicitado por escrito, e isto devido ao projeto realizado em colaboração que já relatamos, cujo fator em estudo era igualmente a BVA, mas no qual o desfecho a ser avaliado exigia colheita de sangue do paciente. Para tornar viável a colheita de dados em colaboração, o termo de consentimento utilizado contemplava as necessidades dos dois estudos (ver anexo 2).

Em relação aos controles, a secreção nasofaríngea era obtida pelo anestesista no bloco cirúrgico, sendo a aspiração da nasofaringe parte da rotina assistencial. Quando a aspiração resultava em material viável para uso no projeto, o profissional guardava o

material, ao invés de desprezá-lo. Nos pacientes encaminhados para controle pós-operatório na UTI, era solicitado consentimento verbal para aspiração e uso da secreção.

O projeto foi submetido aos responsáveis pelo desenvolvimento de pesquisas em ambos os hospitais, para julgamento técnico e ético, tendo sido aprovado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 IDADE, PESO E SEXO

As médias de distribuição de idade e peso e, os percentuais de distribuição do sexo nas amostras de casos e controles estão apresentados na Tabela III.

Tabela III - Distribuição de idade, peso e sexo na amostra

|                    | <b>Casos<br/>n = 62</b> | <b>Controles<br/>n = 31</b> | <b>P</b> |
|--------------------|-------------------------|-----------------------------|----------|
| Idade (m)<br>Média | 2,97                    | 8,30                        | 0,0001   |
| Peso (g)<br>Média  | 5.251                   | 6.872                       | 0,015    |
| Sexo masculino (%) | 34 (54,8)               | 16 (51,6)                   | 0,941    |

A análise estatística dos dados relativos à idade de casos e controles, com o teste t de Student para amostras independentes, demonstrou haver diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

A análise estatística dos dados relativos ao peso de casos e controles, com o teste t de Student para amostras independentes, igualmente demonstrou haver diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados.

O sexo masculino predominou tanto entre os casos como entre os controles, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quando avaliados através do teste do Qui-Quadrado.

### 5.2 SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO DA HEMOGLOBINA

Os resultados da avaliação da gravidade da BVA através da medida da saturação de oxigênio da hemoglobina em ar ambiente, na admissão hospitalar, estão demonstrados na Tabela IV.

**Tabela IV - Saturação de Oxigênio da Hemoglobina em ar ambiente**

| Saturação | Casos | %    |
|-----------|-------|------|
| ≥ 95%     | 21    | 33,9 |
| 90 a 95%  | 28    | 45,2 |
| < 90%     | 12    | 19,3 |
| < 85%     | 1     | 1,6  |
| Total     | 62    | 100  |

A avaliação destes dados mostrou que 66,1% dos pacientes apresentavam comprometimento na oxigenação arterial, caracterizado por saturações de oxigênio da hemoglobina abaixo de 95%, medidas por oximetria de pulso. Em 20,9% dos pacientes verificou-se um comprometimento mais grave da oxigenação, com saturações de oxigênio da hemoglobina abaixo de 90%.

### 5.3 SISTEMA DE ESCORE CLÍNICO MODIFICADO

Os dados resultantes da avaliação da gravidade da BVA através do Sistema de Escore Clínico Modificado estão demonstrados na Tabela V.

**Tabela V - Sistema de Escore Clínico Modificado**

| Gravidade | Escore  | Casos | %    |
|-----------|---------|-------|------|
| Leve      | 4 a 6   | 27    | 43,5 |
| Moderada  | 7 a 9   | 23    | 37,1 |
| Grave     | 10 a 12 | 5     | 8,1  |

A avaliação da gravidade da BVA através do Sistema de Escore Clínico Modificado mostrou que 45,2% dos casos apresentavam doença com gravidade

moderada ou intensa. Em 43,5% dos pacientes a doença apresentava grau leve de gravidade. No grupo de pacientes estudados havia ainda 7 pacientes (11,3%) com valores do escore compatíveis com condições fisiológicas, os quais não foram incluídos na tabela acima.

#### 5.4 TEMPO DE USO DE OXIGÊNIO

O tempo de uso de oxigênio nos pacientes incluídos em nossa amostra de casos está representado na Tabela VI.

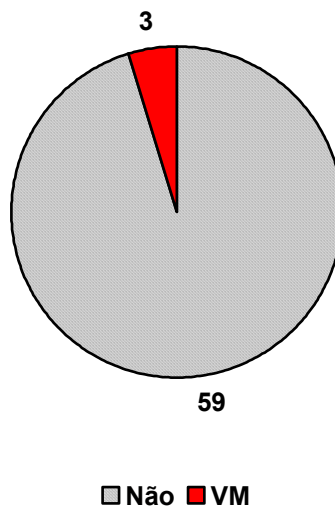
**Tabela VI - Tempo de uso de oxigênio**

| Dias   | Casos | %    |
|--------|-------|------|
| 0      | 5     | 8,1  |
| 1 a 3  | 20    | 32,2 |
| 4 a 5  | 16    | 25,8 |
| 6 a 7  | 14    | 22,6 |
| 8 ou > | 7     | 11,3 |
| Total  | 62    | 100  |

O tempo médio de uso de oxigênio entre os casos estudados foi de 4,7 ( DP 3,54) dias.

#### 5.5 USO DE VENTILAÇÃO MECÂNICA.

A avaliação da gravidade da BVA considerada a partir da utilização ou não de ventilação mecânica em nossos casos está representada na Figura 5.





### **Figura 5 - Pacientes submetidos ou não à VM.**

A avaliação da gravidade da doença na amostra estudada, tendo como parâmetro a evolução para insuficiência respiratória e a necessidade de ventilação, evidenciou 4,8% de pacientes ventilados.

### **5.6 TEMPO DE HOSPITALIZAÇÃO**

Os dados relativos ao tempo de permanência no hospital dos pacientes deste estudo estão relacionados na Tabela VII.

**Tabela VII - Tempo de hospitalização**

| <b>Dias</b> | <b>Casos</b> | <b>%</b> |
|-------------|--------------|----------|
| Até 5       | 16           | 26       |
| 6 a 10      | 37           | 60       |
| > 10        | 9            | 14       |
| Total       | 62           | 100      |

O tempo médio de hospitalização dos casos estudados foi de 4,25 dias (DP 1,76).

### **5.7 PREVALÊNCIA DO VSR**

A prevalência do VSR entre os pacientes internados com diagnóstico de BVA nos hospitais incluídos em nosso estudo está representada nas Tabelas VIII e IX.

**Tabela VIII - Prevalência do VSR nos pacientes internados por BVA no HCSA**

| <b>Agente</b>      | <b>Pacientes</b> | <b>%</b> |
|--------------------|------------------|----------|
| VSR                | 51               | 53,1     |
| Outros ou negativo | 45               | 46,9     |
| Total              | 96               | 100      |

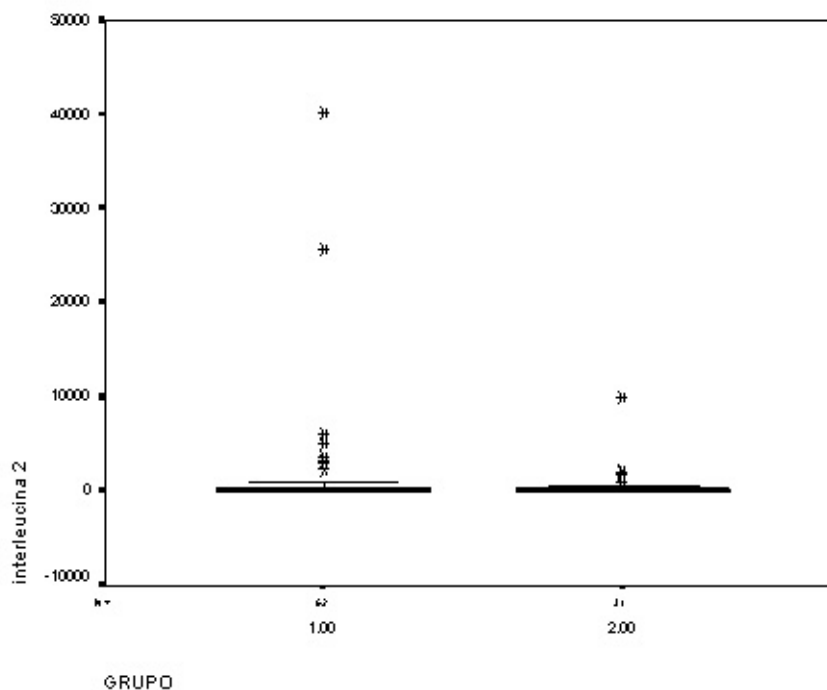
**Tabela IX - Prevalência do VSR nos pacientes internados por BVA no CTIP do HMV**

| Agente             | Pacientes | %    |
|--------------------|-----------|------|
| VSR                | 15        | 62,5 |
| Outros ou negativo | 9         | 37,5 |
| Total              | 24        | 100  |

A prevalência do VSR entre a população internada por BVA nos dois hospitais incluídos neste estudo foi de: 53,1% no HCSA e 62,5% no CTIP do HMV.

### 5.8 INTERLEUCINA-2

Os resultados das concentrações de IL-2 mostraram uma grande dispersão tanto entre os casos como entre os controles e estão apresentados na Figura 6.



**Figura 6** - Comparação das medianas das concentrações de IL-2, em ng/ml, nos casos(1) e nos controles (2) pelo Teste de Mann-Whitney (P = 0,143).

Os valores das concentrações de IL-2 dos casos (grupo 1) variaram de 0 a 40256 ng/ml e dos controles (grupo 2), de 0 a 9912 ng/ml. A mediana dos casos foi de 86 ng/ml (4,4 – 457,3) e dos controles foi de 30,5 ng/ml (0 – 269,6). Não houve diferença

estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $P = 0,143$ ) quando analisados através do teste de Mann-Whitney.

## 6 DISCUSSÃO

A falta de entendimento sobre os mecanismos responsáveis por uma doença de alta prevalência na população pediátrica em todos os continentes, como é a BVA pelo VSR, despertou nosso interesse em participar da busca internacional de uma resposta a esta questão.

Decidimos canalizar nossa investigação quanto ao envolvimento da imunidade celular na doença em estudo, medida através de uma citocina.

Dedicamos um longo tempo à etapa de escolha do mediador inflamatório que utilizaríamos em nosso estudo.

Existem relatos divergentes na literatura sobre o comportamento das citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, Interferon gama, entre outras, em pacientes com BVA pelo VSR, medidas em soro e secreções das vias aéreas.

Embasados nas evidências relatadas sobre a participação das células T na defesa antiviral, e tendo sido estas células associadas tanto com a eliminação do vírus quanto com o desenvolvimento da doença, na infecção pelo VSR, decidimos investigar uma citocina envolvida no mecanismo de ativação destas células (GRAHAM et al., 1991; HUSSEL et al., 1996).

A escolha final da IL-2 embasou-se no fato desta citocina estar envolvida na ativação, crescimento e diferenciação das células T, assim como na indução do crescimento, diferenciação e ativação funcional de uma variedade de outras células que participam da resposta imune. A IL-2 produzida por uma célula T ativada de maneira autócrina, estimula o crescimento e a proliferação de linfócitos T antígeno-específicos

assim como de células B (CURFS et al., 1997). O conhecimento deste complexo envolvimento da IL-2 na resposta imune foi definitivo para a nossa escolha.

Buscávamos testar a hipótese de que a IL-2 encontrar-se-ia aumentada nas secreções das vias aéreas dos pacientes acometidos de BVA pelo VSR.

Conhecedores dos dados de JOSHI et al. (1998) que demonstraram que as concentrações da IL-2 em vias aéreas superiores e vias aéreas inferiores apresentam o mesmo comportamento durante a BVA, decidimos pela dosagem desta citocina na secreção nasofaríngea. A facilidade de obtenção do material associada ao risco baixo ou nulo de dano ao paciente para a colheita, foram fundamentais para a opção por esta via sobre o lavado bronco-alveolar, que seria utilizado para colher a secreção das vias aéreas inferiores.

Após a decisão sobre o uso da secreção nasofaríngea para dosar a IL-2, surgiu a questão quanto à melhor forma de colheita do material. Poderíamos tanto utilizar a técnica da colheita do material puro por aspirado, quanto a colheita por lavado nasal com solução salina. Optamos pela colheita da secreção pura por acreditarmos que o lavado nasal, com posterior aspiração, poderia comprometer os resultados que viéssemos a encontrar, considerando que a medida a ser realizada seria da concentração de uma substância. O processo de lavado com o desconhecimento dos percentuais de secreção nasofaríngea e do líquido instilado que seriam recuperados na aspiração, poderia levar a resultados infíeis à realidade, mesmo com a centrifugação e utilização do material sobrenadante, prevista na técnica do lavado nasal (WALDMAN et al., 1973). Acreditamos que a obtenção de secreção pura tornaria mais fidedignos os resultados que viéssemos a obter. A diluição realizada somente em laboratório, no momento do preparo do material para as dosagens, permitiria trabalhar com concentrações conhecidas.

A próxima etapa a ser discutida diz respeito à dosagem laboratorial da IL-2. A realização da dosagem de IL-2 na secreção de nasofaringe por ELISA, em casos e controles, constituiu-se num procedimento de difícil execução. A viscosidade do material das amostras foi a responsável pelas dificuldades que enfrentamos. Mesmo utilizando método de diluição das amostras em PBS, com posterior centrifugação e agitação no equipamento Vortex, descrito na seção de materiais e métodos, foi difícil a obtenção de uma porção mais fluida para ser trabalhada. A necessidade de total segurança em relação aos resultados que seriam obtidos exigiu uma fase preliminar de testes na realização das dosagens. Realizamos dosagens seriadas, duplicadas para controle de qualidade, num total de 326 testes, antes de iniciarmos as dosagens definitivas dos casos e controles. Esta etapa permitiu que nos assegurássemos da qualidade dos resultados da IL-2 encontrados.

A observação das placas de ELISA no término das dosagens da IL-2 no laboratório sugeria não haver diferença entre os dois grupos estudados. Ambos mostravam um predomínio de poços com coloração muito clara, sugestiva de níveis baixos, quase indetectáveis da citocina dosada e, poucos poços da placa com coloração mais intensa sugerindo concentrações altas.

Após ter feito a leitura da absorbância, assim como o cálculo das concentrações de IL-2 em nanograma/ml para cada amostra através de análise de regressão linear, conforme descrevemos na seção de materiais e métodos, persistiu o que fora a impressão inicial com a coloração das placas, ou seja, o predomínio de valores baixos das concentrações e, poucas amostras com concentrações elevadas.

Em função da grande dispersão encontrada nos resultados das concentrações de IL-2, com alguns pacientes apresentando resultados muito díspares, fomos forçados à utilização das medianas dos dois grupos para a comparação através de teste estatístico.

A grande assimetria na distribuição de uma variável contra-indica o uso das médias para a análise estatística e, conseqüentemente, o uso de testes paramétricos. Por essa razão, a comparação entre as medianas dos dois grupos foi realizada através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O resultado obtido, com um  $P = 0,143$ , definiu não haver diferença entre os dois grupos, com ausência de significância estatística.

Ao realizar a análise estatística de nossos dados, aceitamos um  $P \leq 0,05$  como sinônimo de significância estatística. Não desconhecemos, porém, a discussão existente na literatura sobre a arbitrariedade deste valor. O valor de  $P \leq 0,05$  é o conceito de significância estatística vigente na literatura médica, embora venha sendo cada vez mais questionado. Com freqüência a significância estatística expressa com o valor de  $P$  é tomada como sinônimo de relevância clínica, quando na verdade ele não define a importância prática do resultado obtido, ou seja, a significância clínica (WAGNER, 1998; WARE et al., 1992).

Ao aceitarmos os critérios da literatura médica em geral e, enquadrarmos os resultados deste trabalho como não demonstrando diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados, poderíamos ainda ser questionados se esses achados ocorreram porque não existe diferença entre os grupos, ou porque o estudo não conseguiu demonstrá-la. Uma amostra não suficientemente grande, por exemplo, poderia ser responsável por uma falha em demonstrar uma diferença existente. Assumir a igualdade entre os dois grupos poderia neste caso, representar um erro tipo beta, ou seja, afirmar uma igualdade quando o correto seria afirmar uma diferença. A chance de incorrerem neste tipo de erro, entretanto, seria inicialmente muito difícil de calcular em função da ausência de dados na literatura que nos permitissem o cálculo do tamanho para a nossa amostra. Dispondo dos dados deste estudo,



tornou-se possível saber que a chance de erro  $\beta$  com um tamanho de amostra como o que utilizamos seria de 0,20.

Após estabelecermos as considerações acima sobre a análise estatística e suas interpretações neste estudo, devemos discutir o trabalho realizado com o enfoque clínico.

As investigações realizadas até a presente data com modelo animal e em humanos, têm sugerido fortemente a participação do sistema imune na patogênese da BVA pelo VSR. Mais especificamente a resposta imune do tipo Th1, através da produção de IL-2 e Interferon gama, tem sido alvo do interesse de inúmeros pesquisadores. Os resultados, entretanto, são divergentes. Podemos verificar isso com a publicação que sugeriu a IL-2 como uma forma adequada de medir a resposta inflamatória de pacientes com BVA grave, na fase aguda da doença (JOSHI et al., 1998), assim como outros que não conseguiram demonstrar a resposta imune do tipo Th1, medida pelo Interferon gama, na fase aguda da doença, nem tampouco na convalescença (BONT et al., 1999).

Apesar dessas divergências nas pesquisas em seres humanos, no modelo animal já está bem demonstrada a participação das células T, principalmente do tipo Th1, na eliminação do patógeno viral (HUSSELL et al., 1996), assim como na gênese da doença, tanto na infecção primária como na secundária (GRAHAM et al., 1991).

A detecção de citoquinas em cultura de células do sangue periférico de seres humanos adultos igualmente mostrou resposta imune ao VSR, do tipo Th1, manifestada pela determinação dos níveis de IL-2 e Interferon gama (JACKSON & SCOTT, 1996).

O resultado de nosso estudo, entretanto, une-se a outros que avaliaram a participação das células do tipo Th1 em diferentes materiais, tanto em animais quanto em seres humanos, e não conseguiram demonstrar o esperado aumento das citoquinas relacionadas a essas

células durante a infecção das vias aéreas inferiores pelo VSR (BONT et al., 1999; HUSSELL et al., 1996).

O trabalho aqui apresentado é, até onde temos conhecimento, o primeiro estudo controlado para pesquisa de IL-2 em secreção nasofaríngea de lactentes com BVA pelo VSR e, acreditamos que os resultados encontrados sejam importantes.

Devemos lembrar que com um número de casos menor que o de nosso estudo, alguns autores puderam descrever o aumento de outras citocinas na doença avaliada.

Analisando os achados deste estudo com o enfoque clínico, devemos considerar também, que no universo de resultados das concentrações de IL-2 que obtivemos, de 0 a 40256 ng, o tamanho da diferença observada entre as medianas dos dois grupos estudados, de 55,5 ng, é inexpressiva.

Após as ponderações feitas em relação à interpretação dos dados estatísticos, acreditamos que do ponto de vista da relevância clínica, este estudo sirva para sugerir que a IL-2 não se constitui num bom parâmetro de avaliação da resposta imune na BVA pelo VSR, no momento da hospitalização, se comparada com a maior facilidade na demonstração do aumento de outras citocinas nesta mesma doença.

Ao assumirmos como verdadeira a conclusão da ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, ou seja, de não haver aumento da produção de IL-2 na secreção nasofaríngea nas crianças com BVA pelo VSR, na fase inicial da doença, é necessário que façamos uma análise crítica da metodologia empregada neste trabalho, tentando verificar a possibilidade de eventuais vícios terem sido responsáveis pelo resultado encontrado.

O primeiro cuidado que tivemos ao tentar desenvolver este projeto foi com relação à seleção dos casos. Utilizamos critérios de inclusão definidos por hospitalização de crianças

de zero a vinte e quatro meses, motivada pela história inicial de doença viral aguda nas vias aéreas superiores, que evoluiu com pelo menos dois dos seguintes sinais: taquipnéia, disfunção respiratória, sibilos e estertores crepitantes, em pacientes previamente hígidos (DE BOECK et al., 1997). Excluímos os pacientes com condições clínicas que pudessem nos conduzir a vícios de confusão. Entre as condições clínicas consideradas como critérios de exclusão estiveram: doença respiratória perinatal, ventilação mecânica prévia, episódio anterior de sibilância, uso de broncodilatadores e/ou corticosteróides, presença de cardiopatia congênita e, refluxo gastro-esofágico em tratamento ou história sugestiva dessa doença. O passo seguinte foi nos assegurarmos de que o agente responsável pela doença fosse o VSR, alvo do interesse deste estudo.

Apesar de nossa meta ser a obtenção do diagnóstico etiológico viral de todos os pacientes através do mesmo método, ou seja, da imunofluorescência indireta, enfrentamos um problema que nos impediu de atingi-la. A falta de *kits* para a realização de imunofluorescência no aspirado nasofaríngeo dos pacientes do HCSA forçou-nos a uma modificação no projeto inicial. Solucionamos o imprevisto com o congelamento de secreção nasofaríngea dos pacientes, conforme já descrevemos, o que permitiu a confirmação do diagnóstico viral posteriormente, através de imunoensaio enzimático específico para o VSR. Estes testes só puderam ser realizados após o término das colheitas, em função das dificuldades que ocorreram para a importação dos *kits* de imunoensaio enzimático. Somente após esta etapa foi possível conhecer a nossa amostra dos casos.

A alteração no projeto inicial com o uso de dois tipos de testes para o diagnóstico etiológico viral nos casos do HCSA, ao nosso ver não se constituiu em problema metodológico uma vez que o *TestPack* utilizado, da mesma forma que a imunofluorescência, tem muito boa sensibilidade e especificidade (OBEL et al., 1995). Este modelo de diagnóstico viral

utilizando dois tipos de testes para selecionar a amostra de um estudo encontra-se citado na literatura por RODRIGUEZ et al. (1997), quando analisaram o uso de imunoglobulina com altos títulos de VSR, no tratamento da BVA.

Em nosso trabalho, o diagnóstico viral foi estabelecido por imunofluorescência indireta nos 13 casos internados no CTIP do HMV e, dos 49 pacientes internados no HCSA incluídos em nossa amostra, 24 (49%) tiveram o diagnóstico etiológico viral estabelecido por imunofluorescência indireta, enquanto os 25 restantes (51%) foram diagnosticados por imunoenensaio enzimático.

A identificação viral permitiu-nos estabelecer a prevalência do VSR nos pacientes internados por BVA no HCSA e no CTIP do HMV, respectivamente 53,1% e 62,5%. Esses dados de prevalência do VSR na doença em estudo encontram-se dentro dos valores citados na literatura internacional e local (HEILMAN, 1990; FISCHER, 1994).

Uma outra situação que devemos discutir diz respeito à utilização de pacientes de diferentes hospitais em nossa amostra de casos. Como pretendíamos assegurar o maior tamanho de amostra possível, uma vez que o cálculo preciso de tamanho não estava determinado e, dependíamos de uma patologia de comportamento epidêmico, soava interessante somarmos casos mais rapidamente. A principal crítica a esta atitude, sobre a qual ponderamos, seria o risco de colhermos dados de populações diferentes. Considerando que os critérios de inclusão dos casos diziam respeito a evidências clínicas definidas de BVA, com etiologia também determinada, e o desfecho analisado seria uma medida independente da conduta terapêutica instituída, decidimos pela utilização dos pacientes dos dois hospitais citados julgando que não estaríamos incorrendo em erro.

O acompanhamento da totalidade dos 13 casos do HMV foi realizado por um dos membros da equipe de pesquisadores. Os demais se dedicaram ao HCSA que demandou maior

envolvimento em função do grande movimento do serviço de emergência e, também, pela necessidade de selecionar os casos entre um grande número de doentes internados com diagnóstico de bronquiolite.

Uma dificuldade adicional surgiu no momento da decisão sobre a maneira de selecionar um grupo controle para que pudéssemos comparar os resultados das concentrações de IL-2 obtidas nos doentes. Como existe pouco material conclusivo na literatura sobre a resposta imune contra o VSR e, nada há sobre o que poderíamos encontrar ao acaso numa pesquisa de IL-2 na secreção nasofaríngea, pareceu-nos fundamental comparar os resultados obtidos nos casos com crianças que não estivessem doentes. Apenas descrever as concentrações de IL-2 na secreção nasofaríngea dos pacientes portadores da doença em estudo, poderia ser em si uma contribuição interessante para o entendimento da patogênese da BVA causada pelo VSR. Entretanto, comparar os valores das concentrações obtidos nos casos estudados com os de pacientes sem doença respiratória, significaria testar nossa hipótese sobre a participação dessa citocina na patogênese da doença.

A seleção do grupo controle para atender ao objetivo de comparação das concentrações de IL-2 deste estudo, foi um obstáculo difícil de ser transposto. Obter secreção nasofaríngea de crianças saudáveis é, por si só, uma tarefa quase impossível. Se agregarmos a isso o dilema ético no que diz respeito à manipulação e à aspiração da nasofaringe de lactentes hígidos, o problema cresce ainda mais.

Ao tentarmos buscar na literatura uma solução para este impasse através de modelos já utilizados como grupo controle em colheita de secreção nasofaríngea, encontramos relato da pesquisa de interleucinas neste tipo de secreção em pacientes com idade escolar que sofriam de asma brônquica, cujos controles foram alunos hígidos da mesma escola, os quais foram submetidos a lavados nasais para a colheita do material (NOAH et al., 1995). Em

relação a crianças com BVA, o modelo de grupo controle que encontramos foi com lactentes que participavam de uma coorte de imunizações na comunidade (ABU-HARB et al., 1999). Porém, não nos sentimos confortáveis com a idéia de fazer um procedimento em lactentes saudáveis, sem benefício para eles, e com risco de desencadear desconforto assim como eventual trauma local. Surgiu então a idéia de obter material da nasofaringe de crianças previamente híginas, da mesma faixa etária dos casos, que fossem submetidas a cirurgias eletivas. Esses pacientes necessitariam de aspiração das vias aéreas por ocasião do procedimento anestésico e não seriam submetidos a qualquer desconforto adicional. O grupo controle de nosso estudo acabou sendo composto por crianças que se encontravam em boas condições de saúde, previamente à indicação cirúrgica. Quando já iniciávamos as colheitas, localizamos o trabalho de SHEERAN et al. (1999) que dosaram interleucinas (IL-6, IL-8, IL-10) na secreção nasofaríngea de lactentes com BVA pelo VSR usando o mesmo modelo de controles estabelecido por nós.

Excluimos do grupo controle as crianças com história de doença aguda nas vias aéreas superiores nas últimas duas semanas, pacientes com história de hiper-reatividade de vias aéreas superiores ou inferiores, assim como aqueles pacientes que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos nas vias aéreas superiores, tentando desta forma evitar que situações com potencial para desencadear resposta do sistema imune local dos pacientes causassem um viés em nossos resultados, favorecendo a hipótese de nulidade.

Para minimizar o problema relacionado ao envolvimento de diferentes profissionais na colheita de dados, a seleção dos controles no bloco cirúrgico foi restrita a um único anestesista que demonstrou interesse pelo nosso projeto.

A aspiração da nasofaringe dos controles foi realizada pelo anestesista, utilizando a mesma técnica descrita em seção anterior deste trabalho para a colheita do material dos casos.

Daqueles pacientes cuja história permitia a inclusão no grupo controle e dos quais o anestesista obtinha secreção ao aspirar a nasofaringe, efetuavam-se registros de: idade, peso, sexo e o tipo de cirurgia realizada (listagem das cirurgias no anexo 3).

A secreção da nasofaringe dos controles foi, da mesma forma que a dos casos, congelada imediatamente e após mantida a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Do total de 31 controles, 10 tiveram a secreção nasofaríngea colhida quando os mesmos foram transferidos para cuidados pós-operatórios na unidade de tratamento intensivo. Isto, deveu-se ao fato de nesses pacientes, o procedimento anestésico não ter sido realizado pelo profissional que compunha o grupo da pesquisa.

Um problema enfrentado por nós em relação ao grupo controle, que também merece ser discutido, diz respeito ao “n” deste grupo. Os critérios definidos para a inclusão entre os controles limitaram muito o número de potenciais candidatos e, com relativa freqüência, daqueles pacientes que preenchiam os critérios exigidos, não era obtido material na aspiração da nasofaringe. Por esta razão, mesmo tendo em nosso apoio um profissional de um bloco cirúrgico muito movimentado, o “n” do grupo controle ficou menor que o desejado. A consequência direta deste problema foi termos que abandonar a idéia inicial de pareamento entre casos e controles, pois ficou evidente que seria necessário um tempo exageradamente longo para que esta meta pudesse ser atingida.

Constatou-se diferença de idade entre casos e controles. A média de idade dos casos foi de 2,97 meses (variação: 0,4 a 16 meses) e a média dos controles foi de 8,3 meses (variação: 0,1 a 21 meses), havendo diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,0001$ ).

A diferença de idade entre os dois grupos poderia invalidar a nossa conclusão sobre a comparação das concentrações da IL-2, caso os achados descritos quanto à resposta

humoral que se mostrou menor até os 6 meses de vida, fossem também aplicáveis em relação à imunidade celular.

Especificamente em relação à capacidade de produção da IL-2 existem relatos na literatura que demonstram que o fator idade não está associado com as concentrações de IL-2.

Os dados publicados por MIYAWAKI et al. (1985) sugeriram que a capacidade dos linfócitos T em produzir IL-2 já está em estágio maduro ao nascimento.

SAITO et al. (1988) publicaram resultados de um estudo realizado com sangue do cordão umbilical, no qual observaram que os linfócitos de fetos com 16 semanas de gestação, já produzem uma quantidade apreciável de IL-2. Os autores referidos acima estudaram também os receptores da IL-2, através do acréscimo de IL-2 exógena e puderam evidenciar que a resposta de um feto de 24 semanas de gestação é semelhante à de um adulto. Estes resultados indicam que, cedo no desenvolvimento fetal, a produção de IL-2 assim como seus receptores estão com função completa.

VIGANO et al. (1999) publicaram resultados de um estudo demonstrando que a produção de IL-2 é favorecida por uma maturação funcional diferenciada da resposta imune após o nascimento, levando à produção precoce desta citocina.

FAIRFAX & BORZI (1988) analisaram os elementos do sistema de IL-2 em recém-nascidos, incluindo a resposta proliferativa à IL-2, a produção e os receptores de superfície desta citocina. Compararam os achados com um grupo de crianças maiores e outro de adultos e concluíram que os recém-nascidos a termo possuem um sistema de IL-2 totalmente competente ao nascimento.

Embora sendo o pareamento entre casos e controles o desenho ideal para um estudo controlado, temos argumentos para acreditar que não houve prejuízo em nosso estudo por não ter sido respeitada esta regra.



Um dos estudos controlados que citamos anteriormente, e que usou na comparação dos níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 o mesmo modelo utilizado por nós para seleção do grupo controle (SHEERAN et al., 1999), não descreve as características demográficas dos pacientes incluídos e não discute sobre pareamento entre os grupos.

A maneira ideal para conseguirmos um grupo controle com mesma faixa etária que nossos casos seria possivelmente com crianças acompanhadas em serviços ambulatoriais de puericultura, num modelo semelhante ao de ABU-HARB et al. (1999), sendo que a colheita de material da nasofaringe deveria acontecer através de lavados nasais, em função da dificuldade na obtenção de material em pacientes hígidos. Entretanto, para nós, este modelo para seleção do grupo controle não foi considerado razoável do ponto de vista ético.

Como conseqüência das diferenças etárias entre os casos e os controles, encontrou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao peso ( $P=0,015$ ). Não encontramos na literatura elementos que sugiram a possibilidade de interferência desta variável na produção de IL-2.

O predomínio do sexo masculino entre os casos do estudo (54,8%), é comparável aos achados descritos na literatura por diferentes autores (GLEZEN & DENNY, 1973; GLEZEN et al., 1971). Não foi constatada diferença na freqüência de distribuição do sexo entre o grupo de casos e o de controles ( $P= 0,768$ ). Esta variável foi incluída para a descrição da amostra, não havendo expectativa quanto à influência da mesma nos resultados da citoquina dosada. O que há descrito na literatura, até o momento, sobre mediadores inflamatórios na BVA pelo VSR, não imputa ao sexo qualquer significado.

Embora a meta central deste estudo fosse a avaliação do comportamento da IL-2 na secreção nasofaríngea de crianças acometidas de BVA pelo VSR, de maneira geral, o grau de gravidade da doença no grupo estudado poderia tornar-se uma resposta necessária no

momento de concluirmos sobre os resultados de nosso trabalho. Este fato fez com que enfocássemos também a gravidade da doença segundo alguns dos critérios de avaliação para a BVA disponíveis na literatura.

Conforme abordamos na seção de materiais e métodos, foi longa a discussão sobre a melhor forma de avaliarmos a gravidade da doença. Optamos por utilizar paralelamente as formas de avaliação classicamente aceitas na literatura. Não visamos a comparação entre elas e sim demonstrar de maneira mais ampla as características das crianças estudadas. Com esta finalidade analisamos a saturação de oxigênio da hemoglobina em ar ambiente, medida por oximetria de pulso na admissão, o tempo de uso de oxigênio durante a hospitalização, a necessidade de ventilação mecânica e o tempo de hospitalização (RODRIGUEZ et al., 1997; WANG et al., 1995; THE PREVENT STUDY GROUP, 1997). Num segundo momento decidimos pela inclusão do Sistema de Escore Clínico Modificado, o que discutiremos posteriormente.

Após a definição de que utilizaríamos os dois hospitais citados como fonte de casos para o nosso estudo, foi necessário excluir a internação em UTI dos critérios de avaliação da gravidade da doença. Considerando que as rotinas assistenciais obedecem a peculiaridades já comentadas, em cada um dos hospitais envolvidos, precisávamos evitar que diferentes critérios de indicação de cuidados intensivos comprometessem o nosso levantamento.

Os dados da literatura quanto aos valores de referência da saturação de oxigênio da hemoglobina, medida por oximetria de pulso em crianças nascidas pré-termo e a termo mostram que, durante a respiração normal, noventa e cinco por cento dos lactentes mantém a saturação entre 93 e 100%, quando com idades entre zero e vinte e oito dias de vida e, entre 97 e 100%, quando com idades entre dois e seis meses (POETS, 1998).

A saturação de oxigênio da hemoglobina em ar ambiente na admissão, medida por oximetria de pulso, tem sido considerada como o melhor parâmetro independente de avaliação para prever a BVA de maior gravidade (MULHOLLAND et al., 1990; SHAW et al., 1991). A saturação de oxigênio abaixo de 95% determinada por oximetria de pulso, é citada na literatura como tendo forte associação com BVA mais grave (DARVILLE & YAMAUCHI, 1998; SHAW et al., 1991).

A tabela que utilizamos para a classificação dos casos quanto à saturação de oxigênio da hemoglobina medida por oximetria de pulso encontra-se validada na literatura para pacientes com a doença em estudo (DE BOECK et al., 1997). Esta foi a razão para termos decidido utilizá-la. Entretanto, consideramos que a referida tabela mereça ser discutida. O fato de haver um intervalo classificando saturações maiores ou iguais a 95% e outro intervalo com saturações de 90 a 95%, deixa lugar a dúvida. Os pacientes deste estudo que apresentaram saturações de 95% foram todos classificados no primeiro intervalo, ou seja, de saturação maior ou igual a 95%. Sob o nosso ponto de vista, o segundo intervalo da tabela deveria ser de 90 a 94%, considerando que os equipamentos disponíveis para mensurar a saturação por oximetria de pulso não fornecem casas decimais e, portanto, nenhuma informação seria perdida entre os valores de 94 e 95%. Apesar disto, mantivemos esta classificação por estar validada na literatura, especificamente na doença em estudo.

Quarenta e um casos de nossa amostra (66,1%) apresentaram saturações de oxigênio abaixo de 95%, sendo que estão incluídos nesse grupo 12 (19,3%) pacientes que tiveram saturações abaixo de 90% e 1 (1,6%) paciente que apresentou saturação abaixo de 85%. Portanto, com base nos critérios existentes na literatura para prever a maior gravidade da BVA, utilizando os níveis de saturação de oxigênio da hemoglobina medidos

por oximetria de pulso, 66,1% dos casos de nosso estudo encontravam-se dentro do grupo de risco para doença mais grave.

Conforme comentamos, inicialmente, no protocolo deste trabalho não foi incluída a avaliação de gravidade da doença através de um escore. A idéia do uso de um escore foi aventada, mas não foi levada adiante num primeiro momento por uma série de fatores, entre eles a dificuldade em definir qual o melhor escore a ser utilizado. Posteriormente, quando já havíamos iniciado as colheitas, mesmo sabendo que a atitude de inclusão de um escore a partir daquele momento poderia ser criticável, concluímos que poderia também ilustrar de uma melhor maneira a gravidade da doença de nossos casos. Desde então assumimos que os eventuais questionamentos valeriam a pena.

A utilização de escores clínicos específicos para o processo de avaliação, embora seja complexa, pode ser vista como uma ferramenta de muito valor para a monitorização do estado clínico, para a quantificação da resposta a medidas terapêuticas empregadas e, principalmente, para o estabelecimento de maneira uniforme das variáveis clínicas a serem analisadas de forma mais minuciosa (BEVER et al., 1995; ENGLUND et al., 1994; HORNSLETH et al., 1998; KLASSEN et al., 1997; RICHTER & SEDDON, 1998; RODRIGUEZ et al., 1997). As variáveis clínicas selecionadas para a estruturação destes escores, costumam ser as mesmas utilizadas num exame clínico rotineiro de qualquer paciente com dificuldade respiratória. Além disto, o uso de um escore clínico nos fornece uma medida mais objetiva, sem que para isto utilizemos equipamentos sofisticados, procedimentos invasivos ou administremos qualquer tipo de medicação sedativa (REIJONEN et al., 1995). Estas características foram fundamentais para que acabássemos optando pela utilização de um escore agrupado em nosso estudo, permitindo assim um melhor entendimento da gravidade.

Algumas dificuldades surgiram na definição de qual escore clínico deveria ser empregado, já que a literatura nos fornece inúmeras opções de escolha. Para tanto, partimos do princípio que o escore utilizado deveria ser constituído por variáveis clínicas rotineiramente avaliadas nos pacientes com BVA (portanto de fácil aplicabilidade), deveria ter sido submetido a processo específico de validação, além de ter sido testado em outros estudos clínicos envolvendo pacientes com a doença. Definimos também que o mesmo deveria ter uma boa correlação interobservadores, processo avaliado de maneira específica entre os examinadores do grupo, além de ser constituído por estratos não dicotomizados para as variáveis selecionadas, visando aumentar a capacidade de detectar diferenças na gravidade da doença. A opção final recaiu sobre o Sistema de Escore Clínico Modificado, descrito na seção de materiais e métodos desta dissertação.

A indefinição inicial sobre o uso ou não de um escore, e conseqüentemente de quais variáveis seriam utilizadas na avaliação, quase nos impediu de utilizar o escore acima citado. Conforme pode ser observado na ficha de avaliação dos pacientes, que se encontra no anexo 1 deste trabalho, nossa intenção inicial era conhecer a intensidade dos sibilos e, não em que momento do ciclo respiratório os mesmos seriam detectados, o que é avaliado no escore citado. Como a forma de apresentação dos resultados dos valores de escore obtidos seria agrupando os casos por intervalos de resultados, caracterizando assim quadros leves, moderados e graves, não desistimos da tentativa de utilizar o Sistema de Escore Clínico Modificado. Naquele momento, estávamos convencidos de que esse seria a melhor opção. Considerando que o compromisso com a verdade é o princípio básico de qualquer trabalho científico, tivemos o cuidado de pontuar cada um dos casos das duas formas possíveis, isto é, quando os sibilos eram audíveis com estetoscópio, o valor atribuído tanto poderia ser 1 como 2, na dependência da localização dos sibilos em relação ao ciclo

respiratório (inspiração ou expiração). Após fazermos a avaliação individualizada de cada caso, das duas maneiras, constatamos que não ocorria modificação quanto aos intervalos pré-estabelecidos. Somente aí decidimos pelo uso do escore referido. Os pacientes com sibilância audível sem estetoscópio, num total de 5, foram todos pontuados com grau 3. Os níveis de gravidade foram subdivididos da seguinte maneira: leve para valores do escore de 4 a 6, moderado para valores do escore de 7 a 9 e grave para valores do escore de 10 a 12. Valores do escore abaixo dos citados estão relacionados com condições fisiológicas

A avaliação da gravidade da doença pelo Sistema de Escore Clínico Modificado sugeriu um menor percentual de pacientes graves, em relação à medida da saturação de oxigênio da hemoglobina por oximetria de pulso isoladamente. No entanto, não está incluído entre os objetivos deste estudo definir qual a modalidade de avaliação mais indicada na BVA.

A oxigenoterapia em lactentes é utilizada há mais de setenta e cinco anos, e não existem estudos randomizados controlados sobre a variação da saturação de oxigênio arterial que deveria ser pretendida neste grupo etário ou o limiar de valor abaixo do qual deveria ser fornecido oxigênio adicional. A resposta para a questão de quando deve ser fornecido oxigênio, é derivada de conclusões embasadas em estudos observacionais e dos dados referidos em lactentes saudáveis (POETS, 1998). Há incerteza em relação à variação das saturações de oxigênio, abaixo das quais oxigênio adicional deve ser fornecido a lactentes com doença pulmonar aguda ou crônica. Porém, é sugerida a administração de oxigênio para recém-nascidos e lactentes que não conseguem manter a saturação de oxigênio maior ou igual a 93% quando dormindo, ou quando acordados e tranquilos. Outra recomendação é de que a saturação de oxigênio seja mantida maior ou igual a 95% quando é fornecido oxigênio suplementar, o que corresponde a uma pressão parcial de oxigênio arterial maior ou igual a 70 mmHg (POETS, 1998).

O tempo médio de uso de oxigênio dos casos estudados em nossa pesquisa foi de 4,7 dias (DP 3,54). NAVAS et al. (1992) relataram 4 dias de uso de oxigênio em pacientes com BVA, admitidos no hospital com saturação de oxigênio da hemoglobina < 90%. Em 1989, MEERT et al. publicaram um estudo com 160 pacientes previamente hígidos que contraíram BVA pelo VSR, nos quais o tempo de uso de oxigênio foi de 2,1 (DP 0,9). O tempo de uso de oxigênio na amostra de pacientes estudada, da mesma forma que a avaliação da saturação de oxigênio da hemoglobina por oximetria de pulso, sugere uma gravidade da doença maior que a sugerida pelo Sistema de Escore Clínico Modificado.

Antes de discutirmos nossos resultados quanto ao tempo de permanência hospitalar, cabe abordar a admissão hospitalar destas crianças.

Embora tivéssemos definido que o critério fundamental para a inclusão dos casos na amostra deste estudo fosse a necessidade de hospitalização por BVA, como forma de estudar os pacientes com doença de gravidade moderada e intensa e excluir quadros leves da doença, verificamos na avaliação de nossos dados que a decisão sobre a necessidade de hospitalização obedece a critérios variados, que vão além do que é definido por um escore.

Este comentário, não se constitui em crítica à atitude dos profissionais, mas é a constatação da variabilidade de condutas frente à BVA. Este achado não é um dado isolado. As publicações de WANG et al. (1996) e BEHRENDT et al. (1998), que analisaram a conduta diante dos pacientes com BVA, na Europa, América do Norte e Oceania, totalizando com os dois estudos, 10 países e 50 hospitais estudados, demonstraram claramente que a visão sobre a doença é muito variada, isto influenciando desde a admissão até os critérios para a alta hospitalar.

A busca de justificativas na literatura para a internação de pacientes com quadros supostamente menos graves da doença, segundo uma das modalidades de avaliação que utilizamos, é respondida por SIMOES (1999) quando numa revisão sobre esta patologia o autor faz referência aos critérios para hospitalização. Segundo os critérios definidos nessa publicação, alguns pacientes do grupo por nós estudado, mesmo sem preencher os critérios absolutos para hospitalização, poderiam ser enquadrados em 2 critérios não absolutos para admissão hospitalar. O primeiro, diz respeito à idade inferior a 6 meses, situação em que se encontravam 90,3% dos casos analisados em nosso estudo. O segundo, refere-se à incerteza sobre o cuidado a ser dispensado ao paciente em casa. Se levarmos em consideração que a maior parte dos casos incluídos neste estudo eram pacientes atendidos na emergência do HCSA e, se considerarmos ainda o nível sócio-econômico e cultural do segmento da população predominantemente atendido no referido hospital, este segundo fator citado também poderia ter influenciado a internação de alguns pacientes, aparentemente menos graves.

O tempo médio de permanência hospitalar de nossos casos foi de 4,25 dias (DP 1,76), semelhante à maioria dos dados disponíveis na literatura sobre pacientes sem doenças prévias, de 4,8 a 6,2 dias (RODRIGUEZ et al., 1997), 4,6 a 6,7 dias (WANG et al., 1996), de 3 dias (GREEN et al., 1989) e de 4 a 9 dias (BEHRENDT et al., 1998). Devemos informar que para o cálculo do tempo de hospitalização, foi excluído um paciente cuja permanência longa deveu-se a uma complicação cirúrgica abdominal, não relacionada com a doença em estudo.

O tempo de hospitalização, da mesma forma que a saturação de oxigênio da hemoglobina e o tempo de uso de oxigênio, sugere uma maior gravidade dos casos estudados, do que a gravidade sugerida pelo Sistema de Escore Clínico Modificado.



Três pacientes (4,8%) da amostra evoluíram para ventilação mecânica. O percentual de pacientes que evoluiu para ventilação mecânica em nosso estudo encontra-se acima dos 3% relatados por MEERT et al. (1989) e abaixo dos 8% citados por HAMMER et al. (1997), ou seja, dentro dos valores percentuais citados na literatura.

Encontramos aqui um item que merece ser discutido. Não em todos os trabalhos disponíveis na literatura, mas em vários deles, encontram-se correlações entre níveis elevados de interleucinas na fase aguda da doença, e a gravidade do quadro. Há relatos sobre níveis elevados de IL-8 (BONT et al., 1999) em pacientes submetidos à ventilação mecânica, e também em relação à IL-2, em pacientes submetidos a ventilação mecânica em consequência de BVA pelo VSR (JOSHI et al., 1998).

O estudo que realizamos conseguiu demonstrar que o perfil de gravidade dos pacientes internados nos hospitais incluídos em nossa amostra foi semelhante ao descrito em inúmeros estudos da literatura mundial, com pacientes hospitalizados. A avaliação por meio do escore agrupado deu uma idéia de doença leve no grupo estudado. Esta impressão é desfeita quando analisamos as demais variáveis utilizadas para medir a gravidade da doença.

Ficou demonstrado também que, na fase inicial da BVA causada pelo VSR e, com o perfil de gravidade descrito, a IL-2 na secreção nasofaríngea não se constitui numa citocina útil para a avaliação da resposta imunomediada.

O trabalho aqui relatado deixa uma questão em aberto. Qual seria o comportamento da IL-2, se as concentrações fossem medidas exclusivamente na secreção nasofaríngea de pacientes com BVA muito grave? Esta pergunta talvez seja esclarecida em novos estudos, maiores e com critério rígido de inclusão, quanto à gravidade da doença, definido pelo uso de ventilação mecânica. Os estudos propostos exigirão uma maior abrangência,

provavelmente envolvendo vários centros, ou mais de uma epidemia do VSR, se considerarmos os percentuais de pacientes com BVA pelo VSR que evoluem para ventilação mecânica.

Acreditamos que os nossos resultados venham a se somar aos vários e divergentes dados disponíveis na literatura, na tentativa do entendimento da patogênese da BVA causada pelo VSR, tanto nos aspectos da doença aguda quanto nas suas conseqüências a médio e longo prazo. A resposta definitiva a estas questões passará por uma longa tarefa, de responsabilidade de pesquisadores do mundo inteiro.

## 6 DISCUSSÃO

A falta de entendimento sobre os mecanismos responsáveis por uma doença de alta prevalência na população pediátrica em todos os continentes, como é a BVA pelo VSR, despertou nosso interesse em participar da busca internacional de uma resposta a esta questão.

Decidimos canalizar nossa investigação quanto ao envolvimento da imunidade celular na doença em estudo, medida através de uma citocina.

Dedicamos um longo tempo à etapa de escolha do mediador inflamatório que utilizaríamos em nosso estudo.

Existem relatos divergentes na literatura sobre o comportamento das citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, Interferon gama, entre outras, em pacientes com BVA pelo VSR, medidas em soro e secreções das vias aéreas.

Embasados nas evidências relatadas sobre a participação das células T na defesa antiviral, e tendo sido estas células associadas tanto com a eliminação do vírus quanto com o desenvolvimento da doença, na infecção pelo VSR, decidimos investigar uma citocina envolvida no mecanismo de ativação destas células (GRAHAM et al., 1991; HUSSEL et al., 1996).

A escolha final da IL-2 embasou-se no fato desta citocina estar envolvida na ativação, crescimento e diferenciação das células T, assim como na indução do crescimento, diferenciação e ativação funcional de uma variedade de outras células que participam da resposta imune. A IL-2 produzida por uma célula T ativada de maneira autócrina, estimula o crescimento e a proliferação de linfócitos T antígeno-específicos

assim como de células B (CURFS et al., 1997). O conhecimento deste complexo envolvimento da IL-2 na resposta imune foi definitivo para a nossa escolha.

Buscávamos testar a hipótese de que a IL-2 encontrar-se-ia aumentada nas secreções das vias aéreas dos pacientes acometidos de BVA pelo VSR.

Conhecedores dos dados de JOSHI et al. (1998) que demonstraram que as concentrações da IL-2 em vias aéreas superiores e vias aéreas inferiores apresentam o mesmo comportamento durante a BVA, decidimos pela dosagem desta citocina na secreção nasofaríngea. A facilidade de obtenção do material associada ao risco baixo ou nulo de dano ao paciente para a colheita, foram fundamentais para a opção por esta via sobre o lavado bronco-alveolar, que seria utilizado para colher a secreção das vias aéreas inferiores.

Após a decisão sobre o uso da secreção nasofaríngea para dosar a IL-2, surgiu a questão quanto à melhor forma de colheita do material. Poderíamos tanto utilizar a técnica da colheita do material puro por aspirado, quanto a colheita por lavado nasal com solução salina. Optamos pela colheita da secreção pura por acreditarmos que o lavado nasal, com posterior aspiração, poderia comprometer os resultados que viéssemos a encontrar, considerando que a medida a ser realizada seria da concentração de uma substância. O processo de lavado com o desconhecimento dos percentuais de secreção nasofaríngea e do líquido instilado que seriam recuperados na aspiração, poderia levar a resultados infíeis à realidade, mesmo com a centrifugação e utilização do material sobrenadante, prevista na técnica do lavado nasal (WALDMAN et al., 1973). Acreditamos que a obtenção de secreção pura tornaria mais fidedignos os resultados que viéssemos a obter. A diluição realizada somente em laboratório, no momento do preparo do material para as dosagens, permitiria trabalhar com concentrações conhecidas.

A próxima etapa a ser discutida diz respeito à dosagem laboratorial da IL-2. A realização da dosagem de IL-2 na secreção de nasofaringe por ELISA, em casos e controles, constituiu-se num procedimento de difícil execução. A viscosidade do material das amostras foi a responsável pelas dificuldades que enfrentamos. Mesmo utilizando método de diluição das amostras em PBS, com posterior centrifugação e agitação no equipamento Vortex, descrito na seção de materiais e métodos, foi difícil a obtenção de uma porção mais fluida para ser trabalhada. A necessidade de total segurança em relação aos resultados que seriam obtidos exigiu uma fase preliminar de testes na realização das dosagens. Realizamos dosagens seriadas, duplicadas para controle de qualidade, num total de 326 testes, antes de iniciarmos as dosagens definitivas dos casos e controles. Esta etapa permitiu que nos assegurássemos da qualidade dos resultados da IL-2 encontrados.

A observação das placas de ELISA no término das dosagens da IL-2 no laboratório sugeria não haver diferença entre os dois grupos estudados. Ambos mostravam um predomínio de poços com coloração muito clara, sugestiva de níveis baixos, quase indetectáveis da citocina dosada e, poucos poços da placa com coloração mais intensa sugerindo concentrações altas.

Após ter feito a leitura da absorbância, assim como o cálculo das concentrações de IL-2 em nanograma/ml para cada amostra através de análise de regressão linear, conforme descrevemos na seção de materiais e métodos, persistiu o que fora a impressão inicial com a coloração das placas, ou seja, o predomínio de valores baixos das concentrações e, poucas amostras com concentrações elevadas.

Em função da grande dispersão encontrada nos resultados das concentrações de IL-2, com alguns pacientes apresentando resultados muito díspares, fomos forçados à utilização das medianas dos dois grupos para a comparação através de teste estatístico.

A grande assimetria na distribuição de uma variável contra-indica o uso das médias para a análise estatística e, conseqüentemente, o uso de testes paramétricos. Por essa razão, a comparação entre as medianas dos dois grupos foi realizada através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O resultado obtido, com um  $P = 0,143$ , definiu não haver diferença entre os dois grupos, com ausência de significância estatística.

Ao realizar a análise estatística de nossos dados, aceitamos um  $P \leq 0,05$  como sinônimo de significância estatística. Não desconhecemos, porém, a discussão existente na literatura sobre a arbitrariedade deste valor. O valor de  $P \leq 0,05$  é o conceito de significância estatística vigente na literatura médica, embora venha sendo cada vez mais questionado. Com freqüência a significância estatística expressa com o valor de  $P$  é tomada como sinônimo de relevância clínica, quando na verdade ele não define a importância prática do resultado obtido, ou seja, a significância clínica (WAGNER, 1998; WARE et al., 1992).

Ao aceitarmos os critérios da literatura médica em geral e, enquadrarmos os resultados deste trabalho como não demonstrando diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados, poderíamos ainda ser questionados se esses achados ocorreram porque não existe diferença entre os grupos, ou porque o estudo não conseguiu demonstrá-la. Uma amostra não suficientemente grande, por exemplo, poderia ser responsável por uma falha em demonstrar uma diferença existente. Assumir a igualdade entre os dois grupos poderia neste caso, representar um erro tipo beta, ou seja, afirmar uma igualdade quando o correto seria afirmar uma diferença. A chance de incorrerem neste tipo de erro, entretanto, seria inicialmente muito difícil de calcular em função da ausência de dados na literatura que nos permitissem o cálculo do tamanho para a nossa amostra. Dispondo dos dados deste estudo,

tornou-se possível saber que a chance de erro  $\beta$  com um tamanho de amostra como o que utilizamos seria de 0,20.

Após estabelecermos as considerações acima sobre a análise estatística e suas interpretações neste estudo, devemos discutir o trabalho realizado com o enfoque clínico.

As investigações realizadas até a presente data com modelo animal e em humanos, têm sugerido fortemente a participação do sistema imune na patogênese da BVA pelo VSR. Mais especificamente a resposta imune do tipo Th1, através da produção de IL-2 e Interferon gama, tem sido alvo do interesse de inúmeros pesquisadores. Os resultados, entretanto, são divergentes. Podemos verificar isso com a publicação que sugeriu a IL-2 como uma forma adequada de medir a resposta inflamatória de pacientes com BVA grave, na fase aguda da doença (JOSHI et al., 1998), assim como outros que não conseguiram demonstrar a resposta imune do tipo Th1, medida pelo Interferon gama, na fase aguda da doença, nem tampouco na convalescença (BONT et al., 1999).

Apesar dessas divergências nas pesquisas em seres humanos, no modelo animal já está bem demonstrada a participação das células T, principalmente do tipo Th1, na eliminação do patógeno viral (HUSSELL et al., 1996), assim como na gênese da doença, tanto na infecção primária como na secundária (GRAHAM et al., 1991).

A detecção de citoquinas em cultura de células do sangue periférico de seres humanos adultos igualmente mostrou resposta imune ao VSR, do tipo Th1, manifestada pela determinação dos níveis de IL-2 e Interferon gama (JACKSON & SCOTT, 1996).

O resultado de nosso estudo, entretanto, une-se a outros que avaliaram a participação das células do tipo Th1 em diferentes materiais, tanto em animais quanto em seres humanos, e não conseguiram demonstrar o esperado aumento das citoquinas relacionadas a essas

células durante a infecção das vias aéreas inferiores pelo VSR (BONT et al., 1999; HUSSELL et al., 1996).

O trabalho aqui apresentado é, até onde temos conhecimento, o primeiro estudo controlado para pesquisa de IL-2 em secreção nasofaríngea de lactentes com BVA pelo VSR e, acreditamos que os resultados encontrados sejam importantes.

Devemos lembrar que com um número de casos menor que o de nosso estudo, alguns autores puderam descrever o aumento de outras citocinas na doença avaliada.

Analisando os achados deste estudo com o enfoque clínico, devemos considerar também, que no universo de resultados das concentrações de IL-2 que obtivemos, de 0 a 40256 ng, o tamanho da diferença observada entre as medianas dos dois grupos estudados, de 55,5 ng, é inexpressiva.

Após as ponderações feitas em relação à interpretação dos dados estatísticos, acreditamos que do ponto de vista da relevância clínica, este estudo sirva para sugerir que a IL-2 não se constitui num bom parâmetro de avaliação da resposta imune na BVA pelo VSR, no momento da hospitalização, se comparada com a maior facilidade na demonstração do aumento de outras citocinas nesta mesma doença.

Ao assumirmos como verdadeira a conclusão da ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, ou seja, de não haver aumento da produção de IL-2 na secreção nasofaríngea nas crianças com BVA pelo VSR, na fase inicial da doença, é necessário que façamos uma análise crítica da metodologia empregada neste trabalho, tentando verificar a possibilidade de eventuais vícios terem sido responsáveis pelo resultado encontrado.

O primeiro cuidado que tivemos ao tentar desenvolver este projeto foi com relação à seleção dos casos. Utilizamos critérios de inclusão definidos por hospitalização de crianças



de zero a vinte e quatro meses, motivada pela história inicial de doença viral aguda nas vias aéreas superiores, que evoluiu com pelo menos dois dos seguintes sinais: taquipnéia, disfunção respiratória, sibilos e estertores crepitantes, em pacientes previamente hígidos (DE BOECK et al., 1997). Excluímos os pacientes com condições clínicas que pudessem nos conduzir a vícios de confusão. Entre as condições clínicas consideradas como critérios de exclusão estiveram: doença respiratória perinatal, ventilação mecânica prévia, episódio anterior de sibilância, uso de broncodilatadores e/ou corticosteróides, presença de cardiopatia congênita e, refluxo gastro-esofágico em tratamento ou história sugestiva dessa doença. O passo seguinte foi nos assegurarmos de que o agente responsável pela doença fosse o VSR, alvo do interesse deste estudo.

Apesar de nossa meta ser a obtenção do diagnóstico etiológico viral de todos os pacientes através do mesmo método, ou seja, da imunofluorescência indireta, enfrentamos um problema que nos impediu de atingi-la. A falta de *kits* para a realização de imunofluorescência no aspirado nasofaríngeo dos pacientes do HCSA forçou-nos a uma modificação no projeto inicial. Solucionamos o imprevisto com o congelamento de secreção nasofaríngea dos pacientes, conforme já descrevemos, o que permitiu a confirmação do diagnóstico viral posteriormente, através de imunoensaio enzimático específico para o VSR. Estes testes só puderam ser realizados após o término das colheitas, em função das dificuldades que ocorreram para a importação dos *kits* de imunoensaio enzimático. Somente após esta etapa foi possível conhecer a nossa amostra dos casos.

A alteração no projeto inicial com o uso de dois tipos de testes para o diagnóstico etiológico viral nos casos do HCSA, ao nosso ver não se constituiu em problema metodológico uma vez que o *TestPack* utilizado, da mesma forma que a imunofluorescência, tem muito boa sensibilidade e especificidade (OBEL et al., 1995). Este modelo de diagnóstico viral

utilizando dois tipos de testes para selecionar a amostra de um estudo encontra-se citado na literatura por RODRIGUEZ et al. (1997), quando analisaram o uso de imunoglobulina com altos títulos de VSR, no tratamento da BVA.

Em nosso trabalho, o diagnóstico viral foi estabelecido por imunofluorescência indireta nos 13 casos internados no CTIP do HMV e, dos 49 pacientes internados no HCSA incluídos em nossa amostra, 24 (49%) tiveram o diagnóstico etiológico viral estabelecido por imunofluorescência indireta, enquanto os 25 restantes (51%) foram diagnosticados por imunoenensaio enzimático.

A identificação viral permitiu-nos estabelecer a prevalência do VSR nos pacientes internados por BVA no HCSA e no CTIP do HMV, respectivamente 53,1% e 62,5%. Esses dados de prevalência do VSR na doença em estudo encontram-se dentro dos valores citados na literatura internacional e local (HEILMAN, 1990; FISCHER, 1994).

Uma outra situação que devemos discutir diz respeito à utilização de pacientes de diferentes hospitais em nossa amostra de casos. Como pretendíamos assegurar o maior tamanho de amostra possível, uma vez que o cálculo preciso de tamanho não estava determinado e, dependíamos de uma patologia de comportamento epidêmico, soava interessante somarmos casos mais rapidamente. A principal crítica a esta atitude, sobre a qual ponderamos, seria o risco de colhermos dados de populações diferentes. Considerando que os critérios de inclusão dos casos diziam respeito a evidências clínicas definidas de BVA, com etiologia também determinada, e o desfecho analisado seria uma medida independente da conduta terapêutica instituída, decidimos pela utilização dos pacientes dos dois hospitais citados julgando que não estaríamos incorrendo em erro.

O acompanhamento da totalidade dos 13 casos do HMV foi realizado por um dos membros da equipe de pesquisadores. Os demais se dedicaram ao HCSA que demandou maior

envolvimento em função do grande movimento do serviço de emergência e, também, pela necessidade de selecionar os casos entre um grande número de doentes internados com diagnóstico de bronquiolite.

Uma dificuldade adicional surgiu no momento da decisão sobre a maneira de selecionar um grupo controle para que pudéssemos comparar os resultados das concentrações de IL-2 obtidas nos doentes. Como existe pouco material conclusivo na literatura sobre a resposta imune contra o VSR e, nada há sobre o que poderíamos encontrar ao acaso numa pesquisa de IL-2 na secreção nasofaríngea, pareceu-nos fundamental comparar os resultados obtidos nos casos com crianças que não estivessem doentes. Apenas descrever as concentrações de IL-2 na secreção nasofaríngea dos pacientes portadores da doença em estudo, poderia ser em si uma contribuição interessante para o entendimento da patogênese da BVA causada pelo VSR. Entretanto, comparar os valores das concentrações obtidos nos casos estudados com os de pacientes sem doença respiratória, significaria testar nossa hipótese sobre a participação dessa citocina na patogênese da doença.

A seleção do grupo controle para atender ao objetivo de comparação das concentrações de IL-2 deste estudo, foi um obstáculo difícil de ser transposto. Obter secreção nasofaríngea de crianças saudáveis é, por si só, uma tarefa quase impossível. Se agregarmos a isso o dilema ético no que diz respeito à manipulação e à aspiração da nasofaringe de lactentes hígidos, o problema cresce ainda mais.

Ao tentarmos buscar na literatura uma solução para este impasse através de modelos já utilizados como grupo controle em colheita de secreção nasofaríngea, encontramos relato da pesquisa de interleucinas neste tipo de secreção em pacientes com idade escolar que sofriam de asma brônquica, cujos controles foram alunos hígidos da mesma escola, os quais foram submetidos a lavados nasais para a colheita do material (NOAH et al., 1995). Em

relação a crianças com BVA, o modelo de grupo controle que encontramos foi com lactentes que participavam de uma coorte de imunizações na comunidade (ABU-HARB et al., 1999). Porém, não nos sentimos confortáveis com a idéia de fazer um procedimento em lactentes saudáveis, sem benefício para eles, e com risco de desencadear desconforto assim como eventual trauma local. Surgiu então a idéia de obter material da nasofaringe de crianças previamente híginas, da mesma faixa etária dos casos, que fossem submetidas a cirurgias eletivas. Esses pacientes necessitariam de aspiração das vias aéreas por ocasião do procedimento anestésico e não seriam submetidos a qualquer desconforto adicional. O grupo controle de nosso estudo acabou sendo composto por crianças que se encontravam em boas condições de saúde, previamente à indicação cirúrgica. Quando já iniciávamos as colheitas, localizamos o trabalho de SHEERAN et al. (1999) que dosaram interleucinas (IL-6, IL-8, IL-10) na secreção nasofaríngea de lactentes com BVA pelo VSR usando o mesmo modelo de controles estabelecido por nós.

Excluimos do grupo controle as crianças com história de doença aguda nas vias aéreas superiores nas últimas duas semanas, pacientes com história de hiper-reatividade de vias aéreas superiores ou inferiores, assim como aqueles pacientes que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos nas vias aéreas superiores, tentando desta forma evitar que situações com potencial para desencadear resposta do sistema imune local dos pacientes causassem um viés em nossos resultados, favorecendo a hipótese de nulidade.

Para minimizar o problema relacionado ao envolvimento de diferentes profissionais na colheita de dados, a seleção dos controles no bloco cirúrgico foi restrita a um único anestesista que demonstrou interesse pelo nosso projeto.

A aspiração da nasofaringe dos controles foi realizada pelo anestesista, utilizando a mesma técnica descrita em seção anterior deste trabalho para a colheita do material dos casos.

Daqueles pacientes cuja história permitia a inclusão no grupo controle e dos quais o anestesista obtinha secreção ao aspirar a nasofaringe, efetuavam-se registros de: idade, peso, sexo e o tipo de cirurgia realizada (listagem das cirurgias no anexo 3).

A secreção da nasofaringe dos controles foi, da mesma forma que a dos casos, congelada imediatamente e após mantida a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Do total de 31 controles, 10 tiveram a secreção nasofaríngea colhida quando os mesmos foram transferidos para cuidados pós-operatórios na unidade de tratamento intensivo. Isto, deveu-se ao fato de nesses pacientes, o procedimento anestésico não ter sido realizado pelo profissional que compunha o grupo da pesquisa.

Um problema enfrentado por nós em relação ao grupo controle, que também merece ser discutido, diz respeito ao “n” deste grupo. Os critérios definidos para a inclusão entre os controles limitaram muito o número de potenciais candidatos e, com relativa freqüência, daqueles pacientes que preenchiam os critérios exigidos, não era obtido material na aspiração da nasofaringe. Por esta razão, mesmo tendo em nosso apoio um profissional de um bloco cirúrgico muito movimentado, o “n” do grupo controle ficou menor que o desejado. A consequência direta deste problema foi termos que abandonar a idéia inicial de pareamento entre casos e controles, pois ficou evidente que seria necessário um tempo exageradamente longo para que esta meta pudesse ser atingida.

Constatou-se diferença de idade entre casos e controles. A média de idade dos casos foi de 2,97 meses (variação: 0,4 a 16 meses) e a média dos controles foi de 8,3 meses (variação: 0,1 a 21 meses), havendo diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,0001$ ).

A diferença de idade entre os dois grupos poderia invalidar a nossa conclusão sobre a comparação das concentrações da IL-2, caso os achados descritos quanto à resposta

humoral que se mostrou menor até os 6 meses de vida, fossem também aplicáveis em relação à imunidade celular.

Especificamente em relação à capacidade de produção da IL-2 existem relatos na literatura que demonstram que o fator idade não está associado com as concentrações de IL-2.

Os dados publicados por MIYAWAKI et al. (1985) sugeriram que a capacidade dos linfócitos T em produzir IL-2 já está em estágio maduro ao nascimento.

SAITO et al. (1988) publicaram resultados de um estudo realizado com sangue do cordão umbilical, no qual observaram que os linfócitos de fetos com 16 semanas de gestação, já produzem uma quantidade apreciável de IL-2. Os autores referidos acima estudaram também os receptores da IL-2, através do acréscimo de IL-2 exógena e puderam evidenciar que a resposta de um feto de 24 semanas de gestação é semelhante à de um adulto. Estes resultados indicam que, cedo no desenvolvimento fetal, a produção de IL-2 assim como seus receptores estão com função completa.

VIGANO et al. (1999) publicaram resultados de um estudo demonstrando que a produção de IL-2 é favorecida por uma maturação funcional diferenciada da resposta imune após o nascimento, levando à produção precoce desta citocina.

FAIRFAX & BORZI (1988) analisaram os elementos do sistema de IL-2 em recém-nascidos, incluindo a resposta proliferativa à IL-2, a produção e os receptores de superfície desta citocina. Compararam os achados com um grupo de crianças maiores e outro de adultos e concluíram que os recém-nascidos a termo possuem um sistema de IL-2 totalmente competente ao nascimento.

Embora sendo o pareamento entre casos e controles o desenho ideal para um estudo controlado, temos argumentos para acreditar que não houve prejuízo em nosso estudo por não ter sido respeitada esta regra.

Um dos estudos controlados que citamos anteriormente, e que usou na comparação dos níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 o mesmo modelo utilizado por nós para seleção do grupo controle (SHEERAN et al., 1999), não descreve as características demográficas dos pacientes incluídos e não discute sobre pareamento entre os grupos.

A maneira ideal para conseguirmos um grupo controle com mesma faixa etária que nossos casos seria possivelmente com crianças acompanhadas em serviços ambulatoriais de puericultura, num modelo semelhante ao de ABU-HARB et al. (1999), sendo que a colheita de material da nasofaringe deveria acontecer através de lavados nasais, em função da dificuldade na obtenção de material em pacientes hígidos. Entretanto, para nós, este modelo para seleção do grupo controle não foi considerado razoável do ponto de vista ético.

Como conseqüência das diferenças etárias entre os casos e os controles, encontrou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao peso ( $P=0,015$ ). Não encontramos na literatura elementos que sugiram a possibilidade de interferência desta variável na produção de IL-2.

O predomínio do sexo masculino entre os casos do estudo (54,8%), é comparável aos achados descritos na literatura por diferentes autores (GLEZEN & DENNY, 1973; GLEZEN et al., 1971). Não foi constatada diferença na freqüência de distribuição do sexo entre o grupo de casos e o de controles ( $P= 0,768$ ). Esta variável foi incluída para a descrição da amostra, não havendo expectativa quanto à influência da mesma nos resultados da citoquina dosada. O que há descrito na literatura, até o momento, sobre mediadores inflamatórios na BVA pelo VSR, não imputa ao sexo qualquer significado.

Embora a meta central deste estudo fosse a avaliação do comportamento da IL-2 na secreção nasofaríngea de crianças acometidas de BVA pelo VSR, de maneira geral, o grau de gravidade da doença no grupo estudado poderia tornar-se uma resposta necessária no

momento de concluirmos sobre os resultados de nosso trabalho. Este fato fez com que enfocássemos também a gravidade da doença segundo alguns dos critérios de avaliação para a BVA disponíveis na literatura.

Conforme abordamos na seção de materiais e métodos, foi longa a discussão sobre a melhor forma de avaliarmos a gravidade da doença. Optamos por utilizar paralelamente as formas de avaliação classicamente aceitas na literatura. Não visamos a comparação entre elas e sim demonstrar de maneira mais ampla as características das crianças estudadas. Com esta finalidade analisamos a saturação de oxigênio da hemoglobina em ar ambiente, medida por oximetria de pulso na admissão, o tempo de uso de oxigênio durante a hospitalização, a necessidade de ventilação mecânica e o tempo de hospitalização (RODRIGUEZ et al., 1997; WANG et al., 1995; THE PREVENT STUDY GROUP, 1997). Num segundo momento decidimos pela inclusão do Sistema de Escore Clínico Modificado, o que discutiremos posteriormente.

Após a definição de que utilizaríamos os dois hospitais citados como fonte de casos para o nosso estudo, foi necessário excluir a internação em UTI dos critérios de avaliação da gravidade da doença. Considerando que as rotinas assistenciais obedecem a peculiaridades já comentadas, em cada um dos hospitais envolvidos, precisávamos evitar que diferentes critérios de indicação de cuidados intensivos comprometessem o nosso levantamento.

Os dados da literatura quanto aos valores de referência da saturação de oxigênio da hemoglobina, medida por oximetria de pulso em crianças nascidas pré-termo e a termo mostram que, durante a respiração normal, noventa e cinco por cento dos lactentes mantém a saturação entre 93 e 100%, quando com idades entre zero e vinte e oito dias de vida e, entre 97 e 100%, quando com idades entre dois e seis meses (POETS, 1998).



A saturação de oxigênio da hemoglobina em ar ambiente na admissão, medida por oximetria de pulso, tem sido considerada como o melhor parâmetro independente de avaliação para prever a BVA de maior gravidade (MULHOLLAND et al., 1990; SHAW et al., 1991). A saturação de oxigênio abaixo de 95% determinada por oximetria de pulso, é citada na literatura como tendo forte associação com BVA mais grave (DARVILLE & YAMAUCHI, 1998; SHAW et al., 1991).

A tabela que utilizamos para a classificação dos casos quanto à saturação de oxigênio da hemoglobina medida por oximetria de pulso encontra-se validada na literatura para pacientes com a doença em estudo (DE BOECK et al., 1997). Esta foi a razão para termos decidido utilizá-la. Entretanto, consideramos que a referida tabela mereça ser discutida. O fato de haver um intervalo classificando saturações maiores ou iguais a 95% e outro intervalo com saturações de 90 a 95%, deixa lugar a dúvida. Os pacientes deste estudo que apresentaram saturações de 95% foram todos classificados no primeiro intervalo, ou seja, de saturação maior ou igual a 95%. Sob o nosso ponto de vista, o segundo intervalo da tabela deveria ser de 90 a 94%, considerando que os equipamentos disponíveis para mensurar a saturação por oximetria de pulso não fornecem casas decimais e, portanto, nenhuma informação seria perdida entre os valores de 94 e 95%. Apesar disto, mantivemos esta classificação por estar validada na literatura, especificamente na doença em estudo.

Quarenta e um casos de nossa amostra (66,1%) apresentaram saturações de oxigênio abaixo de 95%, sendo que estão incluídos nesse grupo 12 (19,3%) pacientes que tiveram saturações abaixo de 90% e 1 (1,6%) paciente que apresentou saturação abaixo de 85%. Portanto, com base nos critérios existentes na literatura para prever a maior gravidade da BVA, utilizando os níveis de saturação de oxigênio da hemoglobina medidos

por oximetria de pulso, 66,1% dos casos de nosso estudo encontravam-se dentro do grupo de risco para doença mais grave.

Conforme comentamos, inicialmente, no protocolo deste trabalho não foi incluída a avaliação de gravidade da doença através de um escore. A idéia do uso de um escore foi aventada, mas não foi levada adiante num primeiro momento por uma série de fatores, entre eles a dificuldade em definir qual o melhor escore a ser utilizado. Posteriormente, quando já havíamos iniciado as colheitas, mesmo sabendo que a atitude de inclusão de um escore a partir daquele momento poderia ser criticável, concluímos que poderia também ilustrar de uma melhor maneira a gravidade da doença de nossos casos. Desde então assumimos que os eventuais questionamentos valeriam a pena.

A utilização de escores clínicos específicos para o processo de avaliação, embora seja complexa, pode ser vista como uma ferramenta de muito valor para a monitorização do estado clínico, para a quantificação da resposta a medidas terapêuticas empregadas e, principalmente, para o estabelecimento de maneira uniforme das variáveis clínicas a serem analisadas de forma mais minuciosa (BEVER et al., 1995; ENGLUND et al., 1994; HORNSLETH et al., 1998; KLASSEN et al., 1997; RICHTER & SEDDON, 1998; RODRIGUEZ et al., 1997). As variáveis clínicas selecionadas para a estruturação destes escores, costumam ser as mesmas utilizadas num exame clínico rotineiro de qualquer paciente com dificuldade respiratória. Além disto, o uso de um escore clínico nos fornece uma medida mais objetiva, sem que para isto utilizemos equipamentos sofisticados, procedimentos invasivos ou administremos qualquer tipo de medicação sedativa (REIJONEN et al., 1995). Estas características foram fundamentais para que acabássemos optando pela utilização de um escore agrupado em nosso estudo, permitindo assim um melhor entendimento da gravidade.

Algumas dificuldades surgiram na definição de qual escore clínico deveria ser empregado, já que a literatura nos fornece inúmeras opções de escolha. Para tanto, partimos do princípio que o escore utilizado deveria ser constituído por variáveis clínicas rotineiramente avaliadas nos pacientes com BVA (portanto de fácil aplicabilidade), deveria ter sido submetido a processo específico de validação, além de ter sido testado em outros estudos clínicos envolvendo pacientes com a doença. Definimos também que o mesmo deveria ter uma boa correlação interobservadores, processo avaliado de maneira específica entre os examinadores do grupo, além de ser constituído por estratos não dicotomizados para as variáveis selecionadas, visando aumentar a capacidade de detectar diferenças na gravidade da doença. A opção final recaiu sobre o Sistema de Escore Clínico Modificado, descrito na seção de materiais e métodos desta dissertação.

A indefinição inicial sobre o uso ou não de um escore, e conseqüentemente de quais variáveis seriam utilizadas na avaliação, quase nos impediu de utilizar o escore acima citado. Conforme pode ser observado na ficha de avaliação dos pacientes, que se encontra no anexo 1 deste trabalho, nossa intenção inicial era conhecer a intensidade dos sibilos e, não em que momento do ciclo respiratório os mesmos seriam detectados, o que é avaliado no escore citado. Como a forma de apresentação dos resultados dos valores de escore obtidos seria agrupando os casos por intervalos de resultados, caracterizando assim quadros leves, moderados e graves, não desistimos da tentativa de utilizar o Sistema de Escore Clínico Modificado. Naquele momento, estávamos convencidos de que esse seria a melhor opção. Considerando que o compromisso com a verdade é o princípio básico de qualquer trabalho científico, tivemos o cuidado de pontuar cada um dos casos das duas formas possíveis, isto é, quando os sibilos eram audíveis com estetoscópio, o valor atribuído tanto poderia ser 1 como 2, na dependência da localização dos sibilos em relação ao ciclo

respiratório (inspiração ou expiração). Após fazermos a avaliação individualizada de cada caso, das duas maneiras, constatamos que não ocorria modificação quanto aos intervalos pré-estabelecidos. Somente aí decidimos pelo uso do escore referido. Os pacientes com sibilância audível sem estetoscópio, num total de 5, foram todos pontuados com grau 3. Os níveis de gravidade foram subdivididos da seguinte maneira: leve para valores do escore de 4 a 6, moderado para valores do escore de 7 a 9 e grave para valores do escore de 10 a 12. Valores do escore abaixo dos citados estão relacionados com condições fisiológicas

A avaliação da gravidade da doença pelo Sistema de Escore Clínico Modificado sugeriu um menor percentual de pacientes graves, em relação à medida da saturação de oxigênio da hemoglobina por oximetria de pulso isoladamente. No entanto, não está incluído entre os objetivos deste estudo definir qual a modalidade de avaliação mais indicada na BVA.

A oxigenoterapia em lactentes é utilizada há mais de setenta e cinco anos, e não existem estudos randomizados controlados sobre a variação da saturação de oxigênio arterial que deveria ser pretendida neste grupo etário ou o limiar de valor abaixo do qual deveria ser fornecido oxigênio adicional. A resposta para a questão de quando deve ser fornecido oxigênio, é derivada de conclusões embasadas em estudos observacionais e dos dados referidos em lactentes saudáveis (POETS, 1998). Há incerteza em relação à variação das saturações de oxigênio, abaixo das quais oxigênio adicional deve ser fornecido a lactentes com doença pulmonar aguda ou crônica. Porém, é sugerida a administração de oxigênio para recém-nascidos e lactentes que não conseguem manter a saturação de oxigênio maior ou igual a 93% quando dormindo, ou quando acordados e tranquilos. Outra recomendação é de que a saturação de oxigênio seja mantida maior ou igual a 95% quando é fornecido oxigênio suplementar, o que corresponde a uma pressão parcial de oxigênio arterial maior ou igual a 70 mmHg (POETS, 1998).

O tempo médio de uso de oxigênio dos casos estudados em nossa pesquisa foi de 4,7 dias (DP 3,54). NAVAS et al. (1992) relataram 4 dias de uso de oxigênio em pacientes com BVA, admitidos no hospital com saturação de oxigênio da hemoglobina < 90%. Em 1989, MEERT et al. publicaram um estudo com 160 pacientes previamente hígidos que contraíram BVA pelo VSR, nos quais o tempo de uso de oxigênio foi de 2,1 (DP 0,9). O tempo de uso de oxigênio na amostra de pacientes estudada, da mesma forma que a avaliação da saturação de oxigênio da hemoglobina por oximetria de pulso, sugere uma gravidade da doença maior que a sugerida pelo Sistema de Escore Clínico Modificado.

Antes de discutirmos nossos resultados quanto ao tempo de permanência hospitalar, cabe abordar a admissão hospitalar destas crianças.

Embora tivéssemos definido que o critério fundamental para a inclusão dos casos na amostra deste estudo fosse a necessidade de hospitalização por BVA, como forma de estudar os pacientes com doença de gravidade moderada e intensa e excluir quadros leves da doença, verificamos na avaliação de nossos dados que a decisão sobre a necessidade de hospitalização obedece a critérios variados, que vão além do que é definido por um escore.

Este comentário, não se constitui em crítica à atitude dos profissionais, mas é a constatação da variabilidade de condutas frente à BVA. Este achado não é um dado isolado. As publicações de WANG et al. (1996) e BEHRENDT et al. (1998), que analisaram a conduta diante dos pacientes com BVA, na Europa, América do Norte e Oceania, totalizando com os dois estudos, 10 países e 50 hospitais estudados, demonstraram claramente que a visão sobre a doença é muito variada, isto influenciando desde a admissão até os critérios para a alta hospitalar.

A busca de justificativas na literatura para a internação de pacientes com quadros supostamente menos graves da doença, segundo uma das modalidades de avaliação que utilizamos, é respondida por SIMOES (1999) quando numa revisão sobre esta patologia o autor faz referência aos critérios para hospitalização. Segundo os critérios definidos nessa publicação, alguns pacientes do grupo por nós estudado, mesmo sem preencher os critérios absolutos para hospitalização, poderiam ser enquadrados em 2 critérios não absolutos para admissão hospitalar. O primeiro, diz respeito à idade inferior a 6 meses, situação em que se encontravam 90,3% dos casos analisados em nosso estudo. O segundo, refere-se à incerteza sobre o cuidado a ser dispensado ao paciente em casa. Se levarmos em consideração que a maior parte dos casos incluídos neste estudo eram pacientes atendidos na emergência do HCSA e, se considerarmos ainda o nível sócio-econômico e cultural do segmento da população predominantemente atendido no referido hospital, este segundo fator citado também poderia ter influenciado a internação de alguns pacientes, aparentemente menos graves.

O tempo médio de permanência hospitalar de nossos casos foi de 4,25 dias (DP 1,76), semelhante à maioria dos dados disponíveis na literatura sobre pacientes sem doenças prévias, de 4,8 a 6,2 dias (RODRIGUEZ et al., 1997), 4,6 a 6,7 dias (WANG et al., 1996), de 3 dias (GREEN et al., 1989) e de 4 a 9 dias (BEHRENDT et al., 1998). Devemos informar que para o cálculo do tempo de hospitalização, foi excluído um paciente cuja permanência longa deveu-se a uma complicação cirúrgica abdominal, não relacionada com a doença em estudo.

O tempo de hospitalização, da mesma forma que a saturação de oxigênio da hemoglobina e o tempo de uso de oxigênio, sugere uma maior gravidade dos casos estudados, do que a gravidade sugerida pelo Sistema de Escore Clínico Modificado.

Três pacientes (4,8%) da amostra evoluíram para ventilação mecânica. O percentual de pacientes que evoluiu para ventilação mecânica em nosso estudo encontra-se acima dos 3% relatados por MEERT et al. (1989) e abaixo dos 8% citados por HAMMER et al. (1997), ou seja, dentro dos valores percentuais citados na literatura.

Encontramos aqui um item que merece ser discutido. Não em todos os trabalhos disponíveis na literatura, mas em vários deles, encontram-se correlações entre níveis elevados de interleucinas na fase aguda da doença, e a gravidade do quadro. Há relatos sobre níveis elevados de IL-8 (BONT et al., 1999) em pacientes submetidos à ventilação mecânica, e também em relação à IL-2, em pacientes submetidos a ventilação mecânica em consequência de BVA pelo VSR (JOSHI et al., 1998).

O estudo que realizamos conseguiu demonstrar que o perfil de gravidade dos pacientes internados nos hospitais incluídos em nossa amostra foi semelhante ao descrito em inúmeros estudos da literatura mundial, com pacientes hospitalizados. A avaliação por meio do escore agrupado deu uma idéia de doença leve no grupo estudado. Esta impressão é desfeita quando analisamos as demais variáveis utilizadas para medir a gravidade da doença.

Ficou demonstrado também que, na fase inicial da BVA causada pelo VSR e, com o perfil de gravidade descrito, a IL-2 na secreção nasofaríngea não se constitui numa citocina útil para a avaliação da resposta imunomediada.

O trabalho aqui relatado deixa uma questão em aberto. Qual seria o comportamento da IL-2, se as concentrações fossem medidas exclusivamente na secreção nasofaríngea de pacientes com BVA muito grave? Esta pergunta talvez seja esclarecida em novos estudos, maiores e com critério rígido de inclusão, quanto à gravidade da doença, definido pelo uso de ventilação mecânica. Os estudos propostos exigirão uma maior abrangência,

provavelmente envolvendo vários centros, ou mais de uma epidemia do VSR, se considerarmos os percentuais de pacientes com BVA pelo VSR que evoluem para ventilação mecânica.

Acreditamos que os nossos resultados venham a se somar aos vários e divergentes dados disponíveis na literatura, na tentativa do entendimento da patogênese da BVA causada pelo VSR, tanto nos aspectos da doença aguda quanto nas suas conseqüências a médio e longo prazo. A resposta definitiva a estas questões passará por uma longa tarefa, de responsabilidade de pesquisadores do mundo inteiro.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abu-Harb M, Bell F, Finn A, Rao WH, Nixon L, Shale D, et al. IL-8 and neutrophil elastase levels in the respiratory tract of infants with RSV bronchiolitis. *Eur Respir J* 1999;14:139-43.
2. Aherne W, Bird T, Court SD, Gardner PS, McQuillen J. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol* 1970;23:7-18.
3. Anas N, Boettrich C, Hall CB, Brooks JG. The association of apnoea and respiratory syncytial virus infection in infants. *J Pediatr* 1982;101:65-8.
4. Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, McIntosh K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1991;163:687-92.
5. Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry TM, Fernie BF, Stone Y, et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1985;151:626-33.
6. Anderson LJ, Parker RA, Strikas RA, Farrar JA, Gangarosa EJ, Keyserling HL, et al. Day-care center attendance and hospitalization for lower respiratory tract illness. *Pediatrics* 1988;82:300-8.
7. Avedaño LF, Larrañaga C, Palomino MA, Gaggero A, Montaldo G, Suárez M, et al. Community and hospital-acquired respiratory syncytial virus infections in Chile. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:564-8.
8. Bangham CRM, Cannon MJ, Karzon DT, Askonas BA. Cytotoxic T-cell response to respiratory syncytial virus in mice. *J Virol* 1985;56:55-9.
9. Banks RE. Measurement of Cytokines in clinical samples using immunoassays: problems and pitfalls. *Clin Rev Clin Lab Sci* 2000;37:131-82.
10. Behtendt CE, Decker MD, Burch DJ, Watson PH. International variation in the management of infants hospitalized with respiratory syncytial virus. *Eur J Pediatr* 1998;157:215-20.
11. Bendtzen K. Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol Lett* 1994;43:111-23.
12. Berman S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. *Rev Infect Dis* 1991;13:S454-2.

13. Bever HPV, Desager KN, Pauwels JH, Wojciechowski M, Vermeire PA. Aerosolized furosemide in wheezy infants: a negative report. *Pediatr Pulmonol* 1995;20:16-20.
14. Bierman CW, Pierson WE. The pharmacologic management of status asthmaticus in children. *Pediatrics* 1974;54:245-7.
15. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JT, et al. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J* 1999;14:144-9.
16. Brand PLP, Vaessen-Verbene APH. Differences in management of bronchiolitis between hospitals in the Netherlands. *Eur J Pediatr* 2000;159:343-7.
17. Bransenburg AH, Jeannet PY, Steensel-Moll HA, Ott A, Rothbarth PH, Wunderli W, et al. Local variability in respiratory syncytial disease severity. *Arch Dis Child* 1997;77:410-4.
18. Bruhn FW, Mokrohisky ST, McIntosh K. Apnoea associated with respiratory syncytial virus infection in young infants. *J Pediatr* 1977;90:382-6.
19. Bruhn FW, Yeager AS. Respiratory syncytial virus in early infancy. *Am J Dis Child* 1977;131:145-8.
20. Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 1957;66:281-90.
21. Cherian T, Simoes EAF, Steinhoff MC, Chitra K, John M, Raghupathy P, et al. Bronchiolitis in tropical South of India. *Am J Dis Child* 1990;144:1026-30.
22. Church NR, Anas NG, Hall CB, Brooks JG. Respiratory syncytial virus - related apnea in infants. *Am J Dis Child* 1984;138:247-50.
23. Collins PL, McIntosh K, Chanock RM. Respiratory syncytial virus. In: Fields BN, McIntosh K, Chanock RM, editors. *Fields Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1995. p. 1313-51.
24. Curfs JHAJ, Meis JFGM, Hoogkamp-Korstanje JAA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:742-80.
25. Darville T, Yamauchi T. Respiratory syncytial virus. *Pediatr Rev* 1998;19:55-61.
26. De Boeck K, Van der Aa N, Van Lierde S, Corbeel L, Eeckels R. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: a double-blind dexametasone efficacy study. *J Pediatr* 1997;131:919-21.
27. Derish M, Hodge G, Dunn C, Ariagno R. Aerosolized albuterol improves airway reactivity in infants with acute respiratory failure from respiratory syncytial virus. *Pediatr Pulmomol* 1998;26:12-20.
28. Englund JA, Piedra P, Ahn YM, Gilbert B. High-dose, short-duration ribavirin aerosol therapy compared with standard ribavirin therapy in children with suspected respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1994;125:635-41.
29. Everard ML, Milner AD. The respiratory syncytial virus and its role in acute bronchiolitis. *Eur J Pediatr* 1992;151:638-51.

30. Fairfax CA, Borzy MS. Interleukin 2 production, proliferative response, and receptor expression by cord blood mononuclear cells. *J Clin Lab Immunol* 1988;27:63-7.
31. Falsey AR, Walsh EE. Relationship of serum antibody to risk of respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *J Infect Dis* 1998;177:463-6.
32. Fischer, GB. Fatores prognósticos para bronquiolite viral aguda [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1994.
33. Fishaut M, Tubergen D, McIntosh K. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity. *J Pediatr* 1980;96:179-86.
34. Frankel LR, Derish MT. Respiratory syncytial virus-induced respiratory failure in the pediatric patient. *New Horiz* 1999;7:335-46.
35. Fulginiti VA, Eller JJ, Sieber OF, Joyner JW, Minamitani M, Meiklejohn G. Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine. *Am J Epidemiol* 1969;89:435-48.
36. Glezen WP, Denny FW. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. *N Engl J Med* 1973;288:498-505.
37. Glezen WP, Loda FA, Clyde Jr WA, Senior RJ, Sheaffer CI, Conley WG, et al. Epidemiologic patterns of acute lower respiratory disease of children in a pediatric group practice. *J Pediatr* 1971;78:397-406.
38. Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr* 1981;98:708-15.
39. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* 1986;140:543-6.
40. Graham BS, Bunton LA, Wright PF, Karzon DT. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest* 1991;88:1026-33.
41. Green M, Brayer AF, Schenkman KA, Wald ER. Duration of hospitalization in previously well infants with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:601-5. (Ref 11 do 191)
42. Groothuis JR, Simoes EAF, Levin MJ, Hall CB, Long CE, Rodriguez WJ, et al. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. *N Engl J Med* 1993;329:1524-30.
43. Hall CB, Douglas Jr RG. Clinically useful method for the isolation of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1975;131:1-5.
44. Hall CB, Douglas Jr RG, Geiman JM. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1980;141:98-102.
45. Hall CB, Douglas Jr RG, Geiman JM. Respiratory syncytial virus infections in infants: quantitation and duration of shedding. *J Pediatr* 1976;89:11-5.

46. Hall CB, Kopelman AE, Douglas RG, Geiman JM, Meagher MP. Neonatal respiratory syncytial virus infection. *N Engl J Med* 1979;300:393-6.
47. Hall CB, McCarthy CA. Respiratory syncytial virus. In: Mandell Principles and practice in infectious diseases. 5th ed. Livingstone; 2000.
48. Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1991;163:693-8.
49. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, et al. Occurrence of Groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis* 1990;162:1283-90.
50. Hambling MH. Survival of the respiratory syncytial virus during storage under various conditions. *Br J Exp Pathol* 1964;45:647-55.
51. Hammer J, Numa A, Newth CJL. Acute respiratory distress syndrome caused by respiratory syncytial virus. *Pediatr Pulmonol* 1997;23:176-83.
52. Hammer J, Numa A, Newth CJL. Albuterol responsiveness in infants with respiratory failure caused by respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1995;127:485-90.
53. Hatfield N, Rauscher T. Suctioning. In: Levin DL, Morris FC, Moore GC. *A practical guide to pediatric intensive care*. 2nd ed. Saint Louis: Mosby; 1984. p. 565-9.
54. Heilman CA. Respiratory syncytial and parainfluenza viruses. *J Infect Dis* 1990;161:402-6.
55. Henderson FW, Collier AM, Clyde Jr WA, Denny FW. Respiratory syncytial virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med* 1979;300:530-4.
56. Hendry RM, Talis AL, Godfrey E, Anderson LJ, Fernie BF, McIntosh K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J Infect Dis* 1986;153:291-7.
57. Hogg JC, Williams J, Richardson JB, Macklem PT, Thurlbeck WM. Age as a factor in the distribution of lower-airway conductance and in the pathologic anatomy of obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1970;282:1283-7.
58. Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1991;133:1135-51.
59. Hollman G, Shen G, Zeng L, Yngsdal-Krenz R, Perloff W, Zimmerman J, et al. Helium-oxygen improves clinical asthma scores in children with acute bronchiolitis. *Crit Care Med* 1998;26:1731-6.
60. Hornsleth A, Klug B, Nir M, Johansen J, Hansen KS, Christensen LS, et al. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17: 1114-21.
61. Hulley SB, Cummings SR. *Designing clinical research*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1988. p. 215.

62. Hussell T, Spender LC, Georgiou A, O'Garra A, Openshaw PJ. Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1996;77:2447-55.
63. Jackson M, Scott R. Different patterns of cytokine introduction in cultures of respiratory syncytial (RS) virus-specific human T<sub>H</sub> cell lines following stimulating with RS virus and RS virus protein. *J Med Virol* 1996;49:161-9.
64. Joshi P, Kakakios A, Jayasekera J, Isaacs D. A comparison of IL-2 levels in nasopharyngeal and endotracheal aspirates of babies with respiratory syncytial viral bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:618-20.
65. Kaul TN, Welliver RC, Wong DT, Udawadia RA, Riddlesberger K, Ogra PL. Secretory antibody response to respiratory syncytial virus infection. *Am J Dis Child* 1981;135:1013-6.
66. Kellner JD, Ohlsson A, Gadomski AM, Wang EEL. Efficacy on bronchodilator therapy in bronchiolitis: a meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1996;150:1166-72.
67. Kim HW, Arrobio JD, Brandt CD, Jeffries BC, Pyles G, Reid JL, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, DC. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am J Epidemiol* 1973;98:216-25.
68. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* 1969;89:422-34.
69. Kimpen JLL. Experimental models for respiratory syncytial virus infections. *Rev Med Microbiol* 1996a;7:115-22.
70. Kimpen JLL. Respiratory syncytial virus immunology. *Pediatr Allergy Immunol* 1996b;7(Suppl 9):86-90.
71. Kimpen JLL, Heymans HSA. Respiratory syncytial virus: immunity and immune injury. *Immunol Infect Dis* 1993;3:281-8.
72. Kimpen JLL, Schaad UB. Treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis: 1995 poll of members of the European Society for Paediatric Infections Diseases. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:479-81.
73. Klassen TP. Recent advance in the treatment of bronchiolitis and laringitis. *Pediatr Clin North Am* 1997;44:249-61.
74. Klassen TP, Sutcliffe T, Watters LK, Wells GA, Allen UD, Li MM. Dexamethasone in salbutamol-treated in patients with acute bronchiolitis: a randomized, controlled trial. *J Pediatr* 1997;130:191-6.
75. Kneyber MCJ, Brandenburg AH, Groot R, Joosten KFM, Rothbarth PH, Ott A, et al. Risk factors for respiratory syncytial virus associated apnoea. *Eur J Pediatr* 1998;157:331-5.
76. Kneyber MCJ, Brandenburg AH, Rothbarth H, Groot R, Ott A, van Steensel-Moll HA. Relationship between clinical severity of respiratory syncytial virus infection and subtype. *Arch Dis Child* 1996;75:137-40.

77. La Via WV, Marks MI, Stutman HR. Respiratory syncytial virus puzzle: clinical features, pathophysiology, treatment, and prevention. *J Pediatr* 1992;121:503-10.
78. Laing I, Riedel F, Yap PL, Simpson H. Atopy predisposing to acute bronchiolitis during an epidemic of respiratory syncytial virus. *BMJ* 1982;284:1070-2.
79. Law BJ, Wang EEL, MacDonald N, MacDonald J, Dobson S, Boucher F, et al. Does ribavirin impact on the Hospital Course of children with respiratory syncytial virus (RSV) infection? An analysis using the Pediatric Investigators Collaborative Network in Canada (PICNIC) RSV database. *Pediatrics* 1997;99:E7.
80. McConnochie KM, Roghmann KJ. Bronchiolitis as a possible cause of wheezing in childhood: new evidence. *Pediatrics* 1984;74:1-10.
81. McIntosh K, Fishaut JM. Immunopathologic mechanisms in lower respiratory tract disease of infants due to respiratory syncytial virus. *Prog Med Virol* 1980;26:94-118.
82. McIntosh K, McQuillin J, Gardner PS. Cell-free and cell-bound antibody in nasal secretions from infants with respiratory syncytial virus infection. *Infect Immun* 1979;23:276-81.
83. Meert K, Heidemann S, Lieh-Lai M, Sarnaik P. Clinical characteristics of Respiratory Syncytial Virus infections in healthy versus previously compromised host. *Pediatr Pulmonol* 1989; 7: 167-170.
84. Menon K, Sutcliffe T, Klassen TP. Clinical and laboratory observations: a randomized trial comparing the efficacy of epinephrine with salbutamol in the treatment of acute bronchiolitis. *J Pediatr* 1995;126:1004-7.
85. Meurman O, Ruuskanen O, Sarkkinen H, Hänninen P, Halonen P. Immunoglobulin class-specific antibody response in respiratory syncytial virus infection measured by enzyme immunoassay. *J Med Virol* 1984;14:67-72.
86. Miyawaki T, Seki H, Taga K, Sato H, Taniguchi N. Dissociated production of interleukin-2 and immune (gamma) interferon by phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes in healthy infants. *Clin Exp Immunol* 1985;59:505-11.
87. Morris JA, Blount RE, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;92:544-50.
88. Muelenaer PM, Henderson FW, Hemming VG, Walsh EE, Anderson LJ, Prince GA, et al. Group-specific serum antibody responses in children with primary and recurrent respiratory syncytial virus infections. *J Infect Dis* 1991;164:15-21. (ref 45 do 62)
89. Mufson MA, Örvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1985;66:2111-24.
90. Mulholland EK, Olisnky A, Shann FA. Clinical findings and severity of acute bronchiolitis. *Lancet* 1990;335:1259-61.
91. Murphy BR, Prince GA, Walsh EE, Kim HW, Parrot RH, Hemming VG, et al. Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein antibody responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine. *J Clin Microbiol* 1986;24:197-202.

92. Murphy BR, Walsh EE. Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glyco-protein that are deficient in fusion-inhibiting activity. *J Clin Microbiol* 1988;26:1595-7.
93. Navas L, Wang E, Carvalho V. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. *J Pediatr* 1992;121:348-54. (Ref 7 do 129)
94. Noah TL, Henderson FW, Henry MM, Peden DB, Devlin RB. Nasal lavage cytokines in normal, allergic, and asthmatic school-age children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1290-6.
95. Norussis MJ. SPSS/PC 6.1 Statistical package for social science. Chicago: SPSS; 1994.
96. Obel N, Andersen HK, Jensen IP, Mordhorst CH. Evaluation of Abbott Testpack RSV and an in-house RSV Elisa for detection of respiratory syncytial virus in respiratory tract aspirates. *APMIS* 1995;103:416-8.
97. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling - regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000;28(Suppl):N3-12.
98. Ogra PL. Allergy, respiratory tract infections and bronchial hyperreactivity. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:347-52.
99. Orenstein DM. Bronchiolitis. In: Behrman. Nelson textbook of pediatrics. 16th ed. Philadelphia: Saunders; 2000. p. 1265-87.
100. Paret G, Dekel B, Vardi A, Szeinberg A, Lotan D, Barzilay Z. Heliox in respiratory failure secondary to bronchiolitis: a new therapy. *Pediatr Pulmonol* 1996;22:322-3.
101. Parrott RH, Kim HW, Arrobio JO, Hodes DS, Murphy BR, Brandt CD, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am J Epidemiol* 1973;98:289-300.
102. Poets CF. When do infants need additional inspired oxygen? A review of the current literature. *Pediatr Pulmonol* 1998;26:424-8.
103. Prince GA, Horswood RL, Chanock RM. Quantitative aspects of passive immunity to respiratory syncytial virus infection in infant cotton rats. *J Virol* 1985a;55:517-20.
104. Prince GA, Horswood RL, Koenig DW, Chanock RM. Antigenic analysis of a putative new strain of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1985b;151:634-7.
105. Pullan CR, Hey EN. Wheezing, asthma, and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. *BMJ* 1982;284:1665-9.
106. Reijonen T, Korppi M, Pitkääkangas S, Tenhola S, Remes K. The clinical efficacy of nebulized racemic epinephrine and albuterol in acute bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995;149:686-92.
107. Renzi PM, Turgeon JP, Yang JP, Drblik SP, Marcotte JE, Pedneault, et al. Cellular immunity is activated and a TH-2 response is associated with early wheezing in infants after bronchiolitis. *J Pediatr* 1997;130:584-93.

108. Reynolds EOR. The effect of breathing 40 per cent oxygen on the arterial blood gas tensions of babies with bronchiolitis. *J Pediatr* 1963;63:1135-9.
109. Richter H, Seddon P. Early nebulized budesonide in the treatment of bronchiolitis and the prevention of postbronchiolitic wheezing. *J Pediatr* 1998;132:849-53.
110. Rodriguez WJ, Gruber WC, Groothuis JR, Simoes EAF, Rosas AJ, Lepow M, et al. RSV-IGIV Study Group. Respiratory syncytial virus immune globulin treatment of RSV lower respiratory tract infection in previously healthy children. *Pediatrics* 1997;100:937-42.
111. Roosevelt G, Sheehan K, Grupp-Phelan J, Tanz RR, Listemick R. Dexamethasone in bronchiolitis: a randomised controlled trial. *Lancet* 1996;348:292-5.
112. Ruuskanen O, Ogra PL. Respiratory syncytial virus. *Curr Probl Pediatr* 1993;23:50-79.
113. Saito S, Saito M, Kato Y, Moriyama I, Ichijo M. Interleukin-2 production by human fetal lymphocytes. *J Reprod Immunol* 1988;14:247-55.
114. Sanchez I, Koster J, Powell RE, Wolstein R, Chernick V. Effect of recemic epinephrine and salbutamol on clinical score and pulmonary mechanics in infants with bronchiolitis. *J Pediatr* 1993;122:145-51.
115. Selwyn BJ. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison of findings from several developing countries. *Rev Infect Dis* 1990;12(Suppl 8):S870-88.
116. Shaw KN, Bell LM, Sherman NH. Outpatient assessment of infants with bronchiolitis. *Am J Dis Child* 1991;145:151-5.
117. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA* 1999;281:1440-6.
118. Sheeran P, Jafri H, Carubelli C, Saavedra J, Johnson C, Krisher K, et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis* 1999;18:115-22.
119. Simoes EAF. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet* 1999;354:847-52.
120. Sly PD, Hibbert ME. Childhood asthma following hospitalization with acute viral bronchiolitis in infancy. *Pediatr Pulmonol* 1989;7:153-8.
121. Smith KA. Interleukin-2. *Curr Opin Immunol* 1992;4:271-6.
122. Smith DW, Frankel LR, Mathers LH, Tang ATS, Ariagno RL, Prober CG. A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infection. *N Engl J Med* 1991;325:24-9.
123. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541-5.
124. Steinhorn RH, Green TP. Use of extracorporeal membrane oxygenation in the treatment of respiratory syncytial virus bronchiolitis: the national experience, 1983 to 1988. *J Pediatr* 1990;116:338-42.



125. Suttmöller F, Andrade Ferro ZP, Asensi MD, Ferreira V, Mazzei IS, Cunha BL. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and hospital study in Rio de Janeiro. *Clin Infect Dis* 1995;20:854-60.
126. Tal A, Bavilski C, Yohai D, Bearman JE, Gorodisher R, Moses SW. Dexamethasone and salbutamol in the treatment of acute wheezing in infants. *Pediatrics* 1983;71:13-18.
127. Taylor CE, Morrow S, Scott M, Young B, Toms GL. Comparative virulence of respiratory syncytial virus subgroups A and B. *Lancet* 1989;1:777-8.
128. Taylor G, Stott EJ, Bew M, Fernie BF, Cote PJ, Collins AP, et al. Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology* 1984;52:137-42.
129. THE PREVENT STUDY GROUP. Reduction of respiratory syncytial virus hospitalization among premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia using respiratory syncytial virus immune globulin prophylaxis. *Pediatrics* 1997;99:93-9.
130. Toms GL, Scott R. Respiratory syncytial virus and the infant immune response. *Arch Dis Child* 1987;62:544-6.
131. Vigano A, Esposito S, Arienti D, Zagliani A, Massironi E, Principi N, et al. Differential development of type 1 and type 2 cytokines and beta-chemokines in the ontogeny of healthy newborns. *Biol Neonate* 1999;75:1-8.
132. Wagner MB. Significância com confiança? *J Pediatr* 1998;74:343-6.
133. Waldman RH, Ganguly R. Immunity to infections on secretory surfaces. *J Infect Dis* 1974;130:419-40.
134. Waldman RH, Jurgensen PF, Olsen GN, Ganguly R, Johnson JE. Immune response of the human respiratory tract. I. Immunoglobulin levels and influenza virus vaccine antibody response. *J Immunol* 1973;111:38-41.
135. Walsh EE, Hall CB, Briselli M, Brandriss MW, Schlesinger JJ. Immunization with glycoprotein subunits of respiratory syncytial virus to protect cotton rats against viral infection. *J Infect Dis* 1987;155:1198-203.
136. Wang EEL, Law BJ, Boucher FD, Stephens D, Robinson JL, Dobson S, et al. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *J Pediatr* 1995;126:212-9.
137. Wang EEL, Law BJ, Boucher FD, Stephens D, Robinson JL, Dobson S, et al. Pediatric Investigators Collaborative Network in Canada (PICNIC) study of admission and management variation in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *J Pediatr* 1996;129:390-5.
138. Ware JH, Mosteller F, Delgado F, Donnelly C, Ingelfinger JA. P values. In: Bailar III, Jc, Mosteller F, editors. *Medical uses of statistics*. 2nd ed. Boston: NEJM Books; 1992. p. 181-200.
139. Waris M, Meurman O, Mufson MA, Ruuskanen O, Halonen P. Shedding of infectious virus and virus antigen during acute infection with respiratory syncytial virus. *J Med Virol* 1992;38:111-6.

140. Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health* 1998;3:268-80.
141. Welliver RC, Kaul TN, Ogra PL. The appearance of cell-bound IgE in respiratory-tract epithelium after respiratory-syncytial-virus infection. *N Engl J Med* 1980a;303:1198-202.
142. Welliver RC, Kaul TN, Putnam TI, Sun M, Riddlesberger K, Ogra PL. The antibody response to primary and secondary infection with respiratory syncytial virus: kinetics of class-specific responses. *J Pediatr* 1980b;96:808-13.
143. Welliver RC, Sun M, Rinaldo D, Ogra PL. Predictive value of respiratory syncytial virus-specific IgE responses for recurrent wheezing following bronchiolitis. *J Pediatr* 1986;109:776-80.
144. Welliver RC, Sun M, Rinaldo D, Ogra PL. Respiratory syncytial virus-specific IgE responses following infection: evidence for a predominantly mucosal response. *Pediatr Res* 1985;19:420-4.
145. Welliver RC, Wong DT, Sun M, Middleton Jr E, Vaughan RS, Ogra PL. The development of respiratory syncytial virus-specific IgE and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. *N Engl J Med* 1981;305:841-6.
146. Wohl MEB, Chernick V. Bronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:759-81.

## ANEXO 2

### TERMO DE CONSENTIMENTO

**Informamos que seu (sua) filho (a) é candidato a ser incluído (a) numa pesquisa sobre a doença chamada Bronquiolite. Em caso de participação na pesquisa, seu (sua) filho (a) será acompanhado (a) desde a hospitalização até a alta hospitalar. Serão realizados os exames que rotineiramente são feitos em crianças com esta doença, incluindo exames de sangue e radiografias. Além desses, serão acrescentados: um exame de sangue e um exame da secreção nasal (obtido por aspiração das narinas). Para o exame de sangue será utilizada a mesma coleta que é feita para os exames de rotina, assim como para a secreção nasal, que também é feita na rotina assistencial. Os resultados dos exames**

**serão fornecidos durante a hospitalização e no  
acompanhamento ambulatorial.**

A participação ou recusa é livre, não determinando qualquer alteração no atendimento à criança.

Assinatura:

## TIPOS DE CIRURGIAS DOS CONTROLES

1. Píloroplastia
2. Correção de mielocistocele sacral
3. Correção de hérnia diafragmática
4. Correção de hipospádia
5. Plastia nos dedos das mãos
6. Funduplicatura
7. Derivação ventrículo-peritoneal
8. Correção de hipospádia
9. Derivação ventrículo-peritoneal
10. Correção de cranioestenose
11. Dilatação de estenose traqueal congênita
12. Derivação ventricular externa
13. Funduplicatura
14. Funduplicatura
15. Correção de cranioestenose
16. Correção de estrabismo
17. Píloromiotomia
18. Derivação ventrículo-peritoneal
19. Correção de hipospádia
20. Funduplicatura
21. Funduplicatura
22. Retirada de derivação ventrículo-peritoneal
23. Ressecção de cisto ovariano
24. Correção de imperfuração anal
25. Correção de meningomielocele
26. Fechamento de cólon
27. Ressecção de malformação adenomatóide cística
28. Abaixamento de cólon
29. Entero-entero anastomose
30. Funduplicatura
31. Cirurgia de Kasai

## ANEXO 4

### VALORES DE INTERLEUCINA-2 NA SECREÇÃO NASOFARÍNGEA

| CASOS | GRUPO | IL2(ng/ml) |
|-------|-------|------------|
|-------|-------|------------|

|      |         |
|------|---------|
| 1.00 | 78.4    |
| 1.00 | 18.2    |
| 1.00 | 731.1   |
| 1.00 | 3172.5  |
| 1.00 | 189.9   |
| 1.00 | 457.3   |
| 1.00 | 8.4     |
| 1.00 | 159.3   |
| 1.00 | 5.1     |
| 1.00 | 127.2   |
| 1.00 | 97.0    |
| 1.00 | 67.6    |
| 1.00 | 3596.3  |
| 1.00 | 2.1     |
| 1.00 | 95.3    |
| 1.00 | 6104.8  |
| 1.00 | 581.6   |
| 1.00 | 112.7   |
| 1.00 | 2955.3  |
| 1.00 | 750.0   |
| 1.00 | 2.0     |
| 1.00 | 5061.5  |
| 1.00 | 11.0    |
| 1.00 | 9.7     |
| 1.00 | .4      |
| 1.00 | 40256.1 |
| 1.00 | 25779.5 |
| 1.00 | 2334.2  |
| 1.00 | 2.3     |
| 1.00 | 159.9   |
| 1.00 | 725.6   |
| 1.00 | 55.8    |
| 1.00 | 130.8   |
| 1.00 | 83.4    |
| 1.00 | .0      |
| 1.00 | 176.0   |
| 1.00 | 10.5    |

|      |        |
|------|--------|
| 1.00 | 124.1  |
| 1.00 | .0     |
| 1.00 | 2410.2 |
| 1.00 | .0     |
| 1.00 | 8.7    |
| 1.00 | 28.4   |
| 1.00 | 4.4    |
| 1.00 | 2.3    |
| 1.00 | 1050.6 |
| 1.00 | 152.3  |
| 1.00 | 33.2   |
| 1.00 | 412.3  |
| 1.00 | .0     |
| 1.00 | 8.6    |
| 1.00 | 3.2    |
| 1.00 | .0     |
| 1.00 | .0     |
| 1.00 | 159.9  |
| 1.00 | 88.6   |
| 1.00 | 67.6   |
| 1.00 | .0     |
| 1.00 | 271.6  |
| 1.00 | .1     |
| 1.00 | 627.0  |
| 1.00 | .0     |

| CONTROLES | GRUPO | IL2 (ng/ml) |
|-----------|-------|-------------|
|-----------|-------|-------------|

|      |        |
|------|--------|
| 2.00 | 2164.1 |
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | 112.7  |
| 2.00 | 306.7  |
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | 55.3   |
| 2.00 | 77.7   |
| 2.00 | 1112.1 |
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | 307.6  |
| 2.00 | 232.5  |
| 2.00 | 30.5   |
| 2.00 | .2     |
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | 6.8    |
| 2.00 | 87.0   |
| 2.00 | 127.2  |
| 2.00 | 585.4  |
| 2.00 | 660.8  |

|      |        |
|------|--------|
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | 112.7  |
| 2.00 | 8.4    |
| 2.00 | 6.8    |
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | 9912.7 |
| 2.00 | .0     |
| 2.00 | 3.6    |
| 2.00 | 1910.3 |