

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

IMPACTO DOS VÍRUS RESPIRATÓRIOS NAS EXACERBAÇÕES RESPIRATÓRIAS
DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM FIBROSE CÍSTICA

VIVIANE MAURO CORRÊA MEYER

Rio de Janeiro
Abril de 2019

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Viviane Mauro Corrêa Meyer

Impacto dos Vírus Respiratórios nas Exacerbações Respiratórias de Crianças e Adolescentes com Fibrose Cística

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Medicina Tropical

Orientador: Prof. Dr. Fernando do Couto Motta

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Fernandes Barreto Machado Costa

RIO DE JANEIRO

Abril de 2019

Meyer, Viviane Mauro Corrêa.

Impacto dos Vírus Respiratórios nas Exacerbações Respiratórias de Crianças e Adolescentes com Fibrose Cística / Viviane Mauro Corrêa Meyer. - Rio de Janeiro, 2019.
xii,86f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientador: Fernando do Couto Motta.

Co-orientadora: Costa Patricia Fernandes Barreto Machado.

Bibliografia: f. 57-71

1. Fibrose Cística. 2. Influenza Humana. 3. Rinovírus. 4. Vírus Sincicial Respiratório. I. Título.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: Viviane Mauro Corrêa Meyer

Impacto dos Vírus Respiratórios nas Exacerbações Respiratórias de Crianças e Adolescentes com Fibrose Cística

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando do Couto Motta

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Patricia Fernandes Barreto Machado Costa

Aprovada em: 26/04/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Maria Halina Ogrzewalska - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro (UFRJ)

Prof. Dr. Clemax Couto Sant'Anna (UFRJ)

Prof. Dr. Patricia Carvalho de Sequeira (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Ana Alice Amaral Ibiapina Parente (UFRJ)

Rio de Janeiro, 26 de abril de 2019

Ao meu marido Felipe, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Fernando, pela confiança, dedicação, paciência, e pelas palavras de incentivo que nunca me deixaram desanimar.

À minha coorientadora, Dr^a Patricia, pelos ensinamentos desde a graduação, conselhos inestimáveis e amizade sincera.

À todos do Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, pela ajuda no processamento de amostras, em especial Jonathan, Priscila, Tânia e Bráulia. Ao Dr. Camacho, pela orientação das análises estatísticas.

À toda equipe de pneumologia do Instituto Fernandes Figueira, em especial Dr^a Tânia Folescu, por seus valiosos ensinamentos, por cultivarem em mim o amor por esta especialidade, e por me acolherem de volta com tanto carinho neste projeto.

Ao Ministério da Saúde e à FIOCRUZ pelo apoio financeiro (projetos 25030.000964/2014-68 e 33781.0550001170-14).

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todos os objetivos, e me ensinaram a acreditar que posso alcançá-los. Obrigada pelo amor e carinho, e por sempre me incentivarem a sonhar com a carreira acadêmica.

Ao meu marido Felipe, que me ajudou em cada etapa deste caminho, da decisão de aplicar ao mestrado à formatação do trabalho final. Com você divido esta e todas as aventuras que estão por vir.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**IMPACTO DOS VÍRUS RESPIRATÓRIOS NAS EXACERBAÇÕES
RESPIRATÓRIAS DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Viviane Mauro Corrêa Meyer

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética, multissistêmica, crônica e progressiva, que cursa com doença pulmonar crônica supurativa. A principal causa de morbimortalidade nesta doença são as exacerbações respiratórias (ER), isto é, períodos de piora aguda dos sintomas pulmonares. Embora classicamente atribuídas às infecções bacterianas, frequentes nestes pacientes, os vírus respiratórios vêm ganhando importante reconhecimento de seu papel etiopatogênico. Neste estudo seccional, objetivamos identificar a prevalência de vírus respiratórios em crianças de 0 a 17 anos com FC acompanhadas no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, no Rio de Janeiro, que se apresentaram ao hospital preenchendo critérios de ER. Todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão concordaram em participar e tiveram amostras de swab combinado de naso e orofaringe coletados e enviados ao Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo do Instituto Oswaldo Cruz para pesquisa de Adenovírus, Vírus Influenza A e B, Vírus Parainfluenza 1, 2 e 3, Vírus Sincicial Respiratório (VSR), Metapneumovírus e Rinovírus/Enterovírus/Coxsackie Vírus, por RT-PCR e Imunofluorescência. Foram obtidas 70 amostras de 48 pacientes, das quais 35,7% foram positivas para vírus respiratórios. Os Rinovírus/Enterovírus/Coxsackie Vírus foram os mais frequentes (28% das amostras positivas), seguidos de VSR. Comparando-se o grupo positivo para vírus com o negativo, o primeiro foi mais jovem, embora sem significância estatística, e teve maior associação com sintomas catarrais ($p=0,03$). Quando analisados os pacientes menores de 5 anos, o grupo positivo para vírus teve maior associação com febre ($p=0,01$). Apesar de não alcançar significância estatística, as detecções virais foram mais frequentes em pacientes previamente colonizados por *Pseudomonas aeruginosa* e esta bactéria foi cultivada com mais frequência no grupo positivo para vírus. Não houve diferença significativa nos indicadores de gravidade, como internação hospitalar, queda de saturação de oxigênio e *Cystic Fibrosis Clinical Score*, entre os grupos positivo e negativo. São necessários mais estudos prospectivos a fim de avaliar o impacto a longo prazo das infecções virais nos pacientes com FC, assim como sua interação com o microbioma bacteriano.

Palavras Chave: Fibrose Cística; Influenza Humana; Rinovírus; Vírus Sincicial Respiratório

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMPACT OF RESPIRATORY VIRUS IN PULMONARY EXACERBATIONS OF CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Viviane Mauro Corrêa Meyer

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic, multissystemic, progressive disease, that causes chronic suppurative lung disease. The main cause of morbimortality in this disease are pulmonary exacerbations, which are periods of acute worsening of respiratory symptoms. Although classically attributed to bacterial infections, which are frequent in CF patients, respiratory virus have been increasingly recognized in its etiopathogeny. In this sectional study, we aimed to identify the prevalence of respiratory virus in children aged 0 to 17 years with CF, followed up at the Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, in Rio de Janeiro, who presented at the hospital with pulmonary exacerbation criteria. All patients who fulfilled the inclusion criteria agreed to participate, and had a combined nasal and oral swab collected. The swabs were then sent to Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo of Instituto Oswaldo Cruz, where they were submitted to immunofluorescence and RT-PCR for Adenovirus, Influenza A and B, Respiratory Syncytial Virus (RSV), Metapneumovirus, Rhinovirus/enterovirus/coxsackievirus. There were 70 samples collected from 48 patients, of which 35,7% were positive for respiratory virus. Rhinovirus/enterovirus/coxsackievirus were the most common (28% of all positive samples), followed by RSV. The virus positive group was younger, although not statistically significant, and was associated with upper respiratory tract symptoms ($p=0,03$). Considering only patients younger than five years old, the virus detection was associated with fever ($p=0,01$). Even though not statistically significant, viral detections were more frequent in patients previously colonized by *P. aeruginosa*, and this bacteria was cultured more frequently in the positive group. There was no significant difference in gravity markers, such as hospital admission, low oxygen saturation and Cystic Fibrosis Clinical Score, between positive and negative groups. Prospective studies are needed to assess the long term impact of viral infections in patients with CF, and their interaction with the bacterial microbiome in these patients.

Key Words: Cystic Fibrosis; Human Influenza; rhinovirus; respiratory syncytial viruses.

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 A Fibrose Cística	1
1.2 Os vírus respiratórios e a FC	4
1.3 Os vírus respiratórios e as exacerbações respiratórias	6
1.4 Os Vírus Respiratórios	11
1.4.1 Vírus Sincicial Respiratório	11
1.4.2 Metapneumovírus Humano	12
1.4.3 Adenovírus	13
1.4.4 Vírus Influenza	13
1.4.5 Vírus Parainfluenza	14
1.4.6 Coronavírus Humano	15
1.4.7 Rinovírus	15
2- JUSTIFICATIVA	17
3- OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4- MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 População	19
4.2 Critérios de Inclusão	19
4.3 Critérios de Exclusão	19
4.4 Local	19
4.5 Desenho do Estudo	20
4.5.1 Considerações Éticas	21
4.5.2 Análises Bacteriológicas	21
4.5.3 Coleta das Amostras Clínicas	21
4.5.4 Imunofluorescência Direta	22
4.5.5 Diagnóstico Molecular	23
4.5.5.1 Extração dos Ácidos Nucleicos	23
4.5.5.2 RT-PCR	23
4.5.6 Análise do resultados	24
5- RESULTADOS	28
6- DISCUSSÃO	45
6.1 Prevalência dos Vírus Respiratórios	45
6.2 Características Epidemiológicas da Amostra	48
6.3 Relação da Detecção Viral com Cultura Bacteriana	50
6.4 Características Clínicas e Avaliação da Gravidade	51

7- CONCLUSÕES.....	55
8- PERSPECTIVAS.....	56
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE A - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para Crianças de 6 a 12 anos.....	72
APÊNDICE B -Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para Adolescentes de 13 a 17 anos.....	74
APÊNDICE C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76
ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do IFF.....	79
ANEXO B- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do IOC	82
ANEXO C- Fichas de Protocolo de RT-PCR	85

LISTA DE FIGURAS

Gráfico 1- Resultado da pesquisa viral por RT-PCR e Imunofluorescência direta.....	31
Gráfico 2- Distribuição mensal das amostras e resultados obtidos.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das Mutações do Gene CFTR.....	2
Tabela 2- Sequências de <i>primers</i> direto, reverso e sondas utilizados no RT-PCR para identificação e subtipagem dos vírus Influenza A e B.....	25
Tabela 3- Sequências de <i>primers</i> direto, reverso e sondas utilizados na reação de RT-PCR de vírus respiratórios não influenza.....	26
Tabela 4- Ciclagem utilizada nas reações de RT-PCR.....	27
Tabela 5- Características demográficas dos pacientes, dados diagnósticos e tratamento utilizado.....	29
Tabela 6- Frequência das mutações do gene CFTR na população do estudo com sequenciamento genético realizado.....	30
Tabela 7- Descrição da idade, tempo de sintomas, resultado de Ct (RT-PCR) e imunofluorescência para vírus respiratórios e de cultura bacteriana, das amostras positivas para vírus respiratórios.....	32
Tabela 8- Características clínico-epidemiológicas dos grupos positivo e negativo para detecção viral.....	34
Tabela 9- Características clínico epidemiológicas dos indivíduos infectados por cada vírus especificamente.....	36
Tabela 10- Resultado da cultura bacteriana de secreção respiratória em comparação com amostras positivas e negativas para vírus respiratórios	39
Tabela 11- Comparação do resultado da cultura bacteriana do momento da exacerbação em relação ao resultado imediatamente anterior.....	40
Tabela 12- Resultado da cultura para <i>P. aeruginosa</i> na primeira coleta de secreção respiratória após a exacerbação.....	40
Tabela 13- Características clínico-epidemiológicas dos pacientes menores de cinco anos de idade de acordo com a detecção viral positiva ou negativa.....	40
Tabela 14- Resultado da cultura bacteriana na secreção respiratórias dos pacientes menores de 5 anos de idade.....	43
Tabela 15- Características dos grupos positivo e negativo para vírus respiratórios, excluído rinovírus.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AdV	Adenovírus
BGNMF	Bacilo Gram Negativo Não Fermentador
CDC	Center for Disease Control
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFCS	Cystic Fibrosis Clinical Score
CFF	Cystic Fibrosis Foundation
CFTR	Regulador Transmembrana da Fibrose Cística
CFQ-R	Cystic Fibrosis Questionnaire Revised
CT	Threshold Cycle
ER	Exacerbação Respiratória
FC	Fibrose Cística
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Flu	Vírus Influenza
GBEFC	Grupo Brasileiro de Estudos da Fibrose Cística
hBoV	Bocavírus
hCoV	Coronavírus
hMpV	Metapneumovírus
IATRI	Infeção Aguda do Trato Respiratório Inferior
IF	Imunofluorescência
IFF	Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
IMC	Índice de Massa Corporal
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IVAS	Infeção de Vias Aéreas Superiores
LVRs	Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio – Coronavírus
MS	Ministério da Saúde
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIV	Vírus Parainfluenza
RT-PCR	Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase com Detecção em Tempo Real
RV	Rinovírus

SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus
SG	Síndrome Gripal
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SUS	Sistema Único de Saúde
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIR	Trispsina Imunorreativa
VEF1	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

1- INTRODUÇÃO

1.1 A Fibrose Cística

A Fibrose Cística (FC) é uma doença multissistêmica, crônica e progressiva. Sua transmissão é genética de herança autossômica recessiva, sendo mais frequente em descendentes de caucasianos europeus (CUTTING & ZEITLIN, 2012). Sua incidência estimada no Brasil é de 1: 7.576 casos por nascidos vivos (ATHANAZIO et al., 2017). O mais recente relatório anual do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (GBEFC, 2017), publicado pelo Grupo Brasileiro de Estudos em Fibrose Cística (GBEFC) a partir de registros realizados nos centros de referência para tratamento da FC, contou com 4.654 pacientes, sendo a maior concentração de casos nas regiões Sudeste (GBEFC, 2017).

A doença ocorre por uma mutação no gene CFTR (Regulador de Condutância Transmembrana da Fibrose Cística), localizado no braço longo do cromossomo sete no locus q31. Este gene codifica a proteína CFTR, um canal transmembrana condutor de cloro, presente em células das glândulas sudoríparas, intestino, pâncreas, sistema respiratório e gênito-urinário. Estão descritas mais de 2000 mutações do gene, divididas em cinco classes de acordo com seu efeito na estrutura e função da proteína CFTR, descritos na , descritos na Tabela 1 (CUTTING & ZEITLIN, 2012).

A variação do efeito das diferentes mutações bem como alterações metagenéticas e influências ambientais fazem com que a FC possa apresentar grande espectro de manifestações fenotípicas (FARREL et al., 2017; SOSNAY & FARREL, 2015). Os quadros clínicos mais comuns incluem doença pulmonar crônica, sinusopatia crônica, insuficiência pancreática exócrina, desnutrição, obstrução intestinal/íleo meconial e infertilidade masculina (CUTTING & ZEITLIN, 2012).

Tabela 1- Classificação das mutações do gene CFTR

Classe da mutação da CFTR^a	Características
I	Ateração na transcrição do gene CFTR levando a ausência total ou quase total da proteína funcional
II	Defeito do processamento da CFTR, formando uma proteína defeituosa que é degradada pela célula
III	Defeito da regulação da CFTR por alteração de sua interação com ATP, levando a presença de CFTR disfuncional na membrana
IV	Proteína CFTR com condutância reduzida para Cloro
V	CFTR de função normal, porém em quantidade reduzida

a- Regulador de Condutância Transmembrana da Fibrose Cística

O diagnóstico da FC é realizado a partir de suspeita clínica, teste de triagem neonatal (dosagem da tripsina imunorreativa -TIR) alterado ou história familiar positiva, somada a exame complementar que demonstre disfunção da CFTR. Estes devem ser preferencialmente o teste do suor ou a identificação de duas mutações causadoras da doença, aceitando-se também, em casos indeterminados, o diferencial de potencial nasal e a medida de corrente intestinal (FARREL et al., 2017). A introdução da dosagem da TIR no programa de triagem neonatal brasileiro ocorreu em 2013, e resultou em importante aumento de diagnósticos e redução da idade em que este é feito (GBEFC, 2017).

Não há, até o momento, tratamento curativo para a FC, sendo o manejo da doença feito a partir de tratamento e prevenção de infecções respiratórias, reposição de enzimas pancreáticas, suporte nutricional e ventilatório, otimização da expectoração com mucolíticos (como alfa dornase e salina hipertônica) e fisioterapia respiratória. Além disso, existem novas drogas, que atuam como corretores ou potencializadores da CFTR, porém ainda de disponibilidade limitada, de alto custo e específicos para algumas mutações (CUTTING & ZEITLIN, 2012). Trata-se de uma condição grave, sendo a idade média de óbito no Brasil 18,7 anos (GBEFC, 2017). Entretanto, a expectativa e qualidade de vida destes pacientes tem melhorado de forma considerável nos últimos anos, com o surgimento de novas drogas,

diagnóstico precoce e avanços nos exames complementares, somados a uma melhor compreensão da doença (CFF, 2018; GBEFC, 2017).

A doença pulmonar é a principal causa de morbimortalidade na FC. Acredita-se que sua origem decorra da hiperabsorção de sódio e não absorção de cloro na mucosa das vias aéreas, conseqüente à disfunção da CFTR, provocando a desidratação das secreções periciliares. Isto resulta em uma redução do *clearance* mucociliar permitindo proliferação bacteriana e infecção. Associado a infecção, estabelece-se um estado pró-inflamatório, com infiltrado predominantemente neutrofilico, formando-se um ciclo vicioso de inflamação e infecção que leva à injúria pulmonar (GOSS & BURNS, 2007). Estas características levam ao desenvolvimento de um microbioma pulmonar diferenciado nestes pacientes. Historicamente acreditava-se que a colonização bacteriana do trato respiratório na FC se restringia a apenas alguns patógenos considerados “típicos”: *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* nos primeiros anos de vida, com progressão para Gram negativos, principalmente *Pseudomonas aeruginosa*, além de *Burkholderia cepacea*. No entanto, com desenvolvimento de tecnologias moleculares verificou-se que a colonização é polimicrobiana, incluindo também bactérias dos gêneros *Veillonella*, *Streptococcus*, *Gemella* e *Prevotella*. Ainda assim, o microbioma de crianças com FC diverge daquele observado em crianças hígdas por ser menos diverso, fator que é agravado com a idade e progressão de doença (CARMODY et al., 2015; COSTA et al., 2018; FRAYMAN et al., 2017; KERAVEC et al., 2015).

Faz parte do acompanhamento da FC a coleta regular de secreção respiratória (por swab orofaríngeo ou escarro), com frequência mínima trimestral, para monitorização da colonização bacteriana. São de maior preocupação a aquisição de *P. aeruginosa*, *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) e *B. cepacea*, pois estão associados a um maior declínio clínico e de função pulmonar. Quando estas bactérias são isoladas na secreção respiratória de um paciente, é indicado o tratamento de erradicação com antibioticoterapia, independente da presença de sintomas no momento. Após repetidas tentativas de erradicação sem sucesso, o paciente pode passar a ser considerado cronicamente colonizado (ATHANAZIO et al., 2017). Recentemente, as bactérias *Achromobacter xylosoxidans* e *Stenotrophomonas maltophilia* também tem ganhado importância clínica como possíveis fatores de piora clínica, ainda não havendo consenso em relação a protocolos de erradicação das mesmas.

Na história natural da doença, os períodos de piora aguda dos sintomas respiratórios são referidos como exacerbações respiratórias (ER). Não há um consenso sobre a sua

definição (BHATT, 2013; BILTON et al.; 2011), porém uma das mais amplamente difundidas é a de Fuchs et al. (1994), que estabelece como ER a presença de pelo menos quatro dos seguintes critérios: mudança nas características do escarro (coloração ou quantidade); nova hemoptise ou piora se pré-existente; aumento da tosse; aumento da dispnéia; prostração, fadiga ou letargia; temperatura $>38^{\circ}\text{C}$; anorexia ou perda de peso; dor ou sensibilidade sinusal; mudanças no exame físico torácico; queda da função pulmonar representada pelo Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (VEF1) em 10% e relação ao último valor registrado; alterações radiográficas sugestivas de infecção. Estertores e sibilos pulmonares são auscultados com frequência, porém sua ausência não exclui o diagnóstico. No caso de exacerbações leves, o tratamento pode ser feito com antibioticoterapia via oral em ambiente domiciliar. No entanto, na presença de desconforto respiratório significativo, hipoxemia ou intolerância à medicação oral, é necessário o emprego de antibióticos por via endovenosa, geralmente em ambiente hospitalar. Além do tratamento antimicrobiano podem ser ainda necessários oxigenioterapia, suporte ventilatório com ventilação não invasiva ou, nos casos mais graves, ventilação mecânica (ATHANAZIO et al. 2017).

1.2 Os vírus respiratórios e a FC

Os vírus respiratórios são sabidamente os agentes etiológicos mais prevalentes nas infecções respiratórias agudas na infância, independente da presença de comorbidades (BLACK et al., 2010). As infecções por vírus respiratórios ocorrem nos pacientes com FC com frequência semelhante à da população geral (EWIJK et al., 2008; HIATT et al., 1999; KORTEN et al., 2018; RAMSEY et al., 1989; WANG et al., 1984). No entanto, pacientes com FC apresentam maior proporção de infecções do trato respiratório inferior e de internação hospitalar (HIATT et al. 1999), além de maior duração de sintomas de via aérea inferior e pior escore de gravidade por episódio (EWIJK et al. 2008). Deste modo, estes agentes causam maior morbidade nesta população. Parte desta maior morbidade pode estar relacionada à interação dos vírus com a população bacteriana que frequentemente coloniza o trato respiratório inferior na FC. Sabe-se que a presença de bactérias pode influenciar a resposta à infecção viral, aumentando a expressão celular de receptores para vírus e atuando sinergicamente na indução de citocinas pró inflamatórias (BELLINGHAUSEN et al. 2016). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a resposta imune inata anti-viral pode estar

prejudicada nas células epiteliais de portadores de FC. Estes indivíduos apresentam menor produção de óxido nítrico, levando a menor inibição da replicação viral e menor *clearance* viral (COLASURDO et al., 2006; ZHENG et al., 2003). Apresentam também uma maior liberação de Interleucina-8 e redução da resposta apoptótica, que resultam em aumento da inflamação de via aérea (SUTANTO et al., 2011). Diferentes vírus foram correlacionados também com aumento ou redução da resposta da via do Interferon (SCHÖGLER et al., 2016).

Do mesmo modo, as infecções virais têm impacto no risco e prognóstico das infecções bacterianas do trato respiratório inferior. Estes agentes afetam a frequência e coordenação dos batimentos ciliares, além de induzirem aumento na produção de muco, o que prejudica o *clearance* mucociliar e favorece a proliferação de bactérias (BELLINGHAUSEN et al., 2016). A perda de integridade da barreira epitelial do trato respiratório, secundária à inflamação e morte celular, e as alterações da resposta imunológica, ambos secundários à infecção viral, também favorecem a infecção bacteriana (HANADA et al., 2018). A infecção bacteriana pode ainda ser facilitada pelo aumento da expressão de receptores para bactérias nas células infectadas por vírus, e até pelo uso de estruturas virais como agentes de ligação para invasão celular. Por fim, as alterações que os vírus causam no microambiente, como a elevação da temperatura e a variação na disponibilidade de micronutrientes, podem predispor a infecção bacteriana (BELLINGHAUSEN et al., 2016), assim como as alterações no microbioma pulmonar (HANADA et al., 2018).

No caso específico da FC, observa-se uma maior resposta de citotoxicidade nas infecções virais em pacientes colonizados por *P. aeruginosa* (KIENINGER et al., 2012). A infecção prévia ou concomitante por Vírus Sincicial Respiratório (VSR) potencializa a adesão de pseudomonas às células epiteliais e a formação de biofilme. Este fenômeno também foi observado com Rinovírus (RV) e Adenovírus (AdV), e pode ser decorrente de um aumento da produção de interferon e da liberação de ferro pelas células do epitélio respiratório (HENDRICKS et al., 2016). Foi observado que o RV pode ainda provocar o efeito inverso: aumentar a liberação de bactérias do gênero *Pseudomonas* do biofilme, induzindo formas mais proinflamatórias, por conta do estresse oxidativo e do aumento de liberação de citocinas induzidos por este vírus (CHATTORAJ et al., 2011). Corroborando estes resultados, Kiedrowski et al. (2018) associaram a infecção por VSR e RV ao crescimento do biofilme de *S. aureus* nos pacientes avaliados. Por outro lado, Chin et al. (2015) não encontraram diferença na densidade de *Pseudomonas* em pacientes com ou sem infecção viral.

1.3 Os vírus respiratórios e as exacerbações respiratórias

As ER são eventos de grande importância na FC por provocarem alta morbimortalidade. Historicamente, são atribuídas ao isolamento de um novo agente ou a um aumento da população bacteriana já instalada no sistema respiratório do indivíduo com FC (CHIN et al., 2015). Os primeiros estudos que investigaram o papel dos vírus respiratórios nas ER utilizaram metodologias de Imunofluorescência Direta (IF), sorologia e/ou isolamento viral. A maioria encontrou baixas taxas de detecção de vírus, com predomínio de infecções bacterianas. Ong et al. (1989), por exemplo, estudaram 36 pacientes adultos com FC, coletando amostras de sangue e secreção respiratória durante episódios de síndrome gripal. Houve identificação de algum vírus em apenas 13% das 92 das amostras usando-se IF. Do mesmo modo, Petersen et al. (1981) identificaram soroconversão para vírus respiratórios (VSR, Vírus Parainfluenza (PIV), Vírus Influenza (Flu) e AdV) em apenas 20% das exacerbações investigadas, enquanto bactérias foram identificadas em 76% dos casos, sendo a mais comum *P. aeruginosa*, identificada em 51%. Clifton et al. (2008) avaliaram conversão sorológica para vírus respiratórios de pacientes com FC após tratamento de ER com antibioticoterapia venosa durante período de 10 anos. Dentre 2.398 casos, apenas 4,8% tiveram sorologia positiva para os vírus testados.

Já Smyth et al. (1995), ao incluírem Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para RV além dos métodos anteriormente citados, obtiveram uma maior taxa de detecção viral em quadros de coriza ou piora da tosse de indivíduos com FC menores de 20 anos. De 157 amostras, 28% foram positivas para algum dos vírus testados, sendo RV o mais comum (56,8%), seguido de PIV 1 e Influenza (11,4% cada). Não houve diferença de idade, sexo, colonização por *Pseudomonas*, estado nutricional ou queda da função pulmonar entre os grupos positivo e negativo para vírus, porém o grupo positivo apresentou maior queda do escore de Shwachman e mais dias de antibiótico venoso.

Por outro lado, alguns estudos que avaliaram apenas crianças muito jovens, diagnosticadas por triagem neonatal, encontraram taxas mais expressivas de detecção viral e baixa colonização bacteriana. Armstrong et al. (1998) coletaram 31 amostras de aspirado nasofaríngeo ou lavado broncoalveolar de crianças com FC menores de um ano de idade, em sua primeira internação por ER. Destas, 51% foram positivas para vírus, sendo VSR o mais comum. Do mesmo modo, Abmann et al (1988), dentre 30 hospitalizações de lactentes com

FC, identificou vírus em 40%, sendo RSV o mais comum (23%). Em ambos estudos *S. aureus* foi a bactéria cultivada com maior frequência.

Fazendo uma análise retrospectiva da literatura, fica claro que com a inclusão das tecnologias moleculares, os novos estudos redimensionaram a importância dos vírus respiratórios na FC. Houve um aumento significativo da taxa de detecção viral nestes pacientes, sendo demonstrado em alguns trabalhos que os vírus podem inclusive ser mais frequentes que bactérias nesta população. Dentre os vírus respiratórios comumente testados, o RV obteve especial destaque, sendo o mais encontrado em diversas investigações (MIRÓ-CANÍS, 2017). Outros vírus como Epstein Barr, Varicela Zóster, Herpes Simples, Citomegalovírus, Bocavírus (HBoV) e Poliomavírus foram esporadicamente identificados, e parecem ter papel secundário na etiologia das ER (SCHEITHAUER et al., 2010).

Novos estudos também demonstraram uma frequência maior de identificação viral durante as ERs. No Canadá, Asner et al. (2012) avaliaram amostras de 43 crianças com FC em ER. Destas 60,5% testaram positivas para ao menos um tipo de vírus, e 34,6% apresentaram coinfeção viral. Os Coxsackie/Echovírus e VSR A e B foram os mais frequentes, ambos encontrados em 34,6% das amostras, seguidos de RV (23%). Os Coronavírus (hCoV) e Metapneumovírus (hMPV) foram identificados apenas em coinfeções. O grupo positivo se associou a infecções em idade mais jovem, presença de febre, maiores escores clínicos de gravidade (Cystic Fibrosis Clinical Score - CFCS) e menores escores clínicos de qualidade de vida (Cystic Fibrosis Questionnaire Revised- CFQ-R). Não houve diferença da colonização bacteriana entre os dois grupos. Já Collinson et al. (1996) detectaram Picornavírus em 51% de 119 amostras respiratórias de crianças com FC apresentando infecção de vias aéreas superiores (IVAS). O RV foi especificamente identificado em 18%. Não houve, no entanto, diferença da queda de função pulmonar entre os grupos positivo e negativo para vírus. Jones et al. (2011) encontraram 47,2% de positividade para vírus nas amostras de 53 pacientes com FC e sintomas de doença respiratória viral aguda. RV foi de novo o agente mais frequente (24,5%), seguido de influenza A e B (11,2%), PIV 3 e AdV (3,8% cada) e VSR e hMPV (1,9% cada). No único estudo brasileiro de nosso conhecimento, De Almeida et al. (2010) acompanharam 103 crianças com FC durante um ano, coletando amostras de secreção nasofaríngea em consultas de rotina (n=266) e ER (n=142). Foram encontrados nos dois grupos 22% e 72% de positividade para vírus, respectivamente, sendo o RV o mais identificado em ambos os cenários. Na mesma

amostragem de pacientes descreveu-se a identificação dos hCoV: NL63 (8 casos), OC43 (6 casos), HKU1 (4 casos) e 229E (1 caso) (DA SILVA FILHO et al., 2012).

Com objetivo de identificar a interferência da coleta na identificação viral em pacientes de FC, Emerson et al. (2013) compararam a coleta de swabs de pacientes com FC de 6 a 18 anos com sinais de doença respiratória aguda em casa (43) e na clínica (18). Foram positivos para algum vírus respiratório 50% dos swabs coletados na clínica e 81% dos coletados em casa. Em ambos os casos, RV foi o mais comum (73% de todas as coletas). Os swabs coletados no domicílio apresentaram maior taxa de positividade, provavelmente devido ao tempo de coleta mais próximo ao início dos sintomas.

O aumento da taxa de detecção viral se manteve mesmo quando avaliados adolescentes e adultos, com maior frequência de colonização por *Pseudomonas*. Avaliando amostras coletadas apenas no outono e inverno, Ramirez et al. (2014) identificaram vírus respiratórios em 38,8% de 36 amostras de pacientes com ER de 12 a 36 anos. O vírus mais comum foi RV (64%), seguido de influenza A. RV, junto aos enterovírus, também foram os mais frequentes no estudo de Hoek et al (2013), no qual 8 de 24 pacientes adultos com ER apresentaram infecção viral. Num estudo com adultos colonizados por *Pseudomonas*, Chin et al. (2015) identificaram vírus respiratórios em 50% de 30 exacerbações. Novamente RV foi o mais frequente (67%), seguido de hCoV (14%), VSR (13%) e PIV (7%). Ainda em relação à população adulta, Flight et al. (2014) avaliaram 98 indivíduos em consultas de rotina (397 amostras) e ER (229 amostras). Foram identificados vírus em 40% das ER e 24% das amostras de rotina. A identificação de vírus se associou à presença de ER e à maior prescrição de antibióticos, além de presença de outras crianças no domicílio e homozigose para mutação F508del. As exacerbações com vírus se associaram a menor queda de VEF1. Em contrapartida, Cousin et al. (2016), encontraram associação entre positividade para vírus respiratórios em geral, e rinovírus em particular, e a menor recuperação da função pulmonar em crianças com FC.

Goffard et al. (2014) identificaram vírus em 25% de 31 amostras de adultos em exacerbação, sendo RV e hCoV os mais comuns. Entretanto, a infecção por vírus não se relacionou com piora do índice de massa corporal (IMC), piora do score de Shwachman ou com alteração da colonização bacteriana. Uma menor taxa de detecção também foi encontrada em um estudo retrospectivo por Esther et al. (2014). Neste estudo foram avaliados os resultados de 235 lavados bronco-alveolares realizados em indivíduos com FC, entre 0 e 21

anos (idade média 7,9). Ao menos um vírus foi identificado em 28,5% dos exames, sendo os mais comuns RV/enterovírus (82,4%), seguidos de hMpV (3,3%) e PIV3 (1,3%). Pacientes com amostra positiva para vírus foram mais jovens e com maior chance de terem sintomas respiratórios como indicação do exame. No entanto, deve-se considerar que as amostras analisadas foram obtidas por broncoscopia, exame invasivo geralmente com indicação reservada a quadros mais graves ou protraídos, podendo não representar a real prevalência de infecção viral na população.

Estudos populacionais também corroboraram o papel de alguns vírus na morbidade pulmonar da FC. Somayaji et al. (2017) cruzaram os dados do registro americano de pacientes da *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) de 2003 a 2009, que inclui informações sobre as exacerbações dos 21.022 pacientes acompanhados, com dados da vigilância de vírus respiratórios do Center for Disease Control (CDC). Foi observado que um aumento da atividade de VSR na comunidade estava associado a um aumento na taxa de ER em crianças, e que o aumento da atividade de influenza estava associado ao aumento de ER em crianças e adultos. No entanto, o estudo não avaliou diretamente os resultados de pesquisa viral dos pacientes com FC, mas pode-se inferir que as taxas de vacinação contra influenza eram aquém do recomendado (SOMAYAJI et al., 2017). Do mesmo modo, Ortiz et al. (2010) cruzaram os dados do CFF com os dados de vigilância de influenza, encontrando aumento do risco de exacerbação na época de maior atividade deste vírus.

Além disso, outros estudos objetivaram comparar a identificação de vírus em momentos basais e durante ER, a fim de melhor avaliar seu papel causal. Wat et al. (2008) conduziram um estudo prospectivo multicêntrico por 17 meses no país de Gales, coletando amostras de secreção respiratória de crianças com FC em consultas de rotina (n=136) e em exacerbação (n=138), das quais 16,9% e 46% foram positivos para vírus, respectivamente. Os RV foram os mais comuns nos 2 grupos, seguidos de PIV. Dividindo-se os pacientes entre os grupos positivo e negativo para vírus, o primeiro apresentou maior presença de sintomas de IVAS e maior associação com exacerbação. Também neste estudo, não houve diferença entre os dois grupos em relação à colonização bacteriana. Já na amostragem de Stelzer - Braid et al. (2012), com idade média de 11,4 anos e avaliada durante a primavera, 46% de todos os casos (tanto basais quanto em ER) foram positivos para algum vírus, sendo o mais comum RV (35%), seguido por PIV3 e hMPV, influenza A e VSR (2,7% cada). Apenas o PIV foi correlacionado com a presença de exacerbação. Esposito et al. (2014) avaliou crianças de 7 a

25 anos (média 17 anos) com exacerbação (47) ou clinicamente estáveis (31). Dos pacientes com exacerbação 31,9% foram positivos para pelo menos 1 vírus, sendo o mais comum RV (21,3%), principalmente RV-A, seguido de influenza A, hMpV e hBoV. A presença dos vírus, no entanto, não se correlacionou com ER.

Um dos pontos de maior divergência entre os estudos diz respeito à associação do RV com as ER. Por ser o vírus mais identificado também em indivíduos assintomáticos, até mesmo naqueles sem FC, há grande debate sobre seu papel etiológico nas ER. Em um estudo prospectivo, Burns et al. (2012) acompanharam 44 crianças portadoras de FC de 6 a 18 anos, coletando amostras de rotina e durante exacerbação (definida pela necessidade de prescrição de antibiótico). Foram obtidas 359 amostras, das quais 30,1% foram positivas para algum vírus. RV foi o mais comum (23,1%), seguido de PIV (2%) e AdV (1,7%). O RV não foi associado estatisticamente com ER, porém se associou com alteração da ausculta respiratória e rinorréia. Já em outros estudos este vírus foi associado de forma significativa à presença de ER (GOFFARD et al., 2014; WAT et al., 2008;)

De forma semelhante, Stelzer - Braid et al. (2017) pesquisaram a presença de RV em crianças durante consultas de rotina e ER, divididas por idade em 2 coortes: <5 anos (51 pacientes com 119 amostras) e 5-17 anos (59 pacientes com 142 amostras). RV foi detectado em 37,1% das amostras do grupo mais jovem, incluindo 43% das exacerbações, e em 11,9% do grupo mais velho, incluindo 12% das exacerbações. RV-A foi o mais comum (69%). Não houve correlação entre a identificação de RV A ou C e a presença de ER, apesar da alta taxa de identificação deste em crianças jovens com ER. Associações diferentes com o risco de exacerbação também foram encontradas de acordo com o subtipo de RV. Para de De Almeida et al (2010), apenas os subtipos A2 e C se associaram a ER, enquanto que para Flight et al. (2014) o subtipo A conferiu pior prognóstico.

Deste modo, pode-se perceber que ainda há muita divergência entre os estudos em relação à frequência dos vírus respiratórios nas ER, seu papel na etiopatogenia e seu impacto na gravidade das mesmas. É provável que diversos fatores interajam nesta dinâmica, tais como colonização bacteriana, idade, status vacinal e grau de acometimento respiratório pela FC, resultando numa variabilidade de resultados entre estudos e populações.

1.4 Os Vírus Respiratórios

1.4.1 Vírus Sincicial Respiratório

O VSR é um vírus envelopado de genoma RNA fita simples com polaridade negativa pertencente à família *Pneumoviridae* (ICTV, 2018). Apresenta dois subgrupos, A e B, diferenciados principalmente pela proteína G (REZAEE et al., 2017). O vírus apresenta circulação sazonal, predominando no inverno e início da primavera. No Brasil sua sazonalidade é de março a julho nas Regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste e de abril a agosto na região Sul (SBP 2017). Globalmente o RSV é a principal causa de Infecção Aguda do Trato Respiratório Inferior (IATRI) na infância (NAIR et al., 2010), sendo responsável por cerca de 33,8 milhões de casos e 55-99 mil óbitos/ano no mundo (SHI et al. 2017). A maioria das crianças é infectada ainda no primeiro ano de vida e todas são expostas até o fim do segundo ano, sendo a infecção primária raramente assintomática (SBP, 2017). O quadro clínico varia de quadros leves a infecção grave com insuficiência respiratória (HALL, 2001), sendo a sintomatologia mais comum composta de tosse, febre e coriza, podendo evoluir com sibilos e taquidispnéia (SBP, 2017). A infecção natural em humanos confere uma imunidade protetora apenas parcial, sendo frequentes as reinfecções na infância. Estas reinfecções apresentam notadamente um menor risco de acometimento do trato respiratório inferior (HALL, 2001; MENG et al., 2014).

São considerados grupos de risco para maior morbimortalidade os prematuros e os portadores de cardiopatia congênita ou de doença pulmonar crônica da prematuridade (SBP, 2017). Uma possível relação de risco com a FC ainda não foi totalmente esclarecida, a despeito de novas evidências indicarem este vírus como importante causa de morbidade nesta população (METZ et al., 2017; SOMAYAJI et al., 2017).

Atualmente não há vacinas licenciadas contra o VSR (REZAEE et al., 2017) e a profilaxia disponível é o Palivizumabe (MedImmune®), um anticorpo monoclonal humanizado IgG1 produzido por DNA recombinante. Entretanto sua indicação pelo Sistema Único de Saúde (SUS) é restrita a alguns grupos de alto risco: prematuros nascidos com idade gestacional menor ou igual a 28 semanas no primeiro ano de vida; criança com cardiopatia congênita com repercussão hemodinâmica e necessidade de medicamentos específicos nos dois primeiros anos de vida; criança com broncodisplasia pulmonar e necessidade de farmacoterapia nos seis meses antecedentes, nos dois primeiros anos de vida (SBP 2017). O

uso do palivizumab na FC ainda é controverso. Diversos estudos indicaram benefícios em sua administração em lactentes, como redução do número de episódios de infecção respiratória aguda (BJORNSON et al., 2018; GROVES et al., 2016), redução do risco de internação hospitalar (GIEBELS et al., 2008) e redução da duração desta quando ocorra (BJORNSON et al., 2018), sendo tão benéfico quando nas indicações previstas pelo SUS (MITCHELL et al., 2018). No entanto, outros estudos não demonstraram redução na taxa de internação (BUCHS et al., 2017; LINNANE et al., 2015; WINTERSTEIN et al., 2013), além de questionarem seu custo-efetividade (MCGIRR et al., 2016). A Ribavirina é o único antiviral licenciado para o tratamento, porém com indicação limitada a infecções graves em imunodeprimidos, e com disponibilidade restrita no Brasil (HALL, 2001).

1.4.2 Metapneumovírus Humano

O hMpV é um vírus de genoma RNA fita simples com polaridade negativa pertencente a família *Pneumovirinae* (ICTV, 2018), descrito em 2001. São classificados em genótipos A e B, baseado em variações das proteínas G e F (PANDA et al., 2014; VAN DEN HOOGEN et al., 2001), cada genótipo abrigando dois subgrupos. Estes vírus são geneticamente e clinicamente semelhantes ao VSR. A primo-infecção é raramente assintomática, no entanto, o acometimento é frequentemente restrito às vias aéreas superiores, raramente alcançando as vias aéreas inferiores. Neste caso, as manifestações podem incluir febre, taquipneia, tosse e hipoxemia (KAHN, 2006; WILLIAMS et al., 2004). Este patógeno apresenta distribuição mundial, com aumento de circulação no fim do inverno e da primavera em locais de clima temperado, podendo o pico de sazonalidade coincidir com o do VSR (KAHN, 2006). Nos Estados Unidos a taxa de hospitalização estimada por este agente é de 1 a cada 1.000 crianças menores de 5 anos, sendo 3 a cada 1.000 menores de 6 meses. No Brasil um estudo com crianças internadas por infecção respiratória identificou hMpV em 6,4% das amostras, sendo a bronquiolite o diagnóstico mais comum na internação. Destes pacientes, 70% necessitaram de oxigênio suplementar e 40% de cuidados intensivos (DEBUR et al., 2007). Já Pilger et al. (2011) isolaram hMpV em 14,5% de lactentes menores de 2 anos atendidos na emergência com quadro de infecção respiratória e presença de estertores ou sibilos difusos. Não há vacinas liberadas para a profilaxia da infecção por hMpV e o tratamento da infecção com ribavirina não se mostrou promissor (KHAN, 2006).

1.4.3 Adenovírus

Os adenovírus são vírus não-envelopados de DNA fita dupla, pertencentes à família *Adenoviridae* (ICTV, 2018). São conhecidos 53 sorotipos, pertencentes a 6 espécies diferentes, divididas de A a G (SMITH et al., 2010). Os tipos B, C, D e E são causadores de infecções respiratórias, enquanto os tipos F e G provocam gastroenterite e o tipo A não é patogênico em humanos (DUNN & MILLER, 2014). Estes vírus são também associados a conjuntivite, cistite hemorrágica e sintomas neurológicos (BINDER et al., 2017). A circulação dos AdV é esporádica, sem seguir um padrão de sazonalidade. Há descrições de surtos ao redor do mundo em comunidades, principalmente aquelas submetidas à aglomeração e espaços fechados como asilos, dormitórios e quartéis (BINDER et al., 2017). Em um estudo no Sul do Brasil, o AdV foi o 2º agente viral mais frequentemente identificado em crianças de 24 a 59 meses com infecção respiratória aguda na emergência, sem necessidade de internação, sendo isolado em 12% das amostras (GIAMBERARDIN et al., 2016). Já existiu uma vacina inativada contra AdV, utilizada em militares nos Estados Unidos, porém a mesma foi descontinuada. Não há antivirais disponíveis para este agente (DUNN & MILLER, 2014).

1.4.4 Vírus Influenza

Os vírus influenza possuem genoma RNA fita simples de polaridade negativa e pertencem à família *Orthomixiviridae*. São descritos três tipos capazes de infectar humanos: A, B e C. O tipo A é dividido em dezenas de subtipos, infectando uma miríade de espécies de mamíferos e aves. É classificado de acordo com suas proteínas de superfície hemaglutininas (HA) e neuraminidases (NA). O tipo B é dividido em duas linhagens genética e antigenicamente distintas, Yamagata e Victoria. Ademais destas classificações estes vírus apresentam constantes mutações, que podem se fixar na população, gerando as chamadas cepas ou variantes virais. Os vírus influenza C são associados a quadros brandos ou mesmo subclínicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

As manifestações causadas pelos vírus influenza são divididas em duas síndromes clínicas: a síndrome gripal (SG), caracterizada por febre mais tosse ou odinofagia e mialgia/cefaleia e prostração, e a síndrome respiratória aguda grave (SRAG), quando além da febre e tosse há dispneia. São considerados grupos de risco lactentes menores de 2 anos, idosos maiores de 60 anos, gestantes, pacientes em uso crônico de ácido acetilsalicílico, portadores de cardiopatia, doença pulmonar crônica, diabetes mellitus, doença hepática,

insuficiência renal crônica, imunossupressão e de doenças hematológicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Por se tratar de doença pulmonar crônica, a FC é considerada fator de risco para formas graves de influenza. Durante a pandemia pelo subtipo A (H1N1) em 2009, as taxas de hospitalização e letalidade foram maiores em pacientes com FC do que na população geral (RENK et al., 2014).

A influenza tem uma taxa de mortalidade estimada nos países das Américas de 2,1/100000 habitantes menores de 65 anos (CHENG et al., 2015). É recomendada a profilaxia com vacinação anual para os grupos de risco, sendo disponível no SUS a vacina trivalente, cuja composição é atualizada anualmente de modo a contemplar as cepas circulantes no período (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Os medicamentos mais utilizados para o tratamento da influenza A são os inibidores da neuraminidase (Oseltamivir e Zanamivir), que interferem na liberação de partículas virais da célula infectada, sendo efetivos contra os influenza A e B (UYEKI, 2003).

1.4.5 Vírus Parainfluenza

Os PIV são vírus envelopados de RNA fita simples de polaridade negativa, pertencentes à família *Paramyxoviridae*. São conhecidos quatro sorotipos, sendo o PIV 1 e 3 do gênero *Respirovirus* e o PIV 2 e 4 do gênero *Rubulavirus*. Todos os sorotipos podem causar doença respiratória de gravidade variável, dependendo de fatores de virulência do patógeno e de defesa do hospedeiro. Cerca de 15% das infecções por PIV afetam o trato respiratório inferior, sendo estas mais comuns em lactentes, idosos e imunocomprometidos. Os tipos 1 e 2 estão mais associados a quadros de laringotraqueíte e são mais frequentes no outono, enquanto o tipo 3 é mais associado a IATRI, principalmente nos primeiros 6 meses de vida, e tem maior circulação na primavera e verão. O tipo 4 é mais raro e tem sido associado a quadros clínicos de menor gravidade (HALL, 2001). Em seu estudo em São Paulo, Pecchini et al. (2015) identificaram os PIV, principalmente tipo 3, como segundo agente mais comum em crianças menores de 5 anos internadas com história prévia de IVAS, sendo identificado em 7,7% dos pacientes. Similarmente, no mesmo estado Thomazelli et al. (2007) isolaram PIV3 em 8,3% de crianças menores de 5 anos internadas por IATRI. A ribavirina tem sido estudada como possibilidade terapêutica em pacientes imunocomprometidos, porém ainda não há estudos conclusivos. Não existe até o momento vacina disponível contra este agente (HALL, 2001).

1.4.6 Coronavírus Humano

São vírus envelopados de RNA fita simples com polaridade positiva, pertencentes à família *Coronaviridae*. Há cinco coronavírus humanos conhecidos, que pertencem à dois gêneros diferentes. O hCoV 229E e NL63 são do gênero *Alphacoronavirus*, enquanto OC43, HKU1, Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS)-CoV, e Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS)-CoV pertencem ao gênero *Betacoronavirus* (TROMBETTA et al., 2016). O SARS-CoV, identificado originalmente na China, teve circulação restrita a poucos países entre os anos de 2002 e 2004, quando causou epidemia com 8.098 casos de SARS ao redor do mundo. Afetou principalmente adultos, sendo apenas 5% dos acometidos menores de 12 anos (PRINCIPI et al., 2010). Já o MERS-CoV foi identificado inicialmente na Arábia Saudita em 2012 e desde então já causou 2.122 casos de doença dentre os quais 740 óbitos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017). Estes dois vírus são considerados os mais virulentos deste gênero, sendo associados à IATRI, sem acometimento extra-respiratório. Os demais hCoV tem mostrado circulação persistente ao redor do mundo desde suas descrições, com pico no inverno e início da primavera, e epidemias a cada dois a quatro anos, afetando mais frequentemente crianças (CABEÇA et al., 2013; PRINCIPI et al., 2010). Sua principal manifestação clínica é a IVAS, podendo em menor escala, causar IATRI, principalmente em recém nascidos, lactentes nascidos prematuros ou com baixo peso, ou crianças com comorbidades de risco como imunodepressão e cardiopatia (CABEÇA et al., 2013). Em um estudo em pacientes internados com SRAG na região Sudeste 7,6% das amostras foram positivas para hCoV, com 9 indivíduos (26%) evoluindo para óbito (TROMBETTA et al., 2016). Não há tratamento ou vacina disponível para nenhum dos hCoV conhecidos (COLEMAN & FRIEMAN, 2014).

1.4.7 Rinovírus

Os RV são vírus não envelopados de RNA fita simples com polaridade positiva, pertencentes à família *Picornaviridae*. Há mais de 100 sorotipos identificados até o momento, agrupados em 3 espécies filogenéticas conforme homologia genética: RV-A, B e C (KENNEDY et al., 2012; KIENINGER et al., 2012). Infecções são detectadas durante todo o ano, com picos em estações frias e chuvosas. Os RV são considerados os principais causadores de infecção do trato respiratório superior em todas as idades (KIENINGER et al., 2012). Em um estudo com crianças menores de 10 anos com infecção respiratória aguda de

tratamento ambulatorial em São Paulo, os RV foram identificados em 46,7% de 120 amostras (MOREIRA et al., 2011). Acreditava-se que o RV era capaz de infectar somente o trato respiratório superior. Em indivíduos hígidos, de fato este é o quadro mais comum, sendo os sintomas mais prevalentes congestão nasal, rinorréia, espirros e tosse. No entanto estudos recentes vêm demonstrando a capacidade do RV de causar infecção também do trato respiratório inferior, principalmente em crianças asmáticas e com outras doenças pulmonares crônicas. Neste caso são comuns sintomas como sibilância e dispneia (FAWKNER-CORBETT et al., 2016; MILLER et al., 2007). A sibilância associada ao RV pode ocorrer também em crianças previamente hígidas (MOREIRA et al., 2011).

Em um estudo no Nordeste Brasileiro, os RV foram o quarto patógeno mais comum em crianças menores de 5 anos que se apresentaram ao hospital com infecção respiratória aguda, sendo detectado em crianças com diagnóstico de bronquiolite, pneumonia e hiperreatividade brônquica (FAWKNER-CORBETT et al., 2016). Além disso, acredita-se que os rinovírus possam ter papel no desenvolvimento de asma após uma primo-infecção (KENNEDY et al., 2012; KIENINGER et al., 2013). Assim como na maioria dos vírus respiratórios, não há vacina ou tratamento específico contra o RV (GLANVILLE & JOHNSTON, 2015).

2- JUSTIFICATIVA

As exacerbações respiratórias afetam não só a longevidade dos pacientes com FC, mas impactam também na qualidade de vida (BRITTO, 2002) e desempenho neurocomportamental destes indivíduos, além de representarem elevado custo para os sistemas de saúde. Sendo assim é consenso de que se deve tentar ao máximo preveni-las e, quando ocorrerem, caracteriza-las da forma mais detalhada possível, não somente do ponto de vista clínico, mas também microbiológico, a fim de que tratamento precoce e efetivo seja instituído com sucesso (BHATT, 2013). Os vírus respiratórios são sabidamente os agentes etiológicos mais prevalentes nas infecções respiratórias agudas na infância, independente da presença de comorbidades. No entanto apenas recentemente seu impacto na subpopulação de crianças com FC vem sido demonstrado, com trabalhos restritos em grande maioria aos Estados Unidos e Europa. A crescente identificação de vírus respiratórios em estudos com diferentes populações utilizando técnicas moleculares nos levam a concluir que os agentes virais devem constituir um importante fator contribuinte para exacerbações nestas crianças (ASNER et al., 2012; STELZER-BRAID et al., 2012; WAT et al., 2008).

Com base neste panorama percebe-se fundamental o melhor conhecimento sobre a prevalência e caracterização das infecções por vírus respiratórios em pacientes com FC exacerbada em nossa comunidade, para que possam ser estudadas novas medidas de prevenção e tratamento ao longo do acompanhamento.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a prevalência de infecção por vírus respiratórios nas exacerbações respiratórias de pacientes pediátricos com Fibrose Cística.

3.2 Objetivos Específicos

- Estimar a prevalência de infecção pelos vírus respiratórios específicos (VSR, Flu A, Flu B, hMpV, PIV1/2/3, AdV, RV) em pacientes com Fibrose Cística em exacerbação respiratória;
- Correlacionar o perfil demográfico, clínico e epidemiológico dos pacientes com a presença ou não de identificação viral;
- Comparar a gravidade das exacerbações em relação ao perfil viral identificado;
- Avaliar a associação entre a infecção viral e o perfil de colonização bacteriano no momento da exacerbação;
- Avaliar a associação entre a detecção viral e posterior aquisição de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Comparar a taxa de positividade para detecção viral entre as metodologias de RT-PCR e Imunofluorescência, quando esta foi realizada.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População

Pacientes com diagnóstico confirmado de Fibrose Cística acompanhados no centro de referência para esta doença no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF), situado no Rio de Janeiro, Brasil.

4.2 Critérios de Inclusão

- Diagnóstico Confirmado de Fibrose Cística através de teste do suor positivo ou identificação de duas mutações do gene CFTR através de sequenciamento genético;
- Acompanhamento regular no setor de pneumologia do IFF;
- Idade de 0 a 17 anos e 11 meses;
- Exacerbação Respiratória, definida pela presença de pelo menos 4 dos seguintes critérios: mudança no padrão do escarro (coloração ou quantidade); nova hemoptise ou piora se pré-existente; aumento da tosse; aumento da dispneia; prostração, fadiga ou letargia; temperatura $>38^{\circ}\text{C}$.; anorexia ou perda de peso; dor ou sensibilidade sinusal; mudanças no exame físico torácico; queda da função pulmonar em 10% e relação ao último valor registrado; alterações radiográficas sugestivas de infecção.

4.3 Critérios de Exclusão

- Presença de comorbidade pulmonar, cardiovascular, neurológica, hemato/oncológica, reumatológica ou digestiva, não relacionada à FC;
- Não consentimento para participação do estudo.

4.4 Local

O estudo foi elaborado através de parceria do setor de pneumologia pediátrica do IFF com o Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS) da Fundação Oswaldo Cruz

(FIOCRUZ). O IFF é o principal centro de referência do Rio de Janeiro para acompanhamento de crianças com FC, atendendo pacientes de 0 a 17 anos. Estão atualmente em acompanhamento aproximadamente 183 pacientes, que tem consultas agendadas regularmente nos setores de pneumologia e gastroenterologia pediátricas, nutrição e fisioterapia respiratória. Os agendamentos são realizados de acordo com o perfil de colonização bacteriana dos pacientes (negativo ou positivo para *S. aureus*; *P. aeruginosa*; *B. cepacia*; MRSA), a fim de evitar a contaminação cruzada.

O Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo é o laboratório de referência nacional da rede de vigilância de Influenza, da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS), realizando a padronização e a descentralização do diagnóstico molecular para a rede, bem como a caracterização genética e antigênica dos vírus respiratórios e exantemáticos identificados no país.

4.5 Desenho do Estudo

Foram convidados a participar da pesquisa os pacientes com diagnóstico de FC acompanhados no IFF que compareceram à consulta no setor de pneumologia pediátrica daquele hospital, de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2018, ou que estiveram internados na enfermaria de pediatria do IFF. Apenas os pacientes apresentando quadro clínico de exacerbação respiratória ER de acordo com os critérios de Fuchs (FUCHS et al., 1994) foram incluídos no estudo. Primeiramente foram coletados dados clínicos da exacerbação, aplicando-se o escore “Cystic Fibrosis Clinical Score” (CFCS) (KANGA et al., 1999) possibilitando o estadiamento de gravidade da exacerbação. Também foram coletados dados do prontuário do paciente referentes ao seu diagnóstico (idade do diagnóstico, exames comprobatórios como resultado do teste do suor e sequenciamento genético) e acompanhamento clínico. Aplicou-se o Escore de Shwachman (SHWACHMAN & KULCZYCKI, 1958) para estadiamento da gravidade do quadro de base da FC. Este avalia o paciente em quatro domínios (estado geral; exame físico; estado nutricional; radiografia de tórax), atribuindo menor pontuação para maior gravidade. Quando não foi realizada radiografia de tórax na data de atendimento, utilizou-se a última radiografia do paciente do mesmo ano para aplicação deste escore.

Foi realizada avaliação do estado nutricional dos pacientes, uma vez que a falência nutricional pode ser um fator de gravidade para infecções. Este diagnóstico foi realizado quando o percentil do IMC do paciente foi menor que o percentil 10 do gráfico de IMC para idade do CDC (CDC, 2016). Em menores de dois anos utilizou-se a análise do Peso para Estatura no lugar do IMC (BOROWITZ et al. 2002).

4.5.1 Considerações Éticas

O estudo foi desenvolvido respeitando a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IFF e do IOC, cujos pareceres substanciados encontram-se nos Anexos A e B respectivamente. A participação no estudo foi livre e voluntária, e não acarretou em custos aos pacientes. Estes também não receberam remuneração por sua participação. Os participantes foram livres para desistir do estudo a qualquer momento, sem que isto acarretasse em qualquer prejuízo a ele ou seu tratamento e acompanhamento no IFF. Antes de decidir se desejam participar do estudo, o paciente e seu responsável legal receberam o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE- Apêndices A e B) e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice C), respectivamente, em duas vias, que foram explicados por um dos pesquisadores em local particular. No caso de pacientes menores de 6 anos de idade, foi requerido somente o TCLE. Os dados do estudo são tratados de modo sigiloso e anônimo, inclusive nas publicações que dele possam decorrer.

4.5.2 Análises Bacteriológicas

Faz parte da rotina de atendimentos de pacientes com FC do setor de pneumologia do IFF a coleta, a toda consulta, de swab nasofaríngeo ou de amostra de escarro para pesquisa de bactérias. Estas amostras são enviadas pelo IFF ao Laboratório de Bacteriologia Clínica do Hospital Universitário Pedro Ernesto, onde são submetidas a cultura para bactérias Gram negativas, Gram positivas e anaeróbios. Para os fins deste estudo, foram acessados através de consulta ao prontuário os resultados de cultura bacteriana do pacientes participantes da data da coleta de swab para pesquisa viral, e da consulta imediatamente antes e após.

4.5.3 Coleta das Amostras Clínicas

Após a coleta de dados clínicos, uma amostra de secreção respiratória dos pacientes foi colhida utilizando swab combinado de nasofaringe e orofaringe, seguindo o procedimento padrão de coleta de espécime clínica para vírus respiratórios descrito no Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). As coletas foram feitas utilizando 3 coletores descartáveis estéreis com haste de plástico e extremidade de poliéster ou dacron (swabs), com o pesquisador utilizando equipamento de proteção individual adequado. Para este procedimento, um coletor é introduzido em cada narina com uma angulação de 30 a 45° em relação ao lábio superior e então friccionado na parede posterior do meato médio. O 3º swab é introduzido na boca e friccionado contra faringe posterior e amígdalas evitando encostar na língua. Após a coleta os 3 swabs são acondicionados em um mesmo frasco de polipropileno contendo cerca de 2,5 mL de Meio de Transporte Viral. Os materiais coletados foram mantidos em geladeira à temperatura de 4-8°C e transportados em até 48h em caixa isotérmica com gelo sintético e termômetro para o LVRS, seguindo as boas práticas de biossegurança. No laboratório as amostras foram submetidas à análise por Imunofluorescência Direta e Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase com Detecção em Tempo Real (RT-PCR). Não foi solicitada nenhuma ida adicional dos participantes ao hospital. Após a análise as amostras foram armazenadas no biorrepositório do LVRS, onde podem ser mantidas por período de até 2 anos.

4.5.4 Imunofluorescência Direta

A IF foi realizada utilizando kit Biotrin® para pesquisa de AdV, Flu A e B, PIV 1,2 e 3 e RSV, de acordo com o protocolo do Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Células intactas, presentes nas amostras coletadas foram lavadas em tampão PBS, recuperadas por centrifugação e depositadas em alíquotas de 100uL nos círculos das lâminas pré identificadas. Após secagem em cabine de segurança biológica, as lâminas foram fixadas em acetona, podendo neste ponto ser estocadas a -70°C para posterior identificação dos vírus acima descritos. O procedimento de identificação foi iniciado através da adição de 25µL de anticorpo monoclonal específico para cada vírus pesquisado em distintos círculos da lâmina já fixada. Após ciclo de incubação e lavagem acrescentou-se o anti-IgG murino conjugado com isotiocianato de fluoresceína sobre cada círculo da lâmina, que foi novamente incubada em câmara úmida. Após a incubação as lâminas foram novamente lavadas com PBS. Nos casos em que o antígeno viral esteve

presente, o anticorpo monoclonal conjugado à fluoresceína se ligou a ele, marcando a célula. Por fim acrescentou-se o fluido de montagem e lamínula, e a lâmina foi levada ao microscópio de imunofluorescência, que ativou o cromógeno permitindo a visualização das células marcadas. Para detecção adequada, a lâmina deve apresentar pelo menos três células por campo. O resultado foi considerado positivo na presença de três ou mais células intactas com fluorescência em seu interior.

4.5.5 Diagnóstico Molecular

4.5.5.1 Extração de Ácidos Nucleicos

Para este procedimento, primeiramente foi realizada a extração do ácido nucleico total da amostra clínica suspeita, usando o kit QIAamp® Viral RNA mini kit (Qiagen®). Resumidamente, alíquotas de 140uL de cada amostra foram equilibradas à temperatura ambiente, centrifugadas, misturadas ao tampão de lise e incubadas por 10min a temperatura ambiente sob agitação. Após a incubação, adicionou-se etanol PA para solubilização dos lipídeos e então, aplicou-se a suspensão à coluna contendo sílica, fornecida pelo fabricante. Após a passagem de toda a suspensão pela coluna, esta foi lavada com tampões AW1 e AW2, permanecendo apenas os ácidos nucleicos aderidos à coluna. Por fim, o ácido nucleico total da foi eluídos da coluna e imediatamente testados, ou então, conservados a -70°C até a realização das análises moleculares.

4.5.5.2 RT-PCR

Um protocolo RT-PCR com detecção em tempo real baseado no ensaio desenvolvido por Shu et al. (2011) foi utilizado para pesquisa de influenza A (subtipos H1N1pdm09 e H3N2), influenza B, PIV tipo 1, 2 e 3, VSR, AdV, hMpV e RV/enterovírus/coxsackie. O ensaios adaptados foram realizados seguindo os procedimentos descritos no Procedimento Operacional Padrão de RT-PCR do LVRS para detecção de vírus respiratórios, sendo a principal mudança a adaptação do ensaio original ao kit de RT-PCR (Promega®) adotado pela rede de vigilância em influenza no Brasil. A RT-PCR foi realizada com a adição do RNA extraído à mistura para reação composta por água livre de nucleases, tampão de reação, mix de enzimas e os oligonucleotídeos direto, reverso e sonda, específicos para cada vírus testado, conforme descrito nas fichas de RT-PCR (Anexo C). Em cada ensaio foi adicionado um

controle sabidamente positivo para os alvos pesquisados (PTC), um controle negativo contendo apenas os reativos da mistura de cada alvo pesquisado (NTC), além de um tubo contendo apenas água colocado em cada rodada de extração (*Mock*), permitindo um controle de possíveis contaminações cruzadas no processo. As sequências de primers e sondas utilizados para pesquisa de influenza A e B, e para os demais vírus respiratórios, encontram-se nas Tabelas 2 e 3 respectivamente. As misturas para os diferentes alvos adicionadas dos RNA controles e provenientes das amostras foram levadas ao termociclador com detecção em tempo real, onde passaram por processo de transcrição reversa, ativação enzimática, desnaturação e amplificação. A ciclagem utilizada encontra-se na Tabela 4. Todas as sondas foram marcadas com FAM (*reporter*) e moléculas silenciadoras BHQ-1 (*quencher*) conforme identificadas nas Tabelas 2 e 3.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram sinal de fluorescência emitida a cima do ponto de corte (*threshold*) estabelecido manualmente a cada ensaio, na fase exponencial da curva de amplificação da reação. A análise da reação foi efetuada usando o Software ABI7500 v2.0.5 (Applied Biosystems®) e o ensaio considerado válido sempre que controles NTC e Mock não apresentaram curvas de amplificação acima do *threshold*, e o PTC apresentou curvas de amplificação características para todos os conjuntos testados, dentro dos valores pré determinados.

4.5.6 Análise do resultados

Tão logo disponível o resultado da pesquisa viral este foi fornecido ao participante da pesquisa e à equipe médica assistente, a fim de que este pudesse auxiliar na prática clínica. Todos os dados foram armazenados de forma sigilosa, anônima e codificada. Após o término da coleta de dados, estes foram analisados utilizando o programa R 3.5.2 ® (2018). A análise descritiva foi realizada utilizando-se medidas de frequência e percentual para dados categóricos e média, mediana e desvio padrão para dados numéricos. A associação entre a detecção de vírus e demais variáveis categóricas foi avaliada utilizando-se o teste Qui Quadrado, ou Teste Exato de Fisher quando a frequência esperada foi menor que cinco. Já a associação entre a detecção viral e variáveis numéricas foi realizada pelo Teste T de Student, para variáveis com distribuição normal, e Teste U de Mann-Whitney para as demais. Resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Tabela 2- Sequências de *primers* direto, reverso e sondas utilizados no RT-PCR para identificação e subtipagem dos vírus Influenza A e B.

Agente	Gene/ Antígeno	Primer	Sequência (5' – 3')
Influenza A	InfA	Primer	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C
		Primer Reverso	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA
		Sonda	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
H1		Primer	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TCC CAT T
		Primer Reverso	AGA YGG GAC ATT CCT CAA TCC TG
		Sonda	ATA CAT CCR A" T"*(BHQ-1)C ACA ATT GGR AAA TGT CCAAA- Spacer **
pdm		Primer	TTG CAG TAG CAA GTG GGC ATG A
		Primer Reverso	TCT TGT GAG CTG GGT TTT CAT TTG
		Sonda	TGA ATG GGT C" T"*(BHQ-1)A TCC CGA CCA GTG AGT AC -Spacer
H3		Primer	AAG CAT TCC YAA TGA CAA ACC
		Primer Reverso	ATT GCR CCR AAT ATG CCT CTA GT
		Sonda	CAG GAT CAC A" T"*(BHQ-1)A TGG GSC CTG TCC CAG
Influenza B		Primer	TCC TCA AYT CAC TCT TCG AGC G
		Primer Reverso	CGG TGC TCT TGA CCA AAT TGG
		Sonda	CCA ATT CGA GCA GCT GAA ACT GCG GTG

*"T": Timina marcada com o *Quencher* BHQ1. Todas as sondas sem indicação são marcadas com FAM - 5' e BHQ1- 3'.

**Spacer: molécula adicionada na região 3' para evitar a extensão de regiões a jusante do ensaio.

Tabela 3- Sequências de *Primers* direto, reverso e sondas utilizados na reação de RT-PCR de vírus respiratórios não influenza

Agente	Primer	Sequência (5' – 3')
Metapneumovírus Humano	<i>Primer</i> Direto	CAA GTG TGA CAT TGC TGA YCT RAA
	<i>Primer</i> Reverso	ACT GCC GCA CAA CAT TTA GRA A
	Sonda	TGG CYG TYA GCT TCA GTC AAT TCA ACA GA
Vírus Sincicial Respiratório	<i>Primer</i> Direto	GGC AAA TAT GGA AAC ATA CGT GAA
	<i>Primer</i> Reverso	TCT TTT TCT AGG ACA TTG TAY TGA ACA G
	Sonda	CTG TGT ATG TGG AGC CTT CGT GAA GCT
Parainfluenza 1	<i>Primer</i> Direto	AGT TGT CAA TGT CTT AAT TCG TAT CAA T
	<i>Primer</i> Reverso	TCG GCA CCT AAG TAA TTT TGA GTT
	Sonda	ATA GGC CAA AGA "T" TG TTG TCG AGA CTA TTC CAA
Parainfluenza 2	<i>Primer</i> Direto	GCA TTT CCA ATC TAC AGG ACT ATG A
	<i>Primer</i> Reverso	ACC TCC TGG TAT AGC AGT GAC TGA AC
	Sonda	CCA TTT ACC "T"AA GTG ATG GAA TCA ATC GCA AA
Parainfluenza 3	<i>Primer</i> Direto	TGG YTC AAT CTC AAC AAC AAG ATT TAA G
	<i>Primer</i> Reverso	TAC CCG AGA AAT ATT ATT TTG CC
	Sonda	CCC RTC TG"T" TGG ACC AGG GAT ATA CTA CAA A
Adenovírus	<i>Primer</i> Direto	GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C
	<i>Primer</i> Reverso	GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT
	Sonda	TG CAC CAG ACC CGG GCT CAG GTA CTC CGA
Rínovírus/ Enterovírus/ Coxsachie Vírus	<i>Primer</i> Direto 1	CYA GCC TGC GTG GC
	<i>Primer</i> Direto 2	CYA GCC TGC GTG GT
	<i>Primer</i> Reverso	GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA
	Sonda	FAM-TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C-BHQ1
RNP	<i>Primer</i> Direto	CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG
	<i>Primer</i> Reverso	TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG
	Sonda	CC CCA GTC TCT GTC AGC ACT CCC TTC

Tabela 4- Ciclagem utilizada nas reações de RT-PCR

Reação	Nº ciclos	Tempo	Temperatura
Transcrição Reversa	1	25 min	45°C
Ativação Enzimática	1	2 min	95°C
Amplificação	45	15 seg	95°C
		30 seg	55°C

5- RESULTADOS

De janeiro a dezembro de 2018 foram realizados 706 atendimentos a pacientes com Fibrose Cística no IFF, havendo 183 pacientes em acompanhamento neste centro. A confirmação do diagnóstico de FC foi feita tendo por base: quadro clínico compatível associado ao teste do suor positivo ou, presença de duas mutações patogênicas no gene CFTR, identificadas por sequenciamento genético. Do total de pacientes com diagnóstico confirmado, 48 pacientes, apresentaram em 71 ocasiões o quadro de exacerbação respiratória e preencheram os critérios de inclusão, sendo convidados a participar do estudo. Uma paciente que apresentava encefalopatia crônica como comorbidade foi excluída, de modo que obtivemos um total final de 70 amostras coletadas de 47 pacientes. Foram considerados vacinados para influenza os pacientes que receberam uma dose da vacina nos últimos doze meses, ou duas doses no caso de idade menor de nove anos em primovacinação. Quatro pacientes eram menores de seis meses de idade, faixa etária na qual é contraindicada a vacinação, e, portanto, foram excluídos desta análise. As características da população incluída no estudo se encontram na Tabela 5.

Apenas quatro pacientes não apresentavam confirmação genética. Dois destes apresentaram apenas uma mutação patogênica no gene CFTR (G85E em heterozigose), e aguardam processamento de pesquisa de mutações intrônicas. Os outros dois pacientes não foram analisados geneticamente. Um paciente foi diagnosticado apenas pelo exame genético, sem o resultado do teste do suor. Detalhes em relação ao perfil genético da população do estudo podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 5- Características demográficas dos pacientes, dados diagnósticos e tratamento utilizado.

Variável	Total (n=47)
Sexo Feminino	23 (48,9%)
Raça/ Cor/ Etnia Preto	4 (8,5%)
Pardo	12 (25,5%)
Branca	31 (65,9%)
Irmãos Menores de 5 anos	13 (27,6%)
Vacinado para Influenza	25/43 (58,1%)
Diagnóstico da FC	
Idade do Diagnóstico (dias)	1,49 (0,13-11,64;+-2,3)
Diagnóstico por TIR ^a	26 (55,3%)
Teste do Suor Positivo	46 (97,9%)
2 Mutações Genéticas	45 (95,7%)
F508del Homozigoto	12 (25,5%)
F508del Heterozigoto	13 (27,6%)
Insuficiência Pancreática	41 (87,2%)
Diabetes	1 (2,1%)
Tratamento Regular	
Dornase Alfa	40 (85,1%)
Nebulização com Salina 3%	8 (17%)
Nebulização com Salina 7%	25 (17%)
Tobramicina Inalatória em Meses Alternados	7 (14,9%)
Azitromicina Oral	9 (19,1%)
Beta 2 Agonista de Curta Ação	43 (91,5%)
Beta 2 Agonista de Longa Ação	16 (34%)
Corticóide Inalatório	29 (61,7%)

*4 pacientes <6 meses de idade excluídos do total.

a- Tripsina Imunorreativa

Tabela 6- Frequência das mutações do gene CFTR na população do estudo com sequenciamento genético realizado

Mutação do Gene CFTR ^a	Frequência do Alelo (n=45)
F508del	37 (82,2%)
3120+1G>A	9 (20%)
G85E	8 (17,8%)
G542X	6 (13,3%)
S549R	4 (8,9%)
L1077P	3 (6,7%)
A559T	2 (4,4%)
R1066C	2 (4,4%)
R1162X	2 (4,4%)
R764X	2 (4,4%)
S434X	2 (4,4%)
W1282X	2 (4,4%)
A561E	1 (2,2%)
c.1052C>G	1 (2,2%)
c.580-2a>c	1 (2,2%)
Q552X	1 (2,2%)
R334W	1 (2,2%)
S466X	1 (2,2%)
V232D	1 (2,2%)
W1089X	1 (2,2%)
2184delA	1 (2,2%)

a- Regulador de Condutância Transmembrana da Fibrose Cística

Todas as 70 amostras coletadas ao longo do estudo foram submetidas ao protocolo de RT-PCR com detecção em tempo real para RV, AdV, VSR, Flu A e B, hMpV e PIV 1, 2 e 3. Cinquenta e três amostras foram também submetidas ao protocolo de imunofluorescência para

AdV, VSR, Flu A e B e PIV 1, 2 e 3. Das 70 amostras incluídas no estudo, 45 (64,3%) foram negativas para pesquisa viral e 25 (35,7%) foram positivas. Os resultados da pesquisa viral se encontram no Gráfico 1. Através da subtipagem dos dois casos de influenza A, foram identificados uma amostra do subtipo H1N1pdm09 e outra H3N2. Em relação aos três casos de PIV, um foi detectado isoladamente e caracterizado como PIV 3. Os demais foram caracterizados como PIV 1, codetectado com VSR, e PIV 2, codetectado com hMpV. Dois pacientes apresentaram mais de uma amostra positiva. O primeiro indivíduo teve uma amostra positiva para VSR e a segunda para Flu A (H1N1)pdm09, com 49 dias de intervalo entre elas. Já o segundo indivíduo teve duas amostras positivas para RV, com 7 meses e 24 dias de intervalo. A distribuição mensal da coleta das amostras e seus respectivos resultados para os vírus analisados se encontram no Gráfico 2. Os resultados de *Threshold Cycle* (CT) da RT-PCR, da imunofluorescência e da cultura bacteriana de secreção respiratória se encontram na Tabela 7.

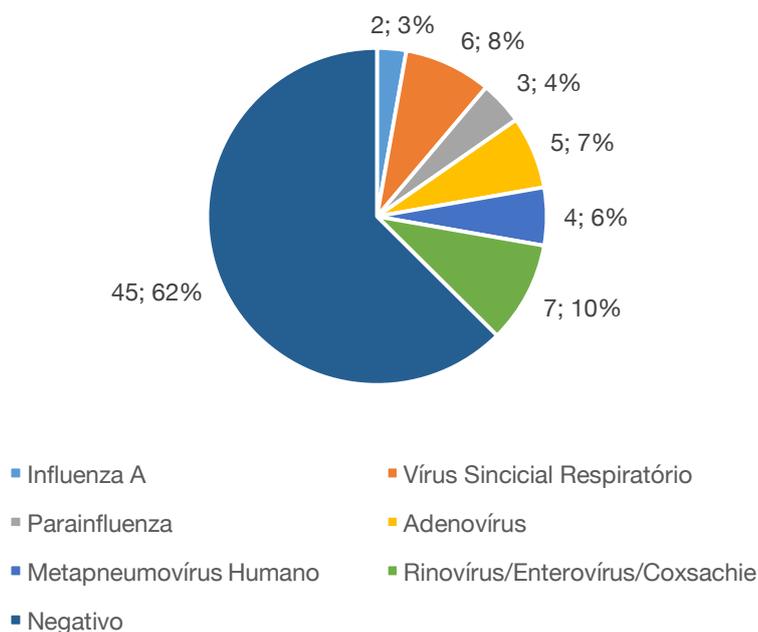


Gráfico 1- Resultado da pesquisa viral por RT-PCR e Imunofluorescência direta.

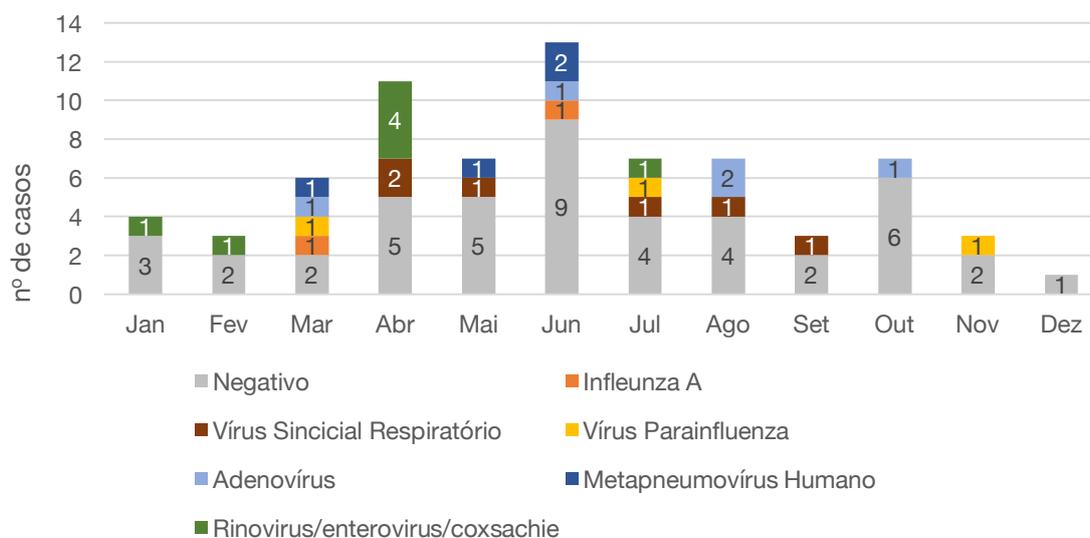


Gráfico 2- Distribuição mensal das amostras e resultados obtidos.

Tabela 7- Descrição da idade, tempo de sintomas, resultado de Ct (RT-PCR) e imunofluorescência para vírus respiratórios e de cultura bacteriana, das amostras positivas para vírus respiratórios

Vírus	Idade (anos)	Tempo de sintomas (dias)	Ct ^g (RT-PCR)	Imunofluorescência	Cultura Bacteriana
AdV ^a	3,3	6	40	negativo	<i>S. aureus</i>
	7,2	8	37,1	negativo	<i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i>
	5,8	7	36,6	negativo	<i>S. aureus</i>
	5,6	15	32,3	negativo	<i>P. aeruginosa</i> + MRSA ^h
	5	6	30,1	não realizado	MRSA
FluA ^b H1N1pdm09	1	14	33,6	negativo	<i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i>
FluA H3N2	10	6	23,5	FluA	<i>A. xylooxidans</i>

	5,9	3	19,54	Não se aplica	<i>S. aureus</i> + <i>S. maltophilia</i>
hMpV ^c	1,6	4	31,64	Não se aplica	MRSA
	4,9	9	41,6	Não se aplica	<i>P.aeruginosa</i>
hMpV + PIV ^{d2}	16,8	21	37,84 (hMPV) 40,93 (PIV2)	não realizado	<i>S. aureus</i>
PIV 3	5,1	5	34,6	negativo	<i>P.aeruginosa</i>
VSR ^e + PIV ₁	1,8	13	37,6 (VSR) 40,1(PIV1)	negativo	<i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>S.maltophilia</i>
	3,9	1	31,7	negativo	<i>P.aeruginosa</i>
	3	1	42,5	negativo	BGNNF ⁱ
VSR	2,1	3	38	negativo	<i>S. aureus</i>
	0,9	6	39,3	negativo	negativo
	0,5	2	negativo	VRS	negativo
	14,4	3	29,1	Não se aplica	<i>S. aureus</i>
	2,9	18	39,1	Não se aplica	<i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i>
	10	5	37,3	Não se aplica	não realizado
	2,9	2	27,9	Não se aplica	<i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i>
RV ^f	0,3	7	33,3	Não se aplica	negativo
	17,9	7	33,5	Não se aplica	<i>P.aeruginosa</i>
	3,3	4	37,8	Não se aplica	<i>S. aureus</i> + <i>B. cepacea</i>

a- Adenovírus; b- vírus influenza; c- metapneumovírus; d-vírus parainfluenza; e- vírus sincicial respiratório; f- rinovírus; g- Cycle Threshold; h- *Staphylococcus aureus* resistente a metilina; i- Bacilo Gram negativo não fermentador, excluindo-se *Pseudomonas* e *Burkholderia*

A descrição das características clínicas e epidemiológicas dos grupos positivo e negativo para vírus se encontra na Tabela 8. Já as características clínico-epidemiológicas associadas à infecção, por cada vírus especificamente, se encontram na Tabela 9.

Tabela 8- Características clínico-epidemiológicas dos grupos positivo e negativo para detecção viral

Variável	Vírus Positivo (n=25)	Vírus Negativo (n=45)	P valor
Sexo Feminino	13 (52%)	25 (55,6%)	0,77
Idade - anos (mediana)	3,9 (0,3 - 17,9; +- 4,9)	5,5 (0,3 - 17; +- 4,6)	0,3 ^a
Idade < 5 anos	14 (56%)	22 (48,9%)	0,57
Raça/Cor/Etnia Preto	2 (8%)	2 (4,4%)	0,61
Pardo	7 (28%)	16 (35,6)	0,52
Branco	16 (64%)	27 (60%)	0,74
Irmãos Menores de 5 anos	4 (16%)	10 (22,2%)	0,53
Dias de sintomas na coleta (mediana)	6 (1 - 21; +-5,3)	6 (0- 30; +-5,5)	0,7 ^a
Insuficiência Pancreática	22 (88%)	42 (93,3%)	0,66
Diabetes Mellitus	1 (4%)	0	0,36
Falência Nutricional	4 (16%)	17 (37,8%)	0,06
Diagnóstico por TIR ^c	14 (56%)	22 (48,9%)	0,57
Colonização Bacteriana			
Negativo ou <i>S. aureus</i>	6 (24%)	11 (24,4%)	0,97
MRSA ^d intermitente	3 (12%)	9 (20%)	0,52
Pseudomonas intermitente	12 (48%)	20 (44,4%)	0,77
Pseudomonas Crônico	4 (16%)	4 (8,9%)	0,44
<i>B. cepacia</i> intermitente	3 (12%)	5 (11,1%)	1
<i>B. cepacia</i> crônico	1 (4%)	5 (11,1%)	0,41
Quadro Clínico e Radiológico			

Sintomas catarrais	21 (84%)	26 (57,8%)	0,03
Piora da tosse	25 (100%)	44 (97,8%)	1
Piora da secreção respiratória	22 (88%)	38 (84,4%)	1
Piora da dispneia	14 (56%)	27 (60%)	0,8
Hemoptise	1 (4%)	1 (2,2%)	1
Prostração	9 (36%)	10 (22,2%)	0,21
Febre	16 (64%)	19 (42,2%)	0,08
Anorexia/perda ponderal	14 (56%)	26 (57,8%)	0,89
dor sinusal	1 (4%)	2 (4,4%)	1
Queda da Saturação de O ₂	7 (28%)	15 (33,3%)	0,65
Alteração na ausculta	20 (80%)	42 (93,3%)	
Sibilos localizados	0	2 (4,4%)	0,53
Sibilos difusos	3 (12%)	4 (8,9%)	0,69
Estertores localizados	7 (28%)	22 (48,9%)	0,09
Estertores difusos	9 (36%)	13 (28,9%)	0,54
Redução do Murmúrio Vesicular	10 (40%)	20 (44,4%)	0,72
Radiografia de Tórax realizada	17 (68%)	35 (77,8%)	0,37
Alteração Aguda sugestiva de Infecção	8 (47,1%)	20 (57,1%)	0,49
Tratamento			
Antibioticoterapia	19 (76%)	40 (88,9%)	0,18
Oseltamivir	1 (4%)	0	0,35
Oxigêniooterapia contínua	6 (24%)	15 (33,3%)	0,41
Ventilação Não Invasiva	3 (12%)	4 (8,9%)	0,69
Internação Hospitalar	10 (40%)	21 (46,7%)	0,11
Duração (dias)	14,6 (7 - 21; +- 3,8)	16,5 (8 - 34; +- 5,6)	0,45 ^a

Escores de Gravidade

CFCS (média) ^e	30,3 (19 - 39; +- 5,4)	29,4 (18 - 41; +- 5,9)	0,25 ^b
Escore de Shwachman (média) ^e	72,2 (45 - 95; +-11,9)	71,6 (35 - 90; +-12,4)	0,42 ^b

a- teste t de Student; b- teste U de Mann Whitney; c- Tripsina Imunorreativa; d- *Staphylococcus aureus* resistente a metilina ; e- *Cystic Fibrosis Clinical Score*

Tabela 9- Características clínico epidemiológicas dos indivíduos infectados por cada vírus especificamente

	AdV (n=5)	FluA (n=2)	hMpV (n=4)	PIV (n=3)	RV (n=7)	VSR (n=6)	negativo (n=45)
Idade Média (anos)	5,18 (3,2- 7,2; +- 1,4)	5,5 (1- 10; +- 6,3)	7,3 (1,6- 16,8; +- 6,6)	7,9 (1,8- 16,8; +- 7,9)	7,4 (0,3 - 17,9; +- 6,8)	2 (0,5- 3,9; +- 1,3)	6,3 (0,3 - 17; +- 4,6)
Mediana	5,6	5,5	5,4	5,1	3,3	1,9	5,5
Sexo feminino	3 (60%)	0	2 (50%)	2 (66,7%)	5 (71,4%)	3 (50%)	25 (55,6%)
Irmãos < 5 anos	0	1 (50%)	1 (25%)	1 (33,3%)	1 (14,3%)	1 (16,7%)	10 (22,2%)
Falência Nutricional	1 (20%)	2 (100%)	0	0	1 (14,3%)	0	17 (37,8%)
Colonização Bacteriana							
Negativo/ <i>S. aureus</i>	1 (20%)	0	1 (25%)	0	2 (28,6%)	3 (50%)	11 (24,4%)
MRSA Intermitente	2 (40%)	0	0	1 (33,3%)	0	1 (16,7%)	9 (20%)
<i>P. aeruginosa</i> intermitente	3 (60%)	2 (100%)	0	2 (66,7%)	3 (42,9%)	2 (33,3%)	20 (44,4%)
<i>P. aeruginosa</i> crônico	1 (20%)	0	2 (50%)	1 (33,3%)	1 (14,3%)	0	4 (8,9%)

<i>B. cepacia</i> intermitente	0	0	1 (25%)	0	1 (14,3%)	1 (16,7%)	5 (11,1%)
<i>B. cepacia</i> crônico	0	0	0	0	1 (14,3%)	0	5 (11,1%)

Quadro Clínico e Radiológico

Sintomas					6	6	26
Catarrais	3 (60%)	1 (50%)	4 (100%)	3 (100%)	(85,7%)	(100%)	(57,8%)
Piora da tosse	5 (100%)	2 (100%)	4 (100%)	3 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	44 (97,8%)
Piora da secreção respiratória	5 (100%)	1 (50%)	3 (75%)	3 (100%)	7 (100%)	5 (83,3%)	38 (84,4%)
Hemoptise		0	1 (25%)	1 (33,3%)	0	0	1 (2,2%)
Piora da dispnéia	3 (60%)	2 (100%)	0	2 (66,7%)	5 (71,4%)	3 (50%)	27 (60%)
Febre	2 (40%)	2 (100%)	3 (75%)	2 (66,7%)	4 (57,1%)	5 (83,3%)	19 (42,2%)
Prostração	0	1 (50%)	2 (50%)	2 (66,7%)	4 (57,1%)	2 (33,3%)	10 (22,2%)
Anorexia/ Perda ponderal	3 (60%)	1 (50%)	1 (25%)	2 (66,7%)	4 (57,1%)	4 (66,7%)	26 (57,8%)
Dor sinusal	1 (20%)	0	0	0	0	0	2 (4,4%)
Auscul respiratória normal	2 (40%)	0	0	0	3 (42,9%)	0	3 (6,7%)
Estertoraçã difusa	1 (20%)	1 (50%)	1 (25%)	1 (33,3%)	2 (28,6%)	3 (50%)	13 (28,9%)
Estertoraçã localizada	2 (40%)	0	2 (50%)	2 (66,7%)	2 (28,6%)	1 (16,7%)	22 (48,9%)
Sibilância localizada	0	0	0	0	0	0	2 (4,4%)
Sibilância difusa	1 (20%)	0	0	1 (33,3%)	0	1 (16,7%)	4 (8,9%)

Redução do Murmúrio Vesicular	1 (20%)	2 (100%)	1 (25%)	0	5 (71,4%)	1 (16,7%)	20 (44,4%)
Queda de Saturação de O ₂	2 (40%)	1 (50%)	0	1 (33,3%)	2 (28,6%)	1 (16,7%)	15 (33,3%)
Tratamento							
Antibioticoterapia	4 (80%)	2 (100%)	3 (75%)	3 (100%)	5 (71,4%)	4 (66,7%)	40 (88,9%)
Oseltamivir	0	1 (50%)	0	0	0	0	0
Internação Hospitalar	2 (40%)	2 (100%)	1 (25%)	3 (100%)	3 (42,9%)	1 (16,7%)	21 (46,7%)
Duração da Internação (média)	15 (13-17; +-2,8)	13 (12-14; +-1,4)	16	16 (14-18; +-2)	14 (7-21; +-7)	18	16,5 (8-34; +-5,6)
Oxigenioterapia contínua	1 (20%)	1 (50%)	0	2 (66,7%)	2 (28,6%)	1 (16,7%)	15 (33,3%)
Ventilação não invasiva	0	1 (50%)	0	1 (33,3%)	1	0	4 (8,9%)
Radiografia de Tórax realizada	4 (80%)	2 (100%)	2 (50%)	2 (66,7%)	3 (42,9%)	5 (83,3%)	35 (77,8%)
Alteração radiográfica aguda	1 (25%)	2 (100%)	1 (50%)	1 (50%)	2 (66,7%)	1 (20%)	20 (57,1%)
Escores de Gravidade							
CFCS ^a (média)	27,2 (24-35; +-4,6)	38 (37-39; +-1,4)	27,8 (23-31; +-3,4)	34,7 (31-37; +-3,2)	31,1 (19-38; +-6,9)	30,1 (27-37; +-3,8)	29,4 (18-41; +-5,9)
Shwachman (média)	70 (60-80; +-7,9)	70 (65-75; +-5,1)	73,8 (60-95; +-17)	63,3 (60-70; +-5,8)	68,6 (45-85; +-14,3)	80 (70-90; +-8,4)	71,6 (35-90; +-12,4)

a- Cystic Fibrosis Clinical Score

O resultado da cultura bacteriana de secreção respiratória (swab nasofaríngeo ou escarro), realizada na data da coleta para pesquisa viral, encontra-se na Tabela 10. Em dois

casos este exame não foi realizado. Comparou-se o resultado da cultura bacteriana do momento da exacerbação com o resultado da última coleta do paciente antes do quadro, a fim de se avaliar se houve alteração da flora detectada. Estes resultados se encontram na Tabela 11. Além disso, foram levantados também os resultados da cultura bacteriana da primeira consulta após a exacerbação, em um intervalo de um a quatro meses, e avaliado a presença de *Pseudomonas*. Foi possível obter este dado em relação a 58 amostras, como demonstrado na Tabela 12.

Em vista da maior incidência e gravidade das infecções respiratórias agudas na população geral em menores de cinco anos, foi realizada uma análise deste subgrupo. Houve 37 amostras (52,9%) nesta faixa etária, das quais dez (27%) foram positivas, sendo seis com detecção de VSR; duas de hMpV, uma de FLUA, uma de PIV1, uma de AdV. As características clínico-epidemiológicas deste subgrupo se encontram na Tabela 13, e bacteriológicas na Tabela 14.

Tabela 10- Resultado da cultura bacteriana de secreção respiratória em comparação com amostras positivas e negativas para vírus respiratórios.

Resultado da Cultura Bacteriana	Grupo Positivo (n=24)	Grupo Negativo (n=44)	p Valor
Negativo	3 (12,5%)	7 (15,9%)	1
<i>S. aureus</i>	13 (54,2%)	25 (56,8%)	0,83
MRSA ^a	3 (12,5%)	6 (13,6%)	1
<i>K. pneumoniae</i>	0	1 (2,3%)	1
<i>P. aeruginosa</i>	11 (45,8%)	12 (27,3%)	0,12
<i>B. cepacia</i>	1 (4,2%)	8 (18,2%)	0,14
<i>A. xylosoxidans</i>	1 (4,2%)	0	0,35
<i>S. maltophilia</i>	2 (8,3%)	0	0,12
<i>K. pneumoniae</i>	0	1 (2,3%)	1
BGNF ^b	1 (4,2%)	2 (4,5%)	1

a- *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

b- Bacilo Gram negativo não fermentador, excluindo-se *Pseudomonas* e *Burkholderia*

Tabela 11- Comparação do resultado da cultura bacteriana do momento da exacerbação em relação ao resultado imediatamente anterior

	Vírus Positivo (n=24)	Vírus Negativo (n=44)	p valor
Isolamento de nova bactéria	14 (58,3%)	16 (36,4%)	0,54
Isolamento de <i>P. aeruginosa</i> , não presente em resultado anterior	6 (25%)	6 (13,6%)	0,32

Tabela 12- Resultado da cultura para *P. aeruginosa* na primeira coleta de secreção respiratória após a exacerbação

	Grupo Vírus Positivo (n=21)	Grupo Vírus Negativo (n=37)	p Valor
Cultura de Seguimento Positiva para <i>Pseudomonas</i>	6 (28,6%)	16 (43,2%)	0,27

Tabela 13- Características clínico-epidemiológicas dos pacientes menores de cinco anos de idade de acordo com a detecção viral positiva ou negativa

Variável	Vírus Positivo (n=14)	Vírus Negativo (n=22)	p valor
Sexo feminino	6 (42,9%)	14 (63,6%)	0,22
Idade - anos (média)	2,3 (0,3-4,9; +-1,3)	2,6 (0,3-4,3; +-1,2)	0,29 ^a
Raça/Cor/Etnia Pardo	5 (35,7%)	6 (27,3%)	0,72
Branco	9 (64,3%)	16 (72,7%)	0,72
Irmãos Menores de 5 anos	2 (14,3%)	5 (22,7%)	0,68
Frequente creche	5 (35,7%)	7 (31,8%)	1
Vacina Influenza	7(13)	10(19)	1
Falência nutricional	2 (14,3%)	8 (36,4%)	0,25
Dias de sintomas na coleta (mediana)	5,0 (1-18; +-5,3)	4,0 (0-30; +-6,9)	0,66 ^b

Insuficiência pancreática	13 (92,9%)	20 (90,9%)	1
Diagnóstico por TIR ^c	10 (71,4%)	17 (77,3%)	0,72
Colonização Bacteriana			
Negativo/ <i>S. aureus</i>	4 (8,6%)	5 (22,7%)	0,72
MRSAd intermitente	1 (7,1%)	5 (22,7%)	0,37
<i>B. cepacia</i> intermitente	1 (7,1%)	2 (9,1%)	1
<i>B. cepacia</i> crônico	1 (7,1%)	2 (9,1%)	1
<i>Pseudomonas</i> intermitente	7 (50%)	13 (59,1%)	0,59
<i>Pseudomonas</i> Crônico	1 (7,1%)	0	0,39
Quadro clínico			
Sintomas catarrais	12 (85,7%)	13 (59,1%)	0,14
Piora da tosse	14 (100%)	22 (100%)	1
Piora da secreção respiratória	11 (78,6%)	15 (68,2%)	0,71
Piora da dispneia	9 (64,3%)	16 (72,7%)	0,72
Hemoptise	0	0	1
Prostração	6 (42,9%)	3 (13,6%)	0,11
Febre	9 (64,3%)	5 (22,7%)	0,01
Anorexia/perda ponderal	8 (57,1%)	11 (50%)	0,68
Queda da saturação de O ₂	4 (8,6%)	7 (31,8%)	1
Alteração na ausculta			
Sibilos localizados	0	1 (4,5%)	1
Sibilos difusos	1 (7,1%)	4 (18,2%)	0,63
Estertores localizados	4 (8,6%)	11 (50%)	0,2
Estertores difusos	5 (35,7%)	5 (22,7%)	0,46
Redução do murmúrio Vesicular	6 (42,9%)	8 (36,4%)	0,5
Radiografia de Tórax			
	12 (85,7%)	17 (77,3%)	0,23

Alteração Aguda Sugestiva de Infecção	5 (41,7%)	11 (64,7%)	0,01
Tratamento			
Antibioticoterapia	10 (71,4%)	19 (86,4%)	0,39
Oseltamivir	0	0	1
Oxigênio terapia contínua	4 (8,6%)	7 (31,8%)	1
Ventilação não Invasiva	1 (7,1%)	2 (9,1%)	1
Internação Hospitalar	6 (42,9%)	10 (45,4%)	1
Duração da Internação Hospitalar - dias (média)	15,2 (7-21; +-4,8)	15,9 (10-24; +- 4,7)	0,88
Escores de Gravidade			
CFCS ^e (média)	30,3 (19-38; +-5,7)	28,1 (19-37; +-4,4)	0,12 ^a
Escore de Shwachman (média)	78,2 (65-95; +-8,5)	76,4 (60-90: +-7,4)	0,25 ^a

*4 pacientes excluídos do total pois idade <6 meses, sendo 1 positivo para vírus e 3 negativos

a- teste t de Student

b- teste U de Mann Whitney

c- Tripsina Imunorreativa

d- *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

e- *Cystic Fibrosis Clinical Score*

Tabela 14- Resultado da cultura bacteriana na secreção respiratórias dos pacientes menores de 5 anos de idade

Resultado da Cultura Bacteriana	Grupo Positivo (n=14)	Grupo Negativo (n=21)	p Valor
Negativo	3 (21,4%)	5 (23,8%)	1
<i>S. aureus</i>	7 (50%)	13 (61,9%)	0,49
MRSA ^a	2 (14,3%)	2 (9,5%)	1
<i>P. aeruginosa</i>	6 (42,9%)	4 (19,0%)	0,15
<i>B. cepacia</i>	1 (7,1%)	4 (19,0%)	0,63
<i>S. maltophilia</i>	1 (7,1%)	0	0,4
<i>K. pneumoniae</i>	0	1 (4,8%)	1
BGNF ^b	1 (7,1%)	1 (4,8%)	1

a- Staphylococcus aureus resistente a meticilina

b- Bacilo Gram Negativo Não Fermentador, excluindo-se Pseudomonas e Burkholderia

Uma vez que alguns estudos sugeriram que as infecções por RV seriam menos graves que pelos demais vírus respiratórios, foram realizadas também as análises de medidas de gravidade excluindo-se os pacientes positivos para RV do grupo vírus - positivo. Os resultados encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15- Características dos grupos positivo e negativo para vírus respiratórios, excluídos os rinovírus

Variável	Vírus Positivo (n=18)	Vírus Negativo (n=52)	p valor
Idade – anos (mediana)	4,4 (0,5-16,8; +- 3,9)	4,9 (0,3-17,9; +-4,9)	0,21 ^a
Radiografia de Tórax realizada	14 (77,8%)	38 (73,1%)	0,76
Alteração Aguda sugestiva de Infecção	6 (42,9%)	22 (57,9%)	0,33
Tratamento			
Antibioticoterapia	14 (77,8%)	45 (86,5%)	0,19
Oseltamivir	1 (5,6%)	0	0,26
Oxigenioterapia contínua	4 (22,2%)	17 (32,7%)	0,4
Ventilação Não Invasiva	2 (11,1%)	5 (9,6%)	1
Internação Hospitalar	7 (38,9%)	24 (46,1%)	0,59
Duração – dias (mediana)	14 (12-18; +- 2,2)	14,5 (7-34;+- 5,7)	0,65 ^a
Escores de Gravidade			
CFCS ^c (média)	30 (23-39; +-5)	29,6 (18-41; +-6)	0,4 ^b
Escore de Shwachman (média)	73,6 (60-90; +- 11)	71,1 (35-90;+-12,5)	0,22 ^b

a- teste t de Student

b- teste U de Mann Whitney

c- *Cystic Fibrosis Clinical Score*

6- DISCUSSÃO

6.1 Prevalência dos Vírus Respiratórios

As exacerbações respiratórias são a principal causa de morbimortalidade na FC, e a participação dos vírus respiratórios nestes quadros vem sendo cada vez mais reconhecida. Neste estudo foram avaliadas 70 amostras de swab nasofaríngeo de 40 pacientes com FC coletadas em momento de ER. A prevalência dos vírus respiratórios nas amostras foi de 35,7%. Apesar desta taxa de positividade para detecção viral ter sido significativa, foi menor do que em outros estudos que também utilizaram técnica de RT-PCR (ASNER et al., 2012 ; COLLINSON et al., 1996; EMERSON et al., 2013 ; JONES et al., 2011). Um dos principais motivos para esta diferença pode ter sido os critérios mais amplos adotados para definição de ER.

Collinson et al. (1996) utilizaram como indicação para coleta a presença de IVAS, sendo 51% das 119 amostras positivas para picornavírus. Asner et al. (2012), por exemplo, detectaram vírus em 60,5% das 43 amostras coletadas em ER. No entanto, naquele estudo, ER foi definida pela presença de apenas um dos seguintes fatores: alteração da secreção respiratória; aumento da tosse; febre; alteração do exame físico respiratório. Emerson et al. (2013) utilizaram como parâmetro a presença de novos sinais de doença respiratória, encontrando 81% de positividade para vírus em 43 amostras autocoletadas. Tais definições, muito mais amplas podem englobar quadros leves, que não resultam em grande impacto na morbidade e prognóstico dos pacientes, podendo inclusive incluir quadros de IVAS sem descompensação da doença de base. Uma vez que os vírus são os principais agentes deste tipo de infecção, isto pode ter contribuído para uma maior taxa de detecção viral nestes estudos, não havendo em muitos casos uma importância clínica associada. Do mesmo modo, Jones et al. (2011) obtiveram detecção viral positiva em 47,2% de 25 amostras, utilizando como critério para coleta a presença de quadro sugestivo de infecção respiratória viral, independente da presença de ER estritamente definida. O presente estudo adotou os critérios de ER definidos por Fuchs et al. (1994), mais restritivos que aqueles usados nos trabalhos anteriormente descritos. Deste modo, podemos assegurar que a prevalência de detecção viral em nosso estudo é mais representativa de eventos com maior impacto clínico, em comparação com a maioria dos trabalhos realizados com pacientes de FC até o momento.

Analisando a literatura, observamos o grande efeito da idade sobre a prevalência de infecções virais nas amostras estudadas. Num trabalho recente, Stelzer Braid et al. (2017), detectaram RV em 43% das 44 amostras de crianças menores de 5 anos em ER, porém em somente 12% das 76 amostras de maiores de 5 anos. Uma vez que as infecções virais respiratórias são mais frequentes em crianças jovens, estudos com menor faixa etária tendem a ter taxas de positividade mais altas. No entanto, no presente estudo a taxa de detecção foi menor do que em outros estudos pediátricos (COLLINSON et al., 1996; JONES et al., 2011; ASNER et al., 2012; EMERSON et al., 2013) mas similares às obtidas por Ramirez et al. (2014), HOEK et al. (2013) e Flight et al. (2014), cujas amostras prioritariamente de adultos apresentaram 38%, 33,3% e 40% de positividade respectivamente. É interessante notar que estes estudos apresentaram maior taxa de colonização por *P. aeruginosa* do que os estudos pediátricos anteriormente citados, similar à nossa amostragem. Apesar de diversos estudos sugerirem um sinergismo entre a infecção por esta bactéria e vírus respiratórios em pacientes com FC (BELLINGHAUSEN et al., 2016; CHATTORAJ et al., 2011; HENDRICKS et al., 2016; KIENINGER et al., 2013), é possível que em populações com alta prevalência de pseudomonas ocorra uma maior frequência de ER devido a reconhecida morbidade atribuída a esta bactéria, independente da presença de vírus respiratórios associados.

Outro fator que afeta a taxa de detecção viral é a sazonalidade das coletas. Neste estudo, amostras foram coletadas durante doze meses, o que nos permitiu avaliar a distribuição dos diferentes vírus através das estações, uma vez que sabidamente os patógenos respiratórios tem circulação sazonal. Diferentemente, alguns trabalhos foram realizados com amostras coletadas apenas em estações associadas a maior circulação viral, o que associado a critérios de inclusão mais abrangentes, contribuiu para as maiores taxas de positividade (ASNER et al., 2012; JONES et al., 2011; RAMIREZ et al., 2014). Também observamos ser variável nos estudos realizados até o momento é o tempo de coleta das amostras respiratórias após o início dos sintomas. É esperada uma direta influência do tempo entre início de sintomas e a coleta na taxa de positividade das amostras testadas para agentes virais, uma vez que quanto mais prolongada a infecção, menores as cargas virais esperadas. Neste estudo, as amostras foram coletadas de forma oportuna, no momento em que o paciente apresentava-se no hospital em ER, conforme rotina própria de agendamentos do serviço de acompanhamento dos pacientes com FC. Entretanto, como não houve orientação aos pacientes para que buscassem o serviço a partir dos primeiros sintomas de piora, uma vez que o IFF não dispõe

de serviço de emergência, obtivemos em muito casos intervalos maiores do que os planejados entre o início de sintomas e a coleta, o que possivelmente contribuiu para o padrão de altos Cts obtidos nas amostras positivas. Ainda assim, o tempo mediano de sintomas na coleta foi de 6 dias, sem distinção para os grupos positivo e negativo para vírus respiratórios. Este resultado corrobora aquele obtido por Asner et al. (2012), num estudo com tempo de coleta semelhante mas que devido a maior abrangência da amostragem apresentou altas taxas de detecção viral. Por outro lado, Emerson et al. (2013), ao utilizarem autocoleta domiciliar pelos pacientes, obtiveram não só menores tempos entre o início de sintomas e a coleta, mas também uma maior altíssima de positividade para vírus (81,4%) com menores Cts. Um protocolo de autocoleta poderia ser uma boa estratégia para novos estudos em pacientes com FC, observadas os critérios éticos e as limitações do sistema de saúde no país. Por fim, a taxa de detecção viral pode ter sido subestimada por não se ter pesquisado CoV e hBoV, avaliados em outros estudos (ASNER et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2010; EMERSON et al., 2013; GOFFARD et al., 2014; HOEK et al., 2013; KORTEN et al., 2018; RAMIREZ et al., 2014), apesar da pequena prevalência destes vírus nos mesmos. É importante considerar esta possibilidade principalmente nos sete casos nos quais tanto a pesquisa viral quanto bacteriana foi negativa.

A pesquisa viral foi realizada por RT-PCR para todos os vírus em todas as amostras, sendo grande parte também submetida a pesquisa de VSR, PIV, AdV, FLU A e B por imunofluorescência. No entanto, a taxa de detecção por este método se mostrou menor em comparação com o protocolo de RT-PCR com detecção em tempo real. Dentre 14 amostras com RT-PCR positivo para um destes agentes, 12 foram submetidos a IFI e somente duas tiveram resultado positivo: um VSR e um influenza A. Por outro lado, uma amostra cujo RT-PCR foi negativo, teve IFI positiva para VSR. A menor sensibilidade do método justifica a menor prevalência de vírus em estudos realizados com esta metodologia (ONG et al., 1989; SMYTH et al., 1995).

Em relação às espécies de vírus identificados, os mais prevalentes no estudo foram RV/Enterovírus/coxsackie vírus. Uma vez que a reação utilizada não permite a distinção entre estes três picornavírus, não foi possível estabelecer a prevalência exata de RV na amostra. Este foi o vírus mais encontrado em ER na quase totalidade da literatura revisada, independente de faixa etária (DE ALMEIDA et al., 2010; EMERSON et al., 2013; ESPOSITO et al., 2014; ESTHER et al., 2014; FLIGHT et al., 2014; GOFFARD et al.,

2014 ; JONES et al., 2011 ; KORTEN et al., 2018 ; RAMIREZ et al., 2014 ; WAT et al., 2008). A exceção foi o estudo de Asner et al. (2012), no qual Coxsackie /Echovírus foram os mais prevalentes.

O VSR foi o segundo vírus mais detectado, e o que apresentou menor taxa de internação, apesar de outros estudos sugerirem um maior potencial de gravidade da infecção por este vírus em pacientes com FC (ABMAN et al., 1988; COLASURDO et al., 2006). Uma possível explicação para esta diferença é a idade média da amostra (4,7 anos na população total e 2 anos no grupo positivo para VSR), uma vez que as infecções mais graves por este agente ocorrem em menores de dois anos. O AdV, terceiro mais frequente, detectado em 20% das amostras positivas, foi pouco frequente em outros estudos nacionais e internacionais (DE ALMEIDA et al., 2010; WAT et al., 2008). Em relação ao PIV, os três tipos pesquisados (1, 2 e 3) foram detectados com igual frequência (uma amostra positiva de cada). Houve duas detecções de Influenza A, sendo um de cada um dos subtipos adaptados a população humana: um H1N1pdm09 e um H3N2. O Sistema de vigilância de influenza do Ministério da Saúde mostrou que houve co-circulação destes dois subtipos em 2018, bem como do influenza B, especialmente no fim do ano, após o declínio na prevalência dos subtipo A na população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Apesar de o vírus influenza B ser fortemente associado a infecções em crianças, não houve nenhuma detecção deste vírus em nosso estudo.

Dos 25 casos positivos para vírus, apenas dois (8%) apresentaram codetecção viral, sendo um caso de PIV e VSR e outro de PIV e hMpV. No estudo publicado por Cousin et al. (2016), houve apenas um caso de codetecção (RV e hMpV). Outros estudos assinalaram frequências maiores de codetecção, variando de 9,5% (WAT et al., 2008), 12,8% (DE ALMEIDA et al., 2010) a 34,6% (ASNER et al., 2012), sendo o VSR o mais associado a coinfeção neste último estudo.

6.2 Características Epidemiológicas da Amostra

A amostra do estudo foi composta por 70 pacientes portadores de FC, diagnosticados por clínica compatível somada a teste do suor positivo ou confirmação genética. A mutação mais frequente na população foi a F508del, a mais frequente no mundo e também no Brasil (GBEFC, 2017; NUNES et al., 2017). A mediana de idade dos pacientes foi 3,9 anos no grupo positivo para vírus e 5,5 no grupo negativo. Apesar de não alcançar significância

estatística, a positividade para vírus se associou a menor idade, assim como em outros estudos na literatura (ASNER et al., 2012; ESTHER et al., 2014; STELZER-BRAID et al., 2017). O VSR apresentou média de idade mais jovem que os demais vírus, o que é compatível com a epidemiologia deste agente, mais frequente em crianças menores de dois anos de idade.

Embora Asner et al. (2012) tenham descrito uma maior frequência de detecção viral no sexo masculino, no presente estudo não houve diferença significativa entre os sexos, assim como em outros estudos (GOFFARD et al., 2014; SMYTH et al., 1995). A raça/cor/etnia mais frequente na população foi branca, não havendo diferença entre os grupos positivo e negativo para vírus. A presença de irmãos menores de cinco anos no domicílio não se associou a maior positividade viral, bem como a permanência em creche para os menores de 5 anos. Já para Flight et al. (2014), a presença de crianças no domicílio aumentou a chance de detecção viral.

A presença de falência nutricional foi mais frequente no grupo negativo para vírus. Isto difere da maior parte da literatura, que não descreve diferença no status nutricional dos dois grupos (ASNER et al., 2012; GOFFARD et al., 2014; SMYTH et al., 1995). Por outro lado, não houve diferença significativa do Escore de Shwachman entre os grupos, que avalia a gravidade e estadiamento da FC, assim como em Goffard et al. (2014). Sugere-se, por tanto, que as infecções virais não sejam mais comuns nos pacientes mais graves.

Houve detecção viral em todos os meses do ano, exceto dezembro, porém a maior concentração de positividade foi de março a agosto, nas estações de outono e inverno, como em outros estudos (GOFFARD et al., 2014). Em janeiro e fevereiro apenas RV foi identificado. Estas são as estações mais associadas à circulação de vírus respiratórios. Houve dois casos de Flu A na amostra do estudo, sendo um Influenza A H3N2 (detectado em abril) e um Influenza A (H1N1)pdm09 em junho. De acordo com o programa de vigilância do Ministério da Saúde, a circulação de Influenza A(H3N2) na região Sudeste predominou de março a julho, com pico em junho. Já a de Influenza A(H1N1) ocorreu de março a agosto, com pico também em junho. Também de acordo com os dados do MS, a circulação de VSR predominou de março a setembro. Neste estudo, o VSR foi detectado de abril a setembro, com pico também em abril (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

6.3 Relação da Detecção Viral com Cultura Bacteriana

Nesta amostragem, a cultura de *P. aeruginosa* foi mais frequente no grupo positivo para vírus (45,8%) do que no negativo (27,3%), apesar de não alcançar significância estatística. Estas taxas são consideravelmente mais altas que em outros estudos (ASNER et al., 2012). No grupo menor de 5 anos, esta diferença se torna ainda mais marcante (42,9% e 19%, respectivamente). Estudos *in vitro* demonstraram que diversos vírus estão associados à infecção por *Pseudomonas* (HENDRICKS et al., 2016) ou, em pacientes já colonizados, liberação desta bactéria do biofilme (CHATTORAJ et al., 2011). Outros estudos clínicos tiveram resultados distintos. Ramirez et al. (2014) também encontraram maior prevalência de *Pseudomonas* nos pacientes com vírus, porém outros estudos não mostraram diferença entre os dois grupos (BURNS et al., 2012; ESTHER et al., 2014; HOEK et al., 2013; WAT et al., 2008).

Além disso, já foi demonstrada associação entre a infecção viral com a aquisição de nova bactéria (COLLINSON et al., 1996). Neste estudo, comparamos a cultura bacteriana do momento da ER com a da consulta imediatamente anterior. A aquisição de *Pseudomonas* (não presente no exame anterior) foi maior no grupo positivo para vírus (25%) do que no negativo (13,6%), embora também sem significância estatística. Olesen et al. (2006), por outro lado, não encontraram diferença da aquisição de *Pseudomonas* entre os grupos.

Do mesmo modo, apesar de não alcançar significância estatística, as infecções virais foram mais frequentes em pacientes com colonização intermitente ou, principalmente, crônica por *P. aeruginosa*. Já foi sugerido que a presença de bactérias no trato respiratório de indivíduos com FC favoreça a infecção viral (BELLINGHAUSEN et al., 2016), sendo necessários mais estudos para avaliação do efeito específico da *Pseudomonas*.

Por outro lado, quando analisadas as culturas bacterianas coletadas na consulta após a exacerbação (1 a 4 meses), não houve aumento da detecção de *Pseudomonas* no grupo que havia tido detecção viral, sugerindo assim que os efeitos que favorecerem a colonização sejam transitórios. Bucher et al. (2016) também não encontraram associação entre a infecção por FluA e mudança na colonização bacteriana.

6.4 Características Clínicas e Avaliação da Gravidade

Em relação às características clínicas dos pacientes, a presença de sintomas catarrais como congestão nasal e coriza se associou à detecção viral de forma estatisticamente significativa, assim como observado em estudos anteriores (FLIGHT et al., 2014; WAT et al., 2008). Burns et al. (2012) também descrevem esta associação, porém com RV especificamente. Em outros estudos, no entanto, não houve diferença da presença destes sintomas entre os grupos (ASNER et al., 2012; SHAH et al., 2015). A presença de febre e prostração também foram mais frequentes no grupo positivo para vírus, embora sem significância estatística. No entanto, quando analisado o subgrupo com idade menor que cinco anos, a diferença da frequência de febre entre os grupos se torna mais marcante e significativa ($p=0,01$), como descrito por outros autores (ASNER et al., 2012). Para Wat et al. (2008), o vírus influenza em particular se associou à febre quando comparado a outros vírus. De fato, em nossa amostragem, em ambos os casos de influenza se apresentou febre.

Na avaliação da ausculta respiratória, esta se mostrou alterada com mais frequência no grupo negativo para vírus. A principal diferença se mostrou na presença de estertoração localizada, mais frequente nos pacientes negativos para vírus respiratórios, sendo o achado auscultatório mais frequente neste grupo. Tal diferença permanece e torna-se mais marcante no subgrupo menor que 5 anos. Uma possível razão para este achado seria estes casos terem etiopatogenia bacteriana como responsável pelas ER, uma vez que a estertoração localizada é um sinal semiológico associado à ocupação alveolar, mais frequente nestas infecções. No grupo positivo para vírus respiratórios predominaram alterações difusas da ausculta, como estertoração difusa e redução do murmúrio vesicular. Chama a atenção que no subgrupo menor que 5 anos a presença de sibilância difusa não se associou à detecção viral, embora tenha sido frequente a detecção de VSR nesta faixa etária. Este vírus é o mais associado aos quadros de bronquiolite, que geralmente cursam com sibilância difusa. É possível, portanto, que as manifestações clínicas da infecção por VSR em pacientes com FC sejam diferentes da população geral, que muitas vezes se associa a quadros de bronquiolite com sibilância difusa em crianças híidas (SBP, 2017).

A solicitação de radiografia de tórax foi mais frequente no grupo negativo. Este exame é geralmente solicitado em casos mais graves, quando se busca documentar e quantificar a piora radiológica, sendo sempre realizado em caso de internação hospitalar. Deste modo, o

maior número de internações deste grupo pode ter contribuído para o maior número de exames. O percentual de radiografias com presença de alterações agudas sugestivas de infecção também foram mais frequentes no grupo negativo.

O uso de antibióticos foi mais frequente no grupo negativo para vírus, embora sem significância estatística, assim como em Goffard et al. (2014), sugerindo que em casos de grande suspeita clínica de infecção viral tenha-se restringido o uso desta medicação. De fato, a pesquisa de agentes virais nos quadros de ER tem grande potencial de redução do uso de antibiótico, que é muito frequente nos pacientes com FC. Apesar do grande número de casos com co-deteção viral e bacteriana, pode ser razoável que, em pacientes clinicamente estáveis, se aguarde o resultado da pesquisa viral e bacteriana antes do início do tratamento, caso este possa ser obtido prontamente. Em termos de tecnologia para identificação rápida, o protocolo de RT-PCR com detecção em tempo real permite a rápida investigação do caso, facilitando o manejo. Durante o estudo, uma paciente apresentou internação por ER e foi iniciada antibioticoterapia empírica baseada no resultado bacteriológico do último escarro disponível. Enquanto aguardava-se o resultado da nova cultura bacteriana a mesma apresentou persistência da febre, sendo cogitado a troca de antibiótico. No entanto, a pesquisa viral detectou VSR, tendo a equipe médica assistente optado então, com base no achado virológico, pela manutenção do esquema.

Chama a atenção a baixa taxa de prescrição de oseltamivir na população do estudo. Apesar de um grande número de pacientes internados com febre e dispnéia, preenchendo critérios para SRAG, somente um deles recebeu a medicação. Após início empírico do oseltamivir, por RT-PCR confirmou-se a detecção de influenza A (H3N2) neste paciente. Já no segundo paciente com influenza detectada, não foi iniciada medicação empiricamente, e o resultado da pesquisa viral ficou disponível após 5 dias de sintomatologia, com paciente já apresentando melhora do quadro, sendo optado por não se iniciar a medicação. Em vista da alta gravidade dos casos de influenza na população com FC, deve-se incentivar a suspeita clínica e o início da administração de Oseltamivir empírico nestes pacientes, como é preconizado pelo MS. Além disso, apesar da FC constituir indicação para vacinação anual contra influenza, apenas 58,1% da população do estudo havia sido vacinada. Baixas taxas de vacinação também foram descritas por outros estudos (COUSIN et al., 2016; SOMAYAJI et al., 2017). Tal achado é preocupante, uma vez que diversos estudos caracterizaram um alto

risco de morbidade por influenza em pacientes com FC (RENK et al., 2014), com até 48% dos pacientes infectados necessitando de hospitalização (VIVIANI et al., 2011).

Sinais indiretos de gravidade, como dispnéia, queda de saturação de oxigênio, necessidade de internação hospitalar e necessidade de oxigenioterapia contínua foram mais frequentes no grupo negativo para vírus, porém sem significância estatística. A única exceção foi a necessidade de ventilação não invasiva, discretamente maior no grupo positivo. Os valores médios do CFCS, utilizado como medida objetiva de gravidade da exacerbação, foram muito similares entre os dois grupos. Este resultado difere de estudos anteriores, que haviam sugerido maior gravidade das ER com detecção viral (ASNER et al., 2012; COUSIN et al., 2016; ETHERINGTON et al., 2014; FLIGHT et al., 2014). Comparando-se os diferentes vírus, nota-se que o vírus influenza A teve a maior média de CFCS. Ambos os casos onde foi feita a detecção deste agente cursaram com dispnéia e necessitaram de internação hospitalar e suporte ventilatório, sendo um com oxigenioterapia isolada e outro com ventilação não invasiva. Apesar do número limitado de casos, estes resultados chamam a atenção para a potencial gravidade do influenza em pacientes com FC, já descrito em outros estudos (RENK et al. 2014; VIVIANI et al., 2011).

Outra medida de gravidade que pode ser avaliada em pacientes com FC é a função respiratória. Achados em relação ao efeito das infecções virais na função pulmonar tem sido controversos, com alguns estudos descrevendo associação destes agentes com maior queda do VEF1 (ETHERINGTON et al., 2014) ou menor recuperação deste após a ER (COUSIN et al. 2016), enquanto outros não encontraram diferença entre pacientes positivos ou negativos para os vírus respiratórios testados (COLLINSON et al., 1996; SMYTH et al., 1995). Neste dado entretanto, não podemos fazer nenhuma comparação, pois não foi possível a avaliação espirométrica dos pacientes.

Vários trabalhos buscaram a associação de um agente etiológico viral aos quadros de ER em pacientes com FC. Apesar de alguns estudos demonstrarem uma associação significativa entre a infecção por RV e as ER (GOFFARD et al. 2014; STELZER-BRAID et al., 2017), outros questionaram o papel etiológico deste agente. Para Burns et al. (2012) ele não se associou a ER, e para De Almeida et al. (2010) apenas os subtipos A2 e C se associaram. Por este motivo, realizamos uma análise dos indicadores de gravidade excluindo-se do grupo positivo aqueles com detecção de RV. No entanto não houve alteração significativa destes indicadores.

A principal limitação do estudo foi a impossibilidade de convocação dos pacientes para coleta das amostras no surgimento dos primeiros sintomas de ER, uma vez que o IFF não dispõe de serviço de emergência, e as coletas foram realizadas de modo oportuno conforme pacientes compareceram às consultas, em sua grande maioria pré agendadas. Esta impossibilidade pode ter aumentado o tempo entre início de sintomas e coleta das amostras, e afetado a taxa de positividade encontrada. Além disso, a não distinção entre RV/entero/coxsachie devido às sondas utilizadas limitou a identificação precisa da proporção de RV positivos da amostra.

7- CONCLUSÕES

Neste estudo, os vírus respiratórios foram identificados em um número significativo de amostras (35,7%), corroborando sua alta frequência nestes eventos. No entanto, uma vez que só foram avaliados pacientes em ER, não foi possível estabelecer relação causal entre a presença dos vírus e as ER, mas que já foi estabelecida por outros estudos (WAT et al., 2008; DE ALMEIDA et al., 2010; FLIGHT et al., 2014), não sendo objeto desta dissertação.

Os vírus mais comuns foram RV/enterovírus/coxsackie vírus, sendo o RV o mais frequente na literatura (DE ALMEIDA et al., 2010; EMERSON et al., 2013; ESPOSITO et al., 2014; ESTHER et al., 2014; FLIGHT et al., 2014; GOFFARD et al., 2014; JONES et al., 2011; KORTEN et al., 2018; RAMIREZ et al., 2014; WAT et al., 2008). No entanto, uma importante limitação do nosso e de outros estudos aqui citados foi a não diferenciação entre estes vírus. Houve dois casos de influenza, ambos com necessidade de antibioticoterapia, e apenas um caso de prescrição de oseltamivir. A taxa de vacinação dos pacientes com FC também se mostrou muito abaixo do indicado.

A detecção dos vírus coincidiu com a sazonalidade de circulação dos vírus respiratórios no Sudente, com pico de casos de Maio a Agosto. A presença de vírus respiratórios foi mais prevalente em pacientes mais jovens, e se associou de forma estatisticamente significativa à presença de sintomas catarrais na população geral do estudo, e à febre em menores de cinco anos. A presença de estertoração localizada foi mais frequente no grupo negativo para vírus. Não houve diferença significativa em indicadores de gravidade.

Apesar de não alcançar significância estatística, a detecção de vírus foi mais comum em pacientes colonizados de forma intermitente, ou principalmente, crônica por *P. aeruginosa*, e a detecção desta bactéria durante a ER foi mais comum no grupo com vírus. No entanto, a cultura de pseudomonas na consulta após a ER foi menor no grupo positivo. Ainda são necessários mais estudos para avaliação da relação dos vírus respiratórios com o microbioma bacteriano do trato respiratório de indivíduos com FC, e as consequências desta interação para as ER.

8- PERSPECTIVAS

Devido à alta prevalência de RV/enterovírus/coxsackie vírus na amostra estudada, faz-se necessário prosseguir a investigação com o sequenciamento das amostras positivas para estes vírus a fim de distinguir entre estes vírus, além de caracterizar os subtipos de RV. Além disso, pode-se realizar também o sequenciamento dos vírus VSR e Influenza detectados, permitindo a comparação genética entre amostras de pacientes com FC, outros grupos de risco e a população geral. A análise das amostras para a presença de coronavírus e bocavírus também poderia identificar mais casos positivos. Seria também interessante prosseguir o estudo, a fim de obter um maior número de pacientes, o que poderia agregar um poder estatístico maior às análises.

A elaboração de estudo prospectivo, com grupo controle de indivíduos com FC sem ER, e com avaliação de marcadores inflamatórios na secreção respiratória, poderia permitir um melhor conhecimento em relação ao papel etiopatogênico de cada espécie de vírus, além de sua interação com a flora bacteriana colonizadora destes pacientes.

Em vista da frequência dos vírus nas exacerbações, corroboradas por este estudo, é necessário a divulgação destes dados nos centros de referência para tratamento de FC, a fim de se implementarem medidas de prevenção, como isolamento de casos suspeitos, e tratamento. Isto se aplica principalmente ao vírus influenza, que possui profilaxia disponível com vacinação e tratamento com oseltamivir, ambos subutilizados no presente estudo.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABMAN, Steven H.; OGLE, John W.; BUTLER-SIMON, Nancy; *et al.* Role of respiratory syncytial virus in early hospitalizations for respiratory distress of young infants with cystic fibrosis. **The Journal of Pediatrics**, v. 113, n. 5, p. 826–830, 1988.

ARMSTRONG, David; GRIMWOOD, Keith; CARLIN, John B.; *et al.* Severe viral respiratory infections in infants with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v. 26, n. 6, p. 371–379, 1998.

ASNER, Sandra; WATERS, Valerie; SOLOMON, Melinda; *et al.* Role of respiratory viruses in pulmonary exacerbations in children with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society**, v. 11, n. 5, p. 433–439, 2012.

ATHANAZIO, Rodrigo A.; SILVA FILHO, Luiz Vicente R. F.; VERGARA, Alberto A.; *et al.* Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 3, p. 219–245, 2017.

BELLINGHAUSEN, Carla; ROHDE, Gernot G. U.; SVELKOU, Paul H. M.; *et al.* Viral–bacterial interactions in the respiratory tract. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 12, p. 3089–3102, 2016.

BHATT, Jayesh M. Treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. **European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society**, v. 22, n. 129, p. 205–216, 2013.

BILTON, D.; CANNY, G.; CONWAY, S.; *et al.* Pulmonary exacerbation: Towards a definition for use in clinical trials. Report from the EuroCareCF Working Group on outcome parameters in clinical trials, **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 10, p. S79–S81, 2011.

BINDER, Alison M.; BIGGS, Holly M.; HAYNES, Amber K.; *et al.* Human Adenovirus Surveillance — United States, 2003–2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 39, p. 1039–1042, 2017.

BJORNSON, Candice; CHAN, Parco; LI, Abby; *et al.* Palivizumab prophylaxis for respiratory syncytial virus in infants with cystic fibrosis: is there a need? **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 6, p. 1113–1118, 2018.

BLACK, Robert E.; COUSENS, Simon; JOHNSON, Hope L.; *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9730, p. 1969–1987, 2010.

BOROWITZ, Drucy; BAKER, Robert; STALLINGS, Virginia. Consensus Report on Nutrition for Pediatric Patients With Cystic Fibrosis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 35, n.3, p. 246-259, 2012.

BRITTO, Maria T.; KOTAGAL, Uma R.; HORNUNG, Richard W.; *et al.* Impact of recent pulmonary exacerbations on quality of life in patients with cystic fibrosis. **Chest**, v. 121, n. 1, p. 64–72, 2002.

BUCHER, Julie; BOELLE, Pierre-Yves; HUBERT, Dominique; *et al.* Lessons from a French collaborative case–control study in cystic fibrosis patients during the 2009 A/H1N1 influenza pandemic. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4736161/>>. Acesso em: 21 nov. 2018.

BUCHS, Clélia; DALPHIN, Marie-Laure; SANCHEZ, Stéphane; *et al.* Palivizumab prophylaxis in infants with cystic fibrosis does not delay first isolation of *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Pediatrics**, v. 176, n. 7, p. 891–897, 2017.

BURNS, Jane L.; EMERSON, Julia; KUYPERS, Jane; *et al.* Respiratory viruses in children with cystic fibrosis: viral detection and clinical findings. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 6, n. 3, p. 218–223, 2012.

CABEÇA, Tatiane K.; CARRARO, Emerson; WATANABE, Aripuana; *et al.* Infections with human coronaviruses NL63 and OC43 among hospitalised and outpatient individuals in São Paulo, Brazil, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 693–694, 2012.

CARMODY, Lisa A.; ZHAO, Jiangchao; KALIKIN, Linda M.; *et al.* The daily dynamics of cystic fibrosis airway microbiota during clinical stability and at exacerbation. **Microbiome**, v. 3, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4381400/>>. Acesso em: 29 out. 2018.

CDC. Center for Disease Control. CDC Growth Charts, atualizado em 7 dez 2016. Disponível em: https://www.cdc.gov/growthcharts/cdc_charts.htm. Acesso em: jan. 2019.

CHATTORAJ, Sangbrita S.; GANESAN, Shyamala; JONES, Andrew M.; *et al.* Rhinovirus infection liberates planktonic bacteria from biofilm and increases chemokine responses in cystic fibrosis airway epithelial cells. **Thorax**, v. 66, n. 4, p. 333–339, 2011.

CFF - CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. 2017 Patient Registry Annual Data Report. [s.l.], 2018. Disponível em: <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>.

CHENG, Po-Yung; PALEKAR, Rakhee; AZZIZ-BAUMGARTNER, Eduardo; *et al.* Burden of influenza-associated deaths in the Americas, 2002–2008. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 9, n. Suppl 1, p. 13–21, 2015.

CHIN, Melanie; ZOYSA, Maya De; SLINGER, Robert; *et al.* Acute effects of viral respiratory tract infections on sputum bacterial density during CF pulmonary exacerbations. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 14, n. 4, p. 482–489, 2015.

CLIFTON, I. J.; KASTELIK, J. A.; PECKHAM, D.G.; *et al.* Ten years of viral and non-bacterial serology in adults with cystic fibrosis. **Epidemiology and Infection**, v. 136, p. 128–134, 2008.

COLASURDO, Giuseppe N.; FULLMER, Jason J.; ELIDEMIR, Okan; *et al.* Respiratory syncytial virus infection in a murine model of cystic fibrosis. **Journal of Medical Virology**, v. 78, n. 5, p. 651–658, 2006.

COLEMAN, Christopher M.; FRIEMAN, Matthew B. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. **Journal of Virology**, v. 88, n. 10, 2014. Disponível em: <<https://jvi.asm.org/content/88/10/5209.long>>. Acesso em: março de 2019.

COLLINSON, J.; NICHOLSON, K. G.; CANCIO, E.; *et al.* Effects of upper respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis. **Thorax**, v.51, p. 1115-1122, 1996.

COSTA, André N.; COSTA, Felipe M.; CAMPOS, Silvia V.; *et al.* The pulmonary microbiome: challenges of a new paradigm. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.44, n.5, p. 424-432, 2018.

COUSIN, Mathias; MOLINARI, Nicolas; FOULONGNE, Vincent; *et al.* Rhinovirus-associated pulmonary exacerbations show a lack of FEV 1 improvement in children with cystic fibrosis. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 10, n. 2, p. 109–112, 2016.

CUTTING G.R., ZEITLIN P.L. Genetics and pathophysiology of cystic fibrosis. *In*: WILMOTT, R.W.; BUSH, A.; BOAT, T.F.; DETERDING, R.R.; RATJEN, F.; CHERNICK, V. **Kendig and Chernick's Disorders of the respiratory tract in children**. 8^a Ed. Philadelphia: Saunders, 2012. p 753-62.

DA SILVA FILHO, Luiz Vicente R. F.; ZERBINATI, Rodrigo M.; TATENO, Adriana F.; *et al.* The differential clinical impact of human coronavirus species in children with cystic fibrosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 3, p. 384–388, 2012.

DE ALMEIDA, Marina B.; ZERBINATI, Rodrigo M.; TATENO, Adriana F.; *et al.* Rhinovirus C and respiratory exacerbations in children with cystic fibrosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 996–999, 2010.

DEBUR, Maria do Carmo; BORDIGNON, Juliano; DOS SANTOS, CLaudia N. D. *et al.*, Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil, **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 1, p. 59–62, 2007.

DUNN, James J.; MILLER, Melissa B. Emerging respiratory viruses other than Influenza. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 34, n. 2, p. 409–430, 2014.

EMERSON, Julia; COCHRANE, Elizabeth; MCNAMARA, Sharon; *et al.* Home Self-Collection of nasal swabs for diagnosis of acute respiratory virus infections in children with cystic fibrosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 2, n. 4, p. 345–351, 2013.

ESPOSITO, Susanna; DACCÒ, Valeria; DALENO, Cristina; *et al.* Human rhinovirus infection in children with cystic fibrosis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 67, n. 5, p. 399–401, 2014.

ESTHER, Charles R.; LIN, Feng-Chang; KERR, Alan; *et al.* Respiratory viruses are associated with common respiratory pathogens in cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v. 49, n. 9, p. 926–931, 2014.

ETHERINGTON, C.; NASEER, R.; CONWAY, S. P.; *et al.* The role of respiratory viruses in adult patients with cystic fibrosis receiving intravenous antibiotics for a pulmonary exacerbation. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 13, n. 1, p. 49–55, 2014.

EWIJK, Bart E. van; ZALM, Marieke M. van der; WOLFS, Tom F. W.; *et al.* Prevalence and impact of respiratory viral infections in young children with cystic fibrosis: prospective cohort study. **Pediatrics**, v. 122, n. 6, p. 1171–1176, 2008.

FARRELL, Philip M.; WHITE, Terry B.; REN, Clement L.; *et al.* Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. **The Journal of Pediatrics**, v. 181, p. S4-S15.e1, 2017.

FAWKNER-CORBETT, D. W.; KHOO, S.K.; DUARTE, M.C.; *et al.* Rhinovirus-C detection in children presenting with acute respiratory infection to hospital in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 1, p. 58–63, 2016.

FLIGHT, William G.; BRIGHT-THOMAS, Rowland J.; TILSTON, Peter; *et al.* Incidence and clinical impact of respiratory viruses in adults with cystic fibrosis. **Thorax**, v. 69, n. 3, p. 247–253, 2014.

FRAYMAN, Katherine B.; ARMSTRONG, David S.; GRIMWOOD, Keith; *et al.* The airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease. **Pediatric Pulmonology**, v. 52, n. 11, p. 1384–1404, 2017.

FUCHS, H. J.; BOROWITZ, D. S.; CHRISTIANSEN, D. H.; *et al.* Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 10, p. 637–642, 1994.

GBEFC – GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DA FIBROSE CÍSTICA. Registro Brasileiro de Fibrose Cística 2016. [S.l.], 2017. Disponível em: <http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2018/10/Registro2016.pdf>. Acesso em jan. 2019.

GIAMBERARDIN, Heloisa I. G.; HOMSANI, Sheila; BRICKS, Lucia F.; *et al.* Clinical and epidemiological features of respiratory virus infections in preschool children over two consecutive influenza seasons in southern Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 8, p. 1325–1333, 2016.

GIEBELS, Karin; MARCOTTE, Jacques-Edouard; PODOBA, John; *et al.* Prophylaxis against respiratory syncytial virus in young children with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v. 43, n. 2, p. 169–174, 2008.

GLANVILLE, Nicholas; JOHNSTON, Sebastian L. Challenges in developing a cross-serotype rhinovirus vaccine. **Current Opinion in Virology**, v. 11, p. 83-88, 2015.

GOFFARD, Anne; LAMBERT, Valérie; SALLERON, Julia; *et al.* Virus and cystic fibrosis: rhinoviruses are associated with exacerbations in adult patients. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 60, n. 2, p. 147–153, 2014.

GOSS, Christopher H.; BURNS, Jane L. Exacerbations in cystic fibrosis 1: Epidemiology and pathogenesis. **Thorax**, v. 62, n. 4, p. 360–367, 2007.

GROVES, H. E.; JENKINS, L.; MACFARLANE, M.; *et al.* Efficacy and long-term outcomes of palivizumab prophylaxis to prevent respiratory syncytial virus infection in infants with cystic fibrosis in Northern Ireland. **Pediatric Pulmonology**, v. 51, n. 4, p. 379–385, 2016.

HALL, Caroline B. Respiratory Syncytial virus and parainfluenza virus. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 25, p. 1917–1928, 2001.

HANADA, Shigeo; PIRZADEHM Mina; CARVER, Kyle Y., *et al.* Respiratory Viral Infection-Induced Microbiome Alterations and Secondary Bacterial Pneumonia. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02640/full>>. Acesso em março 2019.

HENDRICKS, Matthew R.; LASHUA, Lauren P.; FISCHER, Douglas K.; *et al.* Respiratory syncytial virus infection enhances *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth through dysregulation of nutritional immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 6, p. 1642–1647, 2016.

HIATT, Peter W.; GRACE, Susan C.; KOZINETZ, Claudia A.; *et al.* Effects of Viral lower respiratory tract infection on lung function in infants with cystic fibrosis. **Pediatrics**, v. 103, n. 3, p. 619–626, 1999.

HOEK, Rogier A. S.; PAATS, Marthe S.; PAS, Suzan D.; *et al.* Incidence of viral respiratory pathogens causing exacerbations in adult cystic fibrosis patients. **Scandinavian Journal Of Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 65–69, 2013.

ICTV - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS. **Virus Taxonomy: 2018b Release**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso em: maio de 2019.

JONES, A. M.; FLIGHT, W.; ISALSKA, B.; *et al.* Diagnosis of respiratory viral infections in cystic fibrosis by PCR using sputum samples. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 6, p. 1486–1487, 2011.

KAHN, Jeffrey S. Epidemiology of human Metapneumovirus, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 546–557, 2006.

KANGA, Jamshed; KUHN, Robert; CRAIGMYLE, Lois; *et al.* Cystic fibrosis clinical score: a new scoring system to evaluate acute pulmonary exacerbation. **Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 8, p. 1343–1356, 1999.

KENNEDY, Joshua L.; TURNER, Ronald B.; BRACIALE, Thomas; *et al.* Pathogenesis of Rhinovirus Infection. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 3, p. 287–293, 2012.

KERAVEC, Marlène; MOUNIER, Jérôme; PRESTAT, Emmanuel; *et al.* Insights into the respiratory tract microbiota of patients with cystic fibrosis during early *Pseudomonas aeruginosa* colonization. **SpringerPlus**, v. 4, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4529844/>>. Acesso em: 24 out. 2018.

KIEDROWSKI, Megan R.; GASTON, Jordan R.; KOCAK, Brian R.; *et al.* *Staphylococcus aureus* Biofilm growth on cystic fibrosis airway epithelial cells is enhanced during respiratory syncytial virus coinfection. **mSphere**, v. 3, n. 4, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6094059/>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

KIENINGER, E.; VAREILLE, M.; KOPF, B. S.; *et al.* Lack of an exaggerated inflammatory response on virus infection in cystic fibrosis. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 2, p. 297–304, 2012.

KORTEN, Insa; KIENINGER, Elisabeth; KLENJA, Shkipe; *et al.* Respiratory viruses in healthy infants and infants with cystic fibrosis: a prospective cohort study. **Thorax**, v. 73, n. 1, p. 13–20, 2018.

LINNANE, Barry; KIERNAN, Miranda G.; O'CONNELL, Nuala H.; *et al.* Anti-RSV prophylaxis efficacy for infants and young children with cystic fibrosis in Ireland. **Multidisciplinary Respiratory Medicine**, v. 10, p. 32, 2015.

MCGIRR, Ashleigh A.; SCHWARTZ, Kevin L.; ALLEN, Upton; *et al.* The cost-effectiveness of palivizumab in infants with cystic fibrosis in the Canadian setting: A decision analysis model. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 13, n. 3, p. 599–606, 2016.

MENG, Jia; STOBART, Christopher C.; HOTARD, Anne L.; *et al.* An Overview of Respiratory Syncytial Virus. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3999198/>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

METZ, Jakob; EBER, Ernst; RESCH, Bernhard. Respiratory syncytial virus infection-associated hospitalization rates in infants and children with cystic fibrosis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 6, p. 545–548, 2017.

MILLER, E. Kathryn; LU, Xiaoyan; ERDMAN, Dean D.; *et al.* Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 6, p. 773–781, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil**. 1a Ed. Brasília, DF, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde 2017**. 2a Ed. Brasília, DF, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico - Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 52 de 2018. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/01/Informe-Epidemiologico-Influenza-2018-SE-52.pdf>. Acesso em jan 2019.

MIRÓ-CANÍS, Sílvia; CAPILLA-RUBIO, Sílvia; MARZO-CHECA, Laura; *et al.* Multiplex PCR reveals that viruses are more frequent than bacteria in children with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 86, p. 1–4, 2017.

MITCHELL, Ian; WONG, S. K.; PAES, B.; *et al.* Respiratory syncytial virus prophylaxis in cystic fibrosis: the Canadian registry of palivizumab data (2005–2016). **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 7, p. 1345–1352, 2018.

MOREIRA, Luciana P.; KAMIKAWA, Janete; WATANABE, Aripuanã S. A.; *et al.* Frequency of Human Rhinovirus species in outpatient children with acute respiratory infections at primary care level in Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 30, n. 7, p. 612-614, 2011.

NAIR, Harish; NOKES, James; GESSNER, Bradford D.; *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis, **Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1545–1555, 2010.

NUNES, Luisa M.; RIBEIRO, Roberto; NIEWIADONSKI, Vivian D. T.; *et al.* A new insight into CFTR allele frequency in Brazil through next generation sequencing. **Pediatric Pulmonology**, v. 52, n. 10, p. 1300–1305, 2017.

OLESEN, Hanne V.; NIELSEN, Lars P.; SCHIOTZ, Peter Oluf. Viral and atypical bacterial infections in the outpatient pediatric cystic fibrosis clinic. **Pediatric Pulmonology**, v. 41, n. 12, p. 1197–1204, 2006.

ONG, E. L.; ELLIS, M. E.; WEBB, A. K.; *et al.* Infective respiratory exacerbations in young adults with cystic fibrosis: role of viruses and atypical microorganisms. **Thorax**, v. 44, n. 9, p. 739–742, 1989.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), atualizado em 23 jan 2019. Disponível em: <https://www.who.int/en/news->

[room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](#). Acesso em jan 2019.

ORTIZ, Justin R.; NEUZIL, Kathleen M.; VICTOR, John C.; *et al.* Influenza-associated cystic fibrosis pulmonary exacerbations. **Chest**, v. 137, n. 4, p. 852–860, 2010.

PANDA, Swagatika; MOHAKUD, Nirmal K.; PENA, Lindomar; *et al.* Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 45–52, 2014.

PECCHINI, Rogério; BEREZIN, Eitan N.; SOUZA, Maria Cândida; *et al.* Parainfluenza virus as a cause of acute respiratory infection in hospitalized children. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 358–362, 2015.

PETERSEN, N. T.; HØIBY, N.; MORDHORST, C. H.; *et al.* Respiratory infections in cystic fibrosis patients caused by virus, chlamydia and mycoplasma--possible synergism with *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 70, n. 5, p. 623–628, 1981.

PILGER, Diogo André; CANTARELLI, Vlademir Vicente; AMANTEA, Sérgio Luis; *et al.* Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 56–60, 2011.

PRINCIPI, Nicola; BOSIS, Samantha; ESPOSITO, Susanna. Effects of Coronavirus infections in children. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 183–188, 2010.

RAMIREZ, Ixsy A.; CAVERLY, Lindsay L.; KALIKIN, Linda M.; *et al.* Differential Responses to Rhinovirus- and Influenza-associated pulmonary exacerbations in patients with Cystic Fibrosis. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 4, p. 554–561, 2014.

RAMSEY, B. W.; GORE, E. J.; SMITH, A. L.; *et al.* The effect of respiratory viral infections on patients with cystic fibrosis. **American Journal of Diseases of Children (1960)**, v. 143, n. 6, p. 662–668, 1989.

RENK, Hanna; REGAMEY, Nicolas; HARTL, Dominik. Influenza A(H1N1)pdm09 and Cystic Fibrosis Lung Disease: A Systematic Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0078583>>. Acesso em: 10 out 2018.

REZAEI, Fariba; LINFIELD, Debra T.; HARFORD, Terri J.; *et al.* Ongoing developments in RSV prophylaxis: a clinician's analysis. **Current Opinion in Virology**, v. 24, p. 70–78, 2017.

SBP- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRA. Diretrizes para o manejo da infecção causada pelo vírus sincicial respiratório (VSR). [S.l.], 2017. Disponível em: http://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/Diretrizes_manejo_infeccao_causada_VSR2017.pdf. Acesso em jan. 2019.

SCHEITHAUER, Simone; HAASE, Gerhard; HÄUSLER, Martin; *et al.* Association between respiratory and herpes viruses on pulmonary exacerbations in cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 9, n. 3, p. 234–236, 2010.

SCHÖGLER, Aline; STOKES, Andrea B.; CASAULTA, Carmen; *et al.* Interferon response of the cystic fibrosis bronchial epithelium to major and minor group rhinovirus infection. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 15, n. 3, p. 332–339, 2016.

SHAH, Amna; CONNELLY, Michael; WHITAKER, Paul; *et al.* Pathogenicity of individual rhinovirus species during exacerbations of cystic fibrosis. **European Respiratory Journal**, v. 45, n. 6, p. 1748–1751, 2015.

SHI, Ting; MCALLISTER, David A.; O'BRIEN, Katherine L.; *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. **Lancet**, v. 390, n. 10098, p. 946–958, 2017.

SHU, Bo; WU, Kai-Hui; EMERY, Shannon; *et al.* Design and performance of the CDC real-time reverse transcriptase PCR swine flu panel for detection of 2009 A (H1N1) pandemic influenza virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2614–2619, 2011.

SHWACHMAN, Harry; KULCZYCKI, Lucas L. Long-term study of one hundred five patients with cystic fibrosis; studies made over a five- to fourteen-year period. **A.M.A. Journal of Diseases of Children**, v. 96, n. 1, p. 6–15, 1958.

SMITH, Jason G.; WIETHOFF, Christopher M.; STEWART, Phoebe L.; *et al.* Adenovirus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 343, p. 195–224, 2010.

SMYTH, A. R.; SMYTH, R. L.; TONG, C. Y.; *et al.* Effect of respiratory virus infections including rhinovirus on clinical status in cystic fibrosis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 73, n. 2, p. 117–120, 1995.

SOMAYAJI, Ranjani; GOSS, Christopher H.; KHAN, Umer; *et al.* Cystic fibrosis pulmonary exacerbations attributable to respiratory syncytial virus and Influenza: a population-based study. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 12, p. 1760–1767, 2017.

SOSNAY, Patrick R.; FARRELL, Philip. Challenges in cystic fibrosis newborn screening and recommendations for primary care physicians. **Pediatrics**, v. 136, n. 6, p. 1181–1184, 2015.

STELZER-BRAID, S.; JOHAL, H.; SKILBECK, K.; *et al.* Detection of viral and bacterial respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. **Journal of Virological Methods**, v. 186, n. 1–2, p. 109–112, 2012.

STELZER-BRAID, Sacha; LIU, Nancy; DOUMIT, Michael; *et al.* Association of rhinovirus with exacerbations in young children affected by cystic fibrosis: Preliminary data. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 8, p. 1494–1497, 2017.

SUTANTO, Erika N.; KICIC, Anthony; FOO, Clara J.; *et al.* Innate Inflammatory Responses of Pediatric Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 44, n. 6, p. 761–767, 2011.

THOMAZELLI, Luciano M; VIEIRA, Sandra; LEAL, Andrea L.; *et al.* Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n.5, p. 422-428, 2007.

TROMBETTA, Hygor; FAGGION Heloisa Z; LEOTTE, Jaqueline; *et al.* Human coronavirus and severe acute respiratory infection in Southern Brazil, **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 3, p. 113–118, 2016.

UYEKI, Timothy M. Influenza diagnosis and treatment in children: a review of studies on clinically useful tests and antiviral treatment for influenza, **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 22, n. 2, p. 164–177, 2003.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; JONG, J. C.; GROEN, J; *et al.* A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease, **Nature Medicine**, v. 7, n. 6, p. 719–724, 2001.

VIVIANI, Laura; ASSAEL, Baroukh M.; KEREM, Eitan. Impact of the A (H1N1) pandemic influenza (season 2009–2010) on patients with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 10, n. 5, p. 370–376, 2011.

WANG, Elaine E.L.; PROBER, Charles G.; MANSON, Barbara; *et al.* Association of Respiratory Viral Infections with Pulmonary Deterioration in Patients with Cystic Fibrosis. **New England Journal of Medicine**, v. 311, n. 26, p. 1653–1658, 1984.

WAT, Dennis; GELDER, Colin; HIBBITTS, Sam; *et al.* The role of respiratory viruses in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society**, v. 7, n. 4, p. 320–328, 2008.

WILLIAMS, John V.; HARRIS, Paul A.; TOLLEFSON, Sharon J.; *et al.* Human Metapneumovirus and Lower Respiratory Tract Disease in Otherwise Healthy Infants and Children. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 5, p. 443–450, 2004.

WINTERSTEIN, Almut G.; EWORUKE, Efe; XU, Dandan; *et al.* Palivizumab immunoprophylaxis effectiveness in children with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, v. 48, n. 9, p. 874–884, 2013.

ZHENG, Shuo; DE, Bishnu P.; CHOUDHARY, Suresh; *et al.* Impaired innate host defense causes susceptibility to respiratory virus infections in cystic fibrosis. **Immunity**, v. 18, n. 5, p. 619–630, 2003.

APÊNDICE A - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para Crianças de 6 a 12 anos

Pesquisa: Impacto dos Vírus Respiratórios nas exacerbações respiratórias em crianças e adolescentes com Fibrose Cística

Pesquisadores: Viviane Mauro Corrêa Meyer, Fernando do Couto Motta, Patricia Fernandes Barreto Machado Costa

Contato: Dra Viviane e Dr Fernando → Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo LVRS/IOC - tel: 2562-1801 (8-17h); Dra Patricia → Pneumologia/ IFF - tel: 2554-1770 (8-17h). Em caso de urgência, contactar Dra Viviane pelo telefone (21) 99441-6762 (24h).

CEP: O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Fernandes Figueira se encontra a disposição para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam necessárias (e-mail: cepiff@iff.fiocruz.br; Telefones: 2554-1730/fax: 2552-8491).

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO 6-12 ANOS

Olá! Tudo bem?

Você tem Fibrose Cística.

Estamos convidando você e outras crianças e adolescentes do Instituto Fernandes Figueira (IFF) com Fibrose Cística para participar da nossa pesquisa!

Você quer participar?



Seus pais sabem que estamos te convidando e também precisarão concordar para que você possa participar. Não tem problema se você preferir conversar com alguém antes de decidir. E se você tiver dúvidas também pode me perguntar que eu respondo.

É muito ruim ficar doente. Você concorda?



Às vezes as crianças com fibrose cística ficam doentes, com tosse, falta de ar, perda de peso, cansaço, como você deve estar agora. Estamos estudando se alguns “bichinhos” chamados vírus estão presentes nesses quadros de piora.

Se você quiser participar vamos passar um “cotonete” na sua boca e nariz. Isso não dói mas pode dar um pouco de incômodo e vontade de vomitar, que passam rápido.





Faremos também algumas perguntas sobre como você se sente e olharemos algumas informações no seu prontuário. Só os pesquisadores irão saber das suas informações e você terá um número ao invés de seu nome.

~~Maria~~ → 1

~~João~~ → 2

Tudo o que você nos contar será



segredo!

O cotonete vai então para um Laboratório (Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo), onde farão os exames.



Quando tivermos o resultado do exame vamos contar tudo para você e seu responsável. Pode ser que isso ajude no seu tratamento, e no futuro ajude a cuidar de outras crianças! Também vamos contar para vocês no fim da pesquisa o que descobrimos e como ela ajudou a vocês e às outras crianças. Depois, contaremos a outros médicos o que aprendemos.

Eu entendi que o estudo é sobre ver se “bichinhos” chamados vírus estão fazendo crianças como eu que tem fibrose cística ficarem doentes. Eu entendi que para participar vou ter que responder algumas perguntas e vão passar um “cotonete” no meu nariz e garganta.

_____ Nome do Paciente	_____ Assinatura do Paciente	_____ Data
_____ Nome do responsável Legal	_____ Assinatura Responsável Legal	_____ Data
_____ Nome do pesquisador	_____ Assinatura pesquisador	_____ Data

APÊNDICE B -Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para Adolescentes de 13 a 17 anos

Pesquisa: Impacto dos Vírus Respiratórios nas exacerbações respiratórias em crianças e adolescentes com Fibrose Cística

Pesquisadores: Viviane Mauro Corrêa Meyer, Fernando do Couto Motta, Patricia Fernandes Barreto Machado Costa

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO 13-17 ANOS

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada “Impacto dos Vírus Respiratórios nas exacerbações respiratórias em crianças e adolescentes com Fibrose Cística”, que está sendo realizada com pacientes com Fibrose Cística (FC) no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF). Antes de decidir se você quer participar do estudo, pedimos que leia estas orientações.

Este documento é um Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) e dá informações sobre este estudo. Um pesquisador conversará com você sobre estas informações. Há duas vias deste termo e se você desejar participar da pesquisa, as duas vias serão assinadas, uma será entregue a você e uma ficará retida com o pesquisador responsável. Um termo semelhante a este será entregue ao seu responsável legal e o estudo só será realizado se vocês dois autorizarem.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO?

Os pacientes com FC podem apresentar quadros de piora do quadro respiratório chamados de exacerbações, que precisam de tratamento específico. A maioria desses quadros são atribuídos a infecção por bactérias, mas queremos saber se outros microorganismos, os vírus, também causam as exacerbações para que no futuro isso ajude a decidir sobre os exames, tratamentos e medidas preventivas realizados.

COMO SERÁ FEITO O ESTUDO?

Nós iremos fazer algumas perguntas sobre o seu quadro atual e também olharemos seu prontuário para colher informações. Além disso, será colhido um swab (“cotonete”) da sua boca e nariz. Este material será enviado para o Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo do Instituto Oswaldo Cruz (LVRs) onde serão realizados os exames para a pesquisa dos vírus. Assim que pronto você e seus médicos na pneumologia do IFF receberão uma cópia do resultado. O material será guardado no laboratório por até 2 anos mas só poderá ser usado em novos estudos se entrarmos em contato com você e pedirmos uma nova autorização. Se você decidir não participar do estudo você continuará sendo tratado e acompanhado pela equipe de pneumologia do IFF normalmente.

QUAIS SÃO OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO?

Há o risco de você sentir um pouco de desconforto e vontade de vomitar na coleta do swab, apesar dele não doer. Para diminuir este risco a coleta será feita apenas por profissionais treinados. Há também o risco de perda do anonimato das suas informações. Para diminuir este risco apenas pesquisadores que assinarem o termo de sigilo irão ter acesso aos nomes dos pacientes, com senha específica. O principal benefício imediato em participar do estudo é poder identificar se você está ou não com um vírus respiratório. Isto pode ajudar em

decisões do seu tratamento. Além disso você estará ajudando a conhecermos mais sobre o papel dos vírus nas exacerbações respiratórias da FC, que no futuro pode ajudar a tratarmos melhor as crianças.

OS DADOS DO ESTUDO SÃO CONFIDENCIAIS?

Todos os dados clínicos, do prontuário e laboratoriais do estudo são confidenciais. Durante o estudo você será identificado apenas por um número e seu nome não será revelado. Caso os resultados sejam publicados também será mantido o seu anonimato.

QUANTO CUSTARÁ PARA MIM?

O estudo não trará nenhum custo para você. Você também não precisará ir ao IFF além de suas consultas agendadas. Você também não receberá nenhum pagamento para participar.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE NA PESQUISA?

A sua participação é voluntária. Você tem direito de receber o resultado dos exames colhidos e também tem direito a receber os resultados finais da pesquisa, sem o nome dos participantes. Você também pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, e continuará normalmente com seu acompanhamento e tratamento no IFF.

O QUE DEVO FAZER SE TIVER DÚVIDAS OU PROBLEMAS?

Para questões sobre esse estudo ou sobre a sua participação nele, entre em contato com os pesquisadores responsável por esse estudo Dra Viviane Meyer e Dr Fernando Motta no LVRS/IOC - tel: 2562-1801 ou Dra Patricia Barreto no IFF tel: 2554-1770 (ambos de 8-17h) Em caso de urgência, contactar Dra Viviane pelo telefone (21) 99441-6762 (24h). O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Fernandes Figueira, se encontra a disposição para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam necessárias (e-mail: cepiff@iff.fiocruz.br; Telefones: 2554-1730/fax: 2552-8491).

ASSENTIMENTO:

Eu entendi que a pesquisa é sobre avaliar se vírus respiratórios estão presentes nos quadros de exacerbação de FC, e concordo em participar. Eu entendi que irão colher um swab de minha boca e nariz e ver dados do meu prontuário.

_____ Nome do Paciente	_____ Assinatura do Paciente	_____ Data
_____ Nome do Responsável Legal	_____ Assinatura do Responsável legal	_____ Data
_____ Nome do pesquisador responsável	_____ Assinatura pesquisador	_____ Data

APÊNDICE C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisa: Impacto dos Vírus Respiratórios nas exacerbações respiratórias em crianças e adolescentes com Fibrose Cística

Pesquisadores: Viviane Mauro Corrêa Meyer, Fernando do Couto Motta, Patricia Fernandes Barreto Machado Costa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS

Seu filho(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada “Impacto dos Vírus Respiratórios nas exacerbações respiratórias em crianças e adolescentes com Fibrose Cística”, que está sendo realizada com pacientes com exacerbação respiratória de Fibrose Cística (FC) acompanhados no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF). Antes de decidir se você, como responsável legal, deseja que seu filho(a) participe do estudo, solicitamos que leia estas orientações.

Este documento é um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e fornece informações sobre este estudo. Um pesquisador conversará com você sobre estas informações. Sinta-se à vontade para fazer perguntas sobre o estudo a qualquer momento. O termo é apresentado em duas vias. Caso você deseje participar da pesquisa, as duas vias serão assinadas, uma será entregue a você e uma ficará retida com o pesquisador responsável. Caso seu filho (a) seja maior de 6 anos, um termo semelhante a este será entregue a ele(a) (Termo de Assentimento Livre e Esclarecido), e o estudo só será realizado se vocês dois desejarem.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO E PORQUE MEU FILHO ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR?

Os pacientes com FC podem apresentar episódios de piora respiratória (chamados de exacerbações respiratórias) que precisam de tratamento específico. A maioria desses são atribuídos a infecção por bactérias, mas novos estudos tem mostrado uma participação importante de infecções por vírus. As exacerbações respiratórias são causas importantes de internação hospitalar, piora da progressão da doença e até mesmo morte. Seu filho(a) está sendo convidado a participar do estudo pois tem FC e está apresentando uma exacerbação respiratória. Queremos pesquisar a presença de vírus em sua secreção e de outras crianças com este quadro, para avaliar se há participação dos vírus nestas exacerbações, para que no futuro isso ajude a decidir sobre os exames diagnósticos, tratamentos e medidas preventivas.

COMO SERÁ FEITO O ESTUDO?

Se você e seu filho(a) concordarem em participar nós iremos fazer algumas perguntas sobre o quadro atual de piora dele e também consultaremos seu prontuário para colher informações sobre o seu diagnóstico e como está a evolução da FC. Além disso será colhido um swab da boca e nariz para pesquisa de vírus respiratórios. Este material será enviado para o Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo do Instituto Oswaldo Cruz (LVRS) onde serão realizado os exames de imunofluorescência e PCR (pesquisa viral) para diversos vírus respiratórios (influenza A e B, parainfluenza, vírus sincicial respiratório, metapneumovírus humano, coronavírus, rinovírus/enterovírus/coxsackie). Assim que pronto você e seus

médicos na pneumologia do IFF receberão uma cópia do resultado. Caso você seja internado no IFF poderemos repetir a coleta a cada semana e na alta.

As amostras colhidas serão armazenadas no biorrepositório (setor do Laboratório para armazenamento de amostras) do LVRS por até 2 anos. Elas só poderão ser utilizadas em novos estudos se o pesquisador entrar em contato com você e pedir uma nova autorização, com novo termo de consentimento. Se você decidir não participar do estudo você continuará sendo tratado e acompanhado pela equipe de pneumologia do IFF sem nenhum prejuízo.

QUAIS SÃO OS RISCOS E BENEFÍCIOS DO ESTUDO?

Há o risco de desconforto e ânsia de vômito na coleta do swab, apesar do procedimento não ser doloroso. Para diminuir este risco a coleta será feita apenas por profissionais treinados. Há também o risco de perda do sigilo dos dados. Para diminuir este risco apenas pesquisadores que assinarem o termo de sigilo irão ter acesso aos nomes dos pacientes, com senha específica.

O principal benefício imediato em participar do estudo é poder identificar se há ou não identificação de vírus respiratório no seu (sua) filho(a). Isto pode ajudar em decisões de tratamento. Além disso vocês estarão contribuindo para um melhor conhecimento sobre o impacto dos vírus nas exacerbações respiratórias da fibrose cística, que no futuro pode levar a um melhor diagnóstico e tratamento destas.

OS DADOS DO ESTUDO SÃO CONFIDENCIAIS?

Todos os dados clínicos, do prontuário e laboratoriais do estudo são confidenciais. Durante o estudo seu (sua) filho(a) será identificado(a) apenas por um número e seu nome não será revelado. Só terão acesso aos dados nominais os pesquisadores que assinarem o termo de sigilo. Caso os resultados sejam publicados também será mantido o seu anonimato.

QUANTO CUSTARÁ PARA MIM?

O estudo não acarretará em nenhum custo para você. Você também não precisará ir ao IFF em nenhuma ocasião além de suas consultas agendadas. Para se comunicar com os pesquisadores você pode utilizar ligação telefônica a cobrar. Você também não receberá nenhuma remuneração para participar da pesquisa.

QUAIS SÃO OS DIREITOS DO MEU FILHO(A) COMO PARTICIPANTE NA PESQUISA?

A sua participação e de seu(sua) filho(a) neste estudo é voluntária. Vocês tem direito de receber o resultado dos exames colhidos, que serão fornecidos assim que prontos, e também tem direito a receber os resultados finais da pesquisa, sem identificação dos participantes. Vocês também podem desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ao seu acompanhamento e tratamento no IFF. Além disso seu filho(a) tem direito a assistência integral e imediata a qualquer dano que ocorra decorrente da pesquisa.

O QUE DEVO FAZER SE TIVER DÚVIDAS OU PROBLEMAS?

Para questões sobre esse estudo ou sobre a participação de seu/sua filha nele, entre em contato com os pesquisadores responsável por esse estudo Dra Viviane Meyer e Dr Fernando Motta no LVRS/IOC - tel: 2562-1801 ou Dra Patricia Barreto no IFF tel: 2554-1770 (ambos de 8-17h) Em caso de urgência, contactar Dra Viviane pelo telefone (21) 99441-6762 (24h). Para questões sobre os direitos de sua filha e neto(a) participantes da

pesquisa, contate o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEP do IFF no telefone : 2554-1730/fax: 2552-8491 ou email cepiff@iff.fiocruz.br. O CEP é um comitê que analisa e aprova os estudos científicos para garantir que os estudos estejam de acordo com as normas brasileiras de proteção ao sujeito de pesquisa e que os direitos dos participantes estejam sendo respeitados durante e após o estudo.

CONSENTIMENTO:

Se você leu este formulário de consentimento (ou lhe explicaram), todas as suas perguntas foram respondidas e você concorda em participar deste estudo, assine seu nome abaixo e rubrique todas as folhas.

Nome da Paciente: _____

_____ Nome do Responsável Legal	_____ Assinatura do Responsável legal	_____ Data
_____ Nome da Testemunha (se necessário)	_____ Assinatura da Testemunha	_____ Data
_____ Nome do pesquisador responsável	_____ Assinatura pesquisador	_____ Data

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do IFF

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto dos Virus Respiratórios nas Exacerbações Respiratórias em Crianças e Adolescentes com Fibrose Cística.

Pesquisador: PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79277117.0.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.374.629

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional transversal que avaliará a presença de vírus na via aérea através da coleta de swab oral e nasal nas exacerbações respiratórias de pacientes com fibrose cística de 0 a 17 anos acompanhados no IFF

Objetivo da Pesquisa:

Tem como objetivo determinar a proporção de exacerbações respiratórias de pacientes pediátricos com Fibrose Cística associadas a infecção respiratória viral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O principal benefício do estudo é permitir o diagnóstico de infecções virais que podem estar contribuindo para a exacerbação respiratória da FC, podendo em alguns casos auxiliar na decisão de uso e duração de antibioticoterapia. Além disso, o estudo visa contribuir para um melhor conhecimento sobre a etiologia das exacerbações respiratórias que podem no futuro guiar novas terapêuticas e medidas preventivas.

Os riscos do estudo são possível desconforto na coleta do swab combinado, principalmente de orofaringe, que pode causar ansia de vômito. Este risco tentará ser minimizado pela coleta ser realizada apenas por pesquisadores treinados para tal. Além disso, há o risco de perda do sigilo das informações coletadas, o que será controlado pela restrição de acesso ao banco de dados, fornecido somente aos pesquisadores autorizados através de senha e login.

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@if.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 2.374.629

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

pesquisa relevante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de anuência presentes. folha de rosto assinada pelo dep pesquisa presentes. TCLE e TALEs adequados.

Recomendações:

não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_pesquisa.docx	09/11/2017 17:17:04	Ana Maria Aranha Magalhães Costa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_pesquisa.docx	09/11/2017 17:11:26	Ana Maria Aranha Magalhães Costa	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1015719.pdf	24/10/2017 09:15:14		Aceito
Declaração de Pesquisadores	sigilocarimbado.pdf	24/10/2017 09:14:47	PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciataniaFC.pdf	23/10/2017 15:34:55	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencialiviaFC.pdf	23/10/2017 15:33:28	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE6A12FINAL.docx	23/10/2017 09:40:32	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE13A17FINAL.docx	23/10/2017 09:40:13	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@ff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 2.374.629

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	23/10/2017 09:39:56	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	19/10/2017 12:10:52	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciafernando.pdf	17/10/2017 21:37:44	PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA	Aceito
Outros	anuenciapatricia.pdf	17/10/2017 21:35:57	PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	FICHADECOLETADEDADOSFINAL.docx	17/10/2017 21:33:34	PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetovirusfcFINAL.docx	17/10/2017 21:33:14	PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 09 de Novembro de 2017

Assinado por:
Ana Maria Aranha Magalhães Costa
(Coordenador)

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

ANEXO B- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do IOC



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto dos Vírus Respiratórios nas Exacerbações Respiratórias em Crianças e Adolescentes com Fibrose Cística.

Pesquisador: PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79277117.0.3001.5248

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-RJ

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.450.906

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional transversal que avaliará a presença de vírus na via aérea através da coleta de swab oral e nasal nas exacerbações respiratórias de pacientes com fibrose cística de 0 a 17 anos acompanhados no IFF.

Projeto aprovado no CEP Fiocruz IFF sob número 2.374.629, datado de 09 de novembro de 2017.

Objetivo da Pesquisa:

Tem como objetivo determinar a proporção de exacerbações respiratórias de pacientes pediátricos com Fibrose Cística associadas a infecção respiratória viral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos do estudo são possível desconforto na coleta do swab combinado, principalmente de orofaringe, que pode causar ânsia de vômito. Este risco tentará ser minimizado pela coleta ser realizada apenas por pesquisadores treinados para tal. Além disso, há o risco de perda do sigilo das informações coletadas, o que será controlado pela restrição de acesso ao banco de dados, fornecido somente aos pesquisadores autorizados através de senha e login.

O principal benefício do estudo é permitir o diagnóstico de infecções virais que podem estar contribuindo para a exacerbação respiratória da FC, podendo em alguns casos auxiliar na decisão

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 2.450.908

de uso e duração de antibioticoterapia. Além disso, o estudo visa contribuir para um melhor conhecimento sobre a etiologia das exacerbações respiratórias que podem no futuro guiar novas terapêuticas e medidas preventivas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos e devidamente fundamentado, e não necessita de submissão à CONEP antes de ser iniciado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto final;

Carta de anuência;

TALE_6_12;

TALE_13_17;

Ficha de coleta de dados;

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 234ª Reunião Ordinária, realizada em 12.12.2017, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TALE6A12FINAL.docx	23/10/2017 09:40:32	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 2.450.908

Ausência	TALE6A12FINAL.docx	23/10/2017 09:40:32	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE13A17FINAL.docx	23/10/2017 09:40:13	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	23/10/2017 09:39:56	Viviane Mauro Corrêa Meyer	Aceito
Outros	anuenciapatricia.pdf	17/10/2017 21:35:57	PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	FICHADECOLETADEDEDADOSFINAL.docx	17/10/2017 21:33:34	PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetovirusfcFINAL.docx	17/10/2017 21:33:14	PATRICIA FERNANDES BARRETO MACHADO COSTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

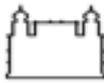
Não

RIO DE JANEIRO, 20 de Dezembro de 2017

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br

ANEXO C- Fichas de Protocolo de RT-PCR



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz / Instituto Oswaldo Cruz
 Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo
 Laboratório de Referência Nacional para Influenza e Doenças Exantemáticas e Regional para Sarampo/OMS



Diferenciação de Influenza A (H1pdm09 x H3) por RT-PCR em tempo real (Protocolo CDC)

Linha de Pesquisa: Vigilância Influenza

No. Protocolo: _____

Data: _____

Responsável técnico: _____

Verificador: _____

	Amostra	Resultado		Amostra	Resultado
1	A1-A3	NTC	17	A7-A9	
2	B1-B3	MOCK	18	B7-B9	
3	C1-C3		19	C7-C9	
4	D1-D3		20	D7-D9	
5	E1-E3		21	E7-E9	
6	F1-F3		22	F7-F9	
7	G1-G3		23	G7-G9	
8	H1-H3		24	H7-H9	
	Amostra	Resultado		Amostra	Resultado
9	A4-A6		25	A10-A12	
10	B4-B6		26	B10-B12	
11	C4-C6		27	C10-C12	
12	D4-D6		28	D10-D12	
13	E4-E6		29	E10-E12	
14	F4-F6		30	F10-F12	
15	G4-G6		31	G10-G12	
16	H4-H6		32	H10-H12	

Kit utilizado:	(x) GoTaq→ RTPCR kit			() SuperScript™ III RTPCR kit			() AgPath-ID™ RTPCR kit		
	Reagentes	1x	6	Lote	1x	0	Lote	1x	0
Água	5,5	33		5,5	0		5	0	
Tampão 2x	12,5	75		12,5	0		12,5	0	
Mix Oligo/Sonda	1,5	9		1,5	0		1,5	0	
Mix enzima	0,5	3		0,5	0		1	0	
Total	20	120		20	0		20	0	
Ciclagem	GoTaq→ RTPCR kit			SuperScript™ III RTPCR kit			AgPath-ID™ RTPCR kit		
RT	1x	45°C	25 min	1x	50°C	30 min	1x	45°C	10 min
Ativação Enzima	1x	95°C	02 min	1x	95°C	02 min	1x	95°C	10 min
Amplificação	45x	95°C	15 seg	45x	95°C	15 seg	45x	95°C	15 seg
		55°C	30 seg		55°C	30 seg		55°C	01 min

	Pdm09A	Pdm09H	H3	Aplicar/popa:									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		NTC			0			0				0	20ul. Mix
B		MOCK			0			0				0	Sul. amostras ou
C		0			0			0				0	Sul. de controles
D		0			0			0				0	Controle:
E		0			0			0				0	NTC: negat. do PCR
F		0			0			0				0	Mock: negat. extração
G		0			0			0				0	PTC: Positivo dos alvos
H		0			0			0				0	

Equipamento LR 0242 (ABI 7500) LR 0505 (ABI 7500) LR 0234 (StepOne)

Arquivo: 2018003_PdmH1xH3_11-01-2018

Início: _____ Fim: _____

Observações:



PCR em tempo real para detecção de Influenza (AxB) e RSV (Protocolo CDC)

Linha de Pesquisa: Vigilância Influenza

No. Protocolo: _____

Data: _____

Responsável técnico: _____

Verificador: _____

	Amostra	Resultado		Amostra	Resultado
1	A1-A4	NTC	17	A9-A12	
2	B1-B4	MOCK 1	18	B9-B12	
3	C1-C4		19	C9-C12	
4	D1-D4		20	D9-D12	
5	E1-E4		21	E9-E12	
6	F1-F4		22	F9-F12	
7	G1-G4		23	G9-G12	
8	H1-H4		24	H9-H12	

	Amostra	Resultado
9	A5-A8	
10	B5-B8	
11	C5-C8	
12	D5-D8	PTC
13	E5-E8	
14	F5-F8	
15	G5-G8	
16	H5-H8	

Kit utilizado:	(x) GoTaq→ RTPCR kit			() SuperScript™ III RTPCR kit			() AgPath-ID™ RTPCR kit		
	Reagentes	1x	14	Lote	1x	1	Lote	1x	0
Água	5,5	77		5,5	5,5		5	0	
Tampão 2x	12,5	175		12,5	12,5		12,5	0	
Mix Oligo/Sonda	1,5	21		1,5	1,5		1,5	0	
Mix enzima	0,5	7		0,5	0,5		1	0	
Total	20	280		20	20		20	0	
Ciclagem	GoTaq→ RTPCR kit			SuperScript™ III RTPCR kit			AgPath-ID™ RTPCR kit		
RT	1x	45°C	25 min	1x	50°C	30 min	1x	45°C	10 min
Ativação Enzima	1x	95°C	02 min	1x	95°C	02 min	1x	95°C	10 min
Amplificação	45x	95°C	15 seg.	45x	95°C	15 seg.	45x	95°C	15 seg.
		55°C	30 seg.		55°C	30 seg.		55°C	01 min

	InfA	InfB	RSV	RNP	InfA	InfB	RSV	RNP	InfA	InfB	RSV	RNP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC				0				0			
B	MOCK 1				0				0			
C	0				0				0			
D	0				PTC				0			
E	0				0				0			
F	0				0				0			
G	0				0				0			
H	0				0				0			

Aplicar/pipa:
 20ul. Mix
 5ul. amostras ou
 5ul. de controles

Equipamento LR 0242 (ABI 7500) LR 0505 (ABI 7500) LR 0234 (StepOne)

Arquivo: 2018002 FluAxB RSV 10-01-2018 Início: _____ Fim: _____

Observações:

Concentrações de uso: Primers Influenza e RNP: 40µM/ Sonda: 10µM - RSV Direto: 50µM/ Reverso: 25µM/ Sonda: 5µM

F05

