



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



DIFERENÇAS NA SAZONALIDADE DOS SUBTIPOS A E B DO
VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO EM CRIANÇAS COM INFECÇÃO
RESPIRATÓRIA AGUDA

Maiara Lanna Souza Bacelar Bouzas

Tese de doutorado

Salvador (Bahia), 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Bouzas, Maiara Lanna

Diferenças na sazonalidade dos subtipos A e B do vírus sincicial respiratório em crianças com infecção respiratória aguda. / Maiara Lanna Souza Bacelar Bouzas – Salvador: MLBouzas,2015.

Vii, 58p.:il.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação de Ciências da Saúde - Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

1. Infecção respiratória aguda; 2. Vírus sincicial respiratório; 3. Distribuição sazonal

CDU:



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



DIFERENÇAS NA SAZONALIDADE DOS SUBTIPOS A E B DO
VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO EM CRIANÇAS COM INFECÇÃO
RESPIRATÓRIA AGUDA

Maiara Lanna Souza Bacelar Bouzas

Professora-Orientadora: Cristiana M. Nascimento-Carvalho

Tese apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Eduardo Martins Netto – Doutor, médico epidemiologista e professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde e em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA);
- Regina Terse Trindade Ramos – Doutora, professora adjunta do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA;
- Ricardo Queiroz Gurgel – Doutor, professor adjunto do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Sergipe (UFS);
- Luiz Vicente Ribeiro – Doutor, professor de pediatria e pneumologia pediátrica da Universidade de São Paulo (USP);
- Nanci Ferreira da Silva – Doutora, professora adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. (EBMSP).

Membro Suplente:

- Cristiana Maria Costa Nascimento de Carvalho – Livre-docente professora associada do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia da UFBA.

À minha família pelo amor incondicional e pelas palavras de apoio constantes que não me deixam fraquejar. Ao meu esposo por estar sempre presente com o coração e braços abertos para me acalmar nos momentos de angústia. E ao meu filho, que me impulsiona para os momentos finais desta jornada na certeza de que um dia sentirá muito orgulho desta mãe.

Obrigada meu Deus!

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) - Edital 10/2009 apoio a realização dos exames laboratoriais na Bélgica através do Edital PRONEX 0019/2009 e bolsas de doutorado e de iniciação científica para três alunas da graduação (Eliana Silva, Sylvia Patrícia T. Lido e Karen S. Miranda).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Auxílio com bolsa de iniciação científica PIBIC para o aluno de graduação Ramon S. Amoedo.

AGRADECIMENTOS

Aos alunos do curso de graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e da Universidade Federal da Bahia que contribuíram com o Projeto CHIADO-IVAS, dedicando-se a ajudar e aprender.

Ao colega de doutorado Kiyoshi Ferreira Fukutani, às Profas. Camila Indiani de Oliveira e Aldina Barral, ao Dr. Johan Van Weyenbergh e a equipe do LIP – CPqGM pela parceria e persistência na realização dos exames laboratoriais.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde que passam seus conhecimentos com muito amor ao que fazem.

Aos colegas do programa, especialmente Juliana Rebouças de Oliveira, com quem compartilhei este trabalho.

À Dra. Cristiana M. Nascimento-Carvalho, minha orientadora, pela oportunidade, por todos os ensinamentos e por ter acreditado que eu poderia chegar até aqui.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
I. RESUMO	12
II. OBJETIVOS	14
II.1. GERAL	14
II.2. ESPECÍFICOS	14
III. INTRODUÇÃO.....	15
IV. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
IV.1. INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA.....	16
IV.2. INFECÇÃO RESPIRATÓRIA VIRAL.....	17
IV.2.1. INFECÇÕES DE VIAS AÉREAS SUPERIORES.....	17
IV.2.2. INFECÇÕES DE VIAS AÉREAS INFERIORES.....	18
IV.3. INFECÇÃO POR VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.....	21
IV.3.1. SAZONALIDADE	22
IV.3.2. PROFILAXIA.....	24
V. JUSTIFICATIVA	27
VI. MÉTODOS	28
VI.1. DESENHO DO ESTUDO.....	28
VI.2. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	28
VI.3. DEFINIÇÃO DE DADOS CLÍNICOS.....	29
VI.4. DADOS METEOROLÓGICOS	29
VI.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
VI.6. ASPECTOS ÉTICOS	30
VII. ARTIGO	32
VIII. RESULTADOS	58
IX. DISCUSSÃO	66
X. PERSPECTIVAS DE ESTUDO	71
XI. CONCLUSÕES.....	72
XII. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	73
XIII. SUMMARY	74
XIV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
XV. ANEXOS.....	87

XV.1.	ANEXO 1	88
XV.2.	ANEXO 2	89
XV.3.	ANEXO 3	95
XV.4.	ANEXO 4	97

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

FIGURA

FIGURA 1. Medida de umidade por mês / ano ao longo da distribuição de casos de VSR-A e VSR-B.....62

FIGURA 2. Distribuição sazonal dos fatores meteorológicos e os casos de VSR-A e –B durante o período do estudo.....63

TABELAS

TABELA 1. Distribuição do número de casos de VSR-A ou B por ano durante o período de estudo.....59

TABELA 2. Distribuição dos casos de VSR-A e VSR-B em crianças de 6 a 23 meses com infecção respiratória aguda por mês durante o período de estudo.....61

TABELA 3. Comparação das cargas de VSR em crianças de 6 a 23 meses com infecção respiratória aguda de acordo com as faixas etárias.....65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF	Aspirado nasofaríngeo
FR	Frequência respiratória
hMPV	Metapneumovírus humano
INMET	Instituto do meio ambiente e recursos hídricos
IRA	Infecção respiratória aguda
IVAI	Infecção de vias aéreas inferiores
IVAS	Infecção de vias aéreas superiores
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
SIVEP-GRIPE	Sistema de informação da vigilância sentinela de influenza e outros vírus respiratórios
VSR	Vírus sincicial respiratório
VSR-A	Vírus sincicial respiratório subtipo A
VSR-B	Vírus sincicial respiratório subtipo B

I. RESUMO

TÍTULO: Diferenças na sazonalidade dos subtipos A e B do vírus sincicial respiratório em crianças com infecção respiratória aguda

Os vírus são grandes contribuintes para a morbidade e mortalidade da infecção respiratória aguda (IRA) em todo o mundo e entre eles, o vírus sincicial respiratório (VSR) é um dos agentes etiológicos mais comuns sendo responsáveis por condições clínicas como bronquiolite e pneumonia. **OBJETIVOS:** Descrever a frequência, a sazonalidade e a idade de infecção pelo VSR subtipo A e B (VSR-A e VSR-B) entre crianças com infecção respiratória aguda em uma cidade tropical. **MÉTODOS:** Estudo transversal prospectivo realizado em emergência pediátrica na cidade de Salvador, nordeste do Brasil. Crianças com idade entre 6-23 meses com IRA foram avaliadas entre Setembro/2009 e Outubro/2013. Os critérios de exclusão foram ter sido transferido de outro hospital ou relatar episódio anterior de chiado. Foram coletados dados demográficos e clínicos juntamente com o aspirado nasofaríngeo (ANF) para diagnóstico do VSR-A e VSR-B pelo método do PCR. **RESULTADOS:** Entre as 1.154 crianças avaliadas, 504 (43,7%) relataram episódio anterior de sibilância, 16 (1,4%) não tiveram amostras de ANF coletadas satisfatoriamente, 11 (1,0%) foram transferidos de outro hospital, e os pais ou responsáveis de 63 (5,4%) não consentiram com a participação. Assim, este grupo de estudo foi composto por 560 casos. No total, 139 (24,8%) casos tiveram VSR detectado no ANF. VSR-A foi encontrado em 74 (13,2%), VSR-B em 67 (12,0%) e 2 (0,4%) crianças estavam co-infectadas. VSR-A foi mais frequente de agosto a janeiro, em comparação com o período de fevereiro a julho (18,2% vs. 6,4%, $p < 0,001$). VSR-B foi mais frequentemente encontrado ($p < 0,001$) entre março e junho (36,0%) do que de julho a outubro (1,0%) ou entre novembro e fevereiro (1,6%). VSR-A foi mais comum em crianças acima de 1 ano de idade (17,8%

vs. 1,8%; $p = 0,021$). **CONCLUSÃO:** Um quarto dos pacientes teve VSR detectado. A distribuição dos casos de VSR-A e VSR-B por mês foi notavelmente diferente. VSR-A foi mais frequente em crianças acima de 1 ano de vida. Diretrizes para a imunoprofilaxia contra o VSR devem ser revistas especificamente para a região tropical.

Palavras-chave: imunoprofilaxia, VSR, vírus respiratório, sazonalidade, carga viral.

II. OBJETIVOS

II.1. GERAL

Descrever a frequência de infecção pelo VSR-A e -B entre crianças de 6 a 23 meses com infecção respiratória aguda.

II.2. ESPECÍFICOS

- II.2.1.** Descrever e comparar a sazonalidade do VSR-A e -B;
- II.2.2.** Descrever e comparar a faixa etária de infecção pelo VSR-A e -B;
- II.2.3.** Descrever e comparar a distribuição ao longo dos meses do VSR-A e -B;
- II.2.4.** Descrever e comparar a carga viral nas faixas etárias do VSR-A e -B;
- II.2.5.** Comparar a frequência de casos de infecção por VSR-A e -B com dados meteorológicos (horas de sol, precipitação, temperatura do ar e umidade relativa do ar) durante o período do estudo.

III. INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias agudas (IRA) em crianças com menos de cinco anos de idade são as principais causas de mortalidade infantil no cenário mundial. (Nair et al, 2013) Os vírus são grandes contribuintes para a morbidade e mortalidade da IRA em todo o mundo e entre esses vírus, o vírus sincicial respiratório (VSR) é um dos agentes etiológicos mais comuns de infecções respiratórias responsáveis por síndromes clínicas frequentes, tais como bronquiolite e pneumonia (Durigon et al, 2015; Nascimento-Carvalho et al, 2010)

Estima-se que quase todas as crianças são infectadas por VSR até completar seu segundo ano de vida, sendo a segunda causa mais freqüente de infecções respiratórias, e a principal causa de casos graves de bronquiolite e pneumonia nesta faixa etária. (Borchers et al, 2013)

Altas taxas de mortalidade, entre 3% e 5%, são encontradas em crianças com doença pulmonar crônica, cardiopatias congênitas ou imunodeficiência em países desenvolvidos. Por outro lado, em países em desenvolvimento, as taxas de mortalidade de lactentes e crianças com infecção de vias aéreas inferiores (IVAI) são semelhantes ou superiores as taxas encontradas em crianças com doenças crônicas dos países desenvolvidos. (Stensballe et al, 2003)

A incidência de VSR pode ser altamente variável dentro dos países e entre regiões de um país, dependendo da sazonalidade. (Moore et al, 2014) E sabe-se que temperatura, precipitação e umidade são fatores conhecidos que impactam significativamente na sazonalidade do VSR. (Haynes et al, 2013)

É de grande importância a busca de dados epidemiológicos regionais do VSR, assim como a sua sazonalidade e os fatores associados ao mesmo para que a prevenção desta infecção que tanto impacta na saúde pública seja realizada com eficiência.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1. INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA

O impacto das infecções respiratórias é maior do que a de qualquer outra doença. Em 2010, 1,4 milhões de crianças morreram em decorrência de infecções respiratórias do trato inferior, sobrecarregando o sistema de saúde. (Liu et al, 2012) As infecções respiratórias não são apenas responsáveis pelo aumento da mortalidade, mas também representam 22% da morbidade nos Estados Unidos, 26% de todas as hospitalizações na Bélgica, além de 33,5% e 59% de todas as consultas ambulatoriais na Itália e no Reino Unido respectivamente. (Tregoning & Schwarze, 2010) Na Bahia, o Ministério da Saúde do Brasil registra que as doenças respiratórias são responsáveis por 35,7% de todas as hospitalizações de crianças menores de um ano de idade. (DATASUS, 2011)

As infecções respiratórias ocorrem com maior frequência no início da vida, em comparação à idade adulta, onde a incidência é maior em neonatos (68,6 episódios por 1000 crianças-ano) e crianças entre 0 e 11 meses (51,8 episódios crianças-ano). Entre as crianças de 0 a 59 meses, a incidência é de 10 episódios por 1000 crianças-ano o que significa cerca de 12 milhões de episódios em todo o mundo. (Nair et al, 2013)

Na assistência básica de saúde dos Estados Unidos, o custo médio por IRA tem sido estimado entre \$140 e \$240, dependendo do agente etiológico. Estes custos estimados incluem os custos diretos e indiretos, como, por exemplo, perdas de dia de trabalho dos cuidadores. Os custos da internação são estimados em média de \$5.250 no mesmo país, por conta do vírus sincicial respiratório. O custo anual total das infecções respiratórias nas crianças na Alemanha foi estimado em \$213 milhões. (Tregoning&Schwarze,2010)

IV.2. INFECÇÃO RESPIRATÓRIA VIRAL

Estudos em crianças pré-escolares de países desenvolvidos, e em desenvolvimento, sugerem que a maioria das infecções respiratórias tem etiologia viral representando cerca de 90% de todas as infecções de vias aéreas superiores (IVAS) e as bactérias representam aproximadamente apenas 10%. Apesar da etiologia viral ter maior representatividade nas infecções respiratórias, os antibióticos são frequentemente prescritos para o tratamento de tais doenças, exacerbando o seu uso e o tornando abusivo. (Pavia, 2011)

As IVAS e as IVAI virais estão entre as doenças mais comuns nos seres humanos, mas são as crianças que mais sofrem com estas infecções, geralmente apresentando 5 a 6 episódios por ano. (Chonmaitree et al, 2008) Estas infecções estão frequentemente associadas a morbidade e mortalidade nestes pacientes e, por esta razão, IVAI representa a principal causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo. (Fendrick et al, 2003) Em menores de três meses de idade, IRA é a principal causa de febre; já entre crianças (faixa etária pediátrica) é a principal causa de hospitalização. (Rotzén-Östlund et al, 2014)

IV.2.1. INFECÇÕES DE VIAS AÉREAS SUPERIORES

Em condições clínicas, estudos demonstraram que a inflamação das vias aéreas causada por diferentes vírus é significativamente aumentada em todas as pessoas. (Mallol et al, 2010) Os vírus que estão mais frequentemente associados com IVAS incluem o rinovírus, adenovírus, enterovírus, vírus parainfluenza, vírus influenza, vírus sincicial respiratório e coronavírus. Nos últimos anos, seis novos vírus respiratórios foram relatados incluindo o metapneumovírus humano (hMPV) (Berry et al, 2015)

IVAS em crianças pequenas é muitas vezes acompanhada de febre, podendo levar a hipotatividade ou recusa alimentar. Rinite e faringite são frequentemente

associadas com alterações nas membranas conjuntivais e timpânicas e, em alguns casos, os sinais e sintomas de otite média podem ocorrer. (Tregoning & Schwarze, 2010)

Algumas das crianças com IVAS evoluem com manifestações clínicas de IVAI, incluindo sinais de desconforto respiratório como aleteo nasal e tiragens, cianose ou alterações na ausculta pulmonar como crepitações, roncos ou sibilos. (Esposito et al, 2015)

IV.2.2. INFECÇÕES DE VIAS AÉREAS INFERIORES

IV.2.2.1. BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA

A bronquiolite é uma doença que acomete crianças menores de 2 anos de idade, que é caracterizada por inflamação aguda, edema e necrose de células epiteliais que revestem pequenas vias aéreas, aumento da produção de muco, levando a broncoespasmo, desconforto respiratório, hiperinsuflação pulmonar e hipoxia. (Pavia et al, 2011) Porém esta é uma definição pouco prática e que não contempla aspectos clínicos. Por isso uma diretriz do Reino Unido, define clinicamente a bronquiolite como uma doença viral sazonal caracterizada por febre, obstrução nasal, tosse seca, chiado, crepitações inspiratórias finas e/ou sibilos expiratórios na ausculta pulmonar. (Fernandes et al, 2015)

A bronquiolite é responsável por 120.000 hospitalizações em crianças até 1 ano de idade num ano e cerca de 3% das hospitalizações em crianças até 2 anos em todo o mundo. (Harris et al, 2007) O VSR é o vírus que mais comumente causa bronquiolite, sendo detectado entre 43% e 74% dos casos. No entanto, outros vírus podem causar bronquiolite e apresentam sinais clínicos iguais aos da doença induzida por VSR, incluindo parainfluenza, adenovírus, rinovírus, hMPV, coronavírus, e bocavirus. O potencial de transmissão nosocomial de uma variedade de vírus em crianças hospitalizadas por bronquiolite é muito alto. (Stempel et al, 2009)

As células epiteliais das vias respiratórias representam a primeira linha de defesa contra o VSR, produzindo citocinas e quimiocinas para recrutar uma variedade de células do sistema imune, incluindo as células dendríticas, macrófagos, granulócitos e linfócitos para o lúmen das vias aéreas. Esses componentes do sistema imune estão envolvidos na patogênese de VSR, contribuindo para a inflamação, edema das vias aéreas e outras manifestações da doença. (Leung et al, 2005) Estudos anteriores demonstraram que as células epiteliais das vias respiratórias produzem mediadores inflamatórios variados, incluindo as citocinas/quimiocinas IL-1 α , IL-6, IL-8 e RANTES, em resposta a infecção pelo VSR. A IL-1 α é secretada por macrófagos e neutrófilos ativados, bem como células epiteliais, estimulando a inflamação logo após o início da infecção. IL-6 e quimiocinas RANTES são secretadas por vários tipos de células e IL-8 é secretada por macrófagos e células epiteliais para recrutar neutrófilos que é uma célula predominante nas vias aéreas de crianças infectadas pelo VSR. (Thompson et al, 2015)

IV.2.2.2. PNEUMONIAS VIRAIS

Estudos recentes, que utilizaram métodos moleculares de diagnósticos mais sensíveis, relataram que as infecções virais são a causa mais comum de pneumonia adquirida na comunidade (PAC) em crianças. (García-Garcia et al, 2012) Vários estudos mostraram que vírus foi detectado entre 45% e 77% das crianças e provável infecção bacteriana foi detectada entre 2% e 60%. É importante notar que existe uma frequência de co-infecção viral-bacteriana variando entre 22% e 33%. Co-infecções virais e bacterianas foram encontradas entre 28% e 33% e co-infecções virais-virais em 8% a 14% . Em geral, as infecções virais são mais predominantes entre os lactentes e crianças

com menos de 5 anos de idade, em comparação com crianças mais velhas. (Cevey-Macherel et al, 2009)

IV.3. INFECÇÃO POR VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

O VSR é classificado como um tipo de pneumovírus da família Paramyxoviridae e é um vírus envelopado, com um genoma de RNA único, que codifica 11 proteínas, incluindo duas glicoproteínas de superfície que induzem anticorpos de resposta neutralizante: a proteína F e a proteínas G. A proteína F é conservada, à medida em que a região hipervariável de terminal-C, da proteína G, é sujeita a mutação rápida. Com base nas reações de anticorpos monoclonais, as cepas virais foram separadas em dois tipos principais (VSR-A e VSR-B). (Leung et al, 2005) Vírus dos dois subtipos normalmente produzem epidemias anuais que são caracterizadas pela circulação de várias cepas com diferentes genótipos. (Houspie et al, 2013) É demonstrado que a proteína G é a divergência entre os dois subtipos, pois é um dos alvos de anticorpos neutralizantes e incorpora as mutações devido às pressões imunológicas existentes. (Fodha et al, 2007) É descrito que as cepas dos dois subtipos normalmente circulam juntas, mas geralmente um deles predomina. (Gilca et al, 2006) A predominância do subtipo A tem sido atribuída a alta variabilidade entre as suas cepas. Normalmente, as cepas dominantes mudam anualmente, sugerindo um mecanismo frequente de reinfeção por evasão de imunidade induzida por cepas anteriores. (Gardinassi et al, 2012)

Estudos mostram que o VSR-A está mais associado com a gravidade da doença comparada com o VSR-B, mas o clado e o genótipo talvez sejam um fator mais importante para determinar a gravidade da doença que o subtipo. Estudos *in vitro* sugerem que protótipos do VSR-A e VSR-B se diferem na habilidade de induzir citocinas da cascata de eventos pro-inflamatórios e o VSR-B tem respostas significativamente menores quando comparado ao VSR-A. (Wu et al, 2012)

Estima-se que, nos Estados Unidos, o VSR seja responsável por 200 a 400 mortes por ano em crianças abaixo de cinco anos (Thompson et al, 2003) e entre 66.000 e 199.000 em todo o mundo. (Nair et al, 2010) Durante seu primeiro ano de vida, 68% das crianças vivenciam uma infecção por VSR e no final do segundo ano a maioria delas já foi infectada pelo menos uma vez. (Borchers et al, 2013) Normalmente, em infecções secundárias, a doença é sintomática em crianças pequenas, mas a gravidade diminui constantemente com as exposições subsequentes e poucas chegam a ter bronquiolite ou doença respiratória do trato inferior, febre ou efusão de ouvido médio. (Jansen et al, 2007)

As manifestações clínicas da infecção por VSR podem variar entre quadros leves de IVAS ou otite média aguda, até quadros graves e potencialmente fatais quando há comprometimento do trato respiratório inferior, como bronquiolite. (Esposito et al, 2015)

Foi demonstrado que várias características do hospedeiro e outros fatores do agente como o subtipo viral e os genótipos podem influenciar o curso da infecção nas crianças, mas a real importância de cada um deles ainda não é clara. (Esposito et al, 2015) Baixo peso ao nascer, crianças com imunodeficiência adquirida ou congênita, síndromes genéticas, malformações, doenças pulmonares crônicas, doenças neuromusculares são fatores de risco que favorecem a hospitalização por VSR. (Rietveld et al, 2006)

IV.3.1.SAZONALIDADE

A sazonalidade do VSR varia de acordo com o clima e por isso o pico de infecção pelo vírus varia de uma localização para outra. Nas regiões temperadas, mediterrâneas e desérticas, a infecção pelo VSR está relacionada com o clima frio,

enquanto que em regiões tropicais e subtropicais as precipitações são identificadas como um fator preditor importante. (Pica e Bouvier, 2014)

O período de pico do VSR em regiões de clima temperado do hemisfério norte acontece nos meses de inverno, com exceção de algumas localizações em que anos alternados apresentaram o pico em meses de primavera. A sazonalidade nas regiões tropicais e subtropicais normalmente está associada com a diminuição das temperaturas e o aumento dos períodos de chuva. Algumas localidades de clima tropical chegam a ter dois picos anuais do VSR. (Bloom-Feshbach et al, 2013) Em países equatoriais, infecções por VSR no trato respiratório inferior são detectados durante todo o ano com algum aumento em meses mais secos. Alguns estudos trazem que regiões tropicais ao sul da linha do equador tem a sazonalidade associada com a diminuição das temperaturas e das chuvas. (Loscertales et al, 2002)

Fatores climáticos e geográficos são claramente associados com as epidemias do VSR, mas é incerto se estão relacionados com a propagação do vírus, a fatores comportamentais (como superpopulação em casa ou creche que causa uma grande exposição) ou com mudanças cíclicas na susceptibilidade imunológica da população. (Stensballe et al, 2003)

Existem evidências de que o clima seja um fator importante para o fenômeno da sazonalidade. Algumas hipóteses são diretamente associadas com a temperatura e outras com fatores associados à temperatura, principalmente a umidade. Em nível molecular, sabe-se que a temperatura influencia a fusão do vírus com a membrana celular permitindo a entrada do vírus na célula e a sua replicação. Os vírus não podem se fundir de forma eficiente com a célula e injetar o seu material genético em altas temperaturas. (Sloan et al, 2011)

Outra hipótese é que baixas temperaturas comprometem a funcionalidade do sistema imunológico, reduzindo os movimentos ciliares nos pulmões, que poderiam ajudar na depuração do vírus. (Eccles, 2002)

IV.3.2. PROFILAXIA

Ainda não existe uma vacina específica para o VSR, mas o desenvolvimento desta tem como objetivo prevenir a doença, principalmente na população de alto risco, que são as crianças jovens. Uma vacina eficaz é necessária para diminuir a carga da doença para o sistema de saúde, mas esta ainda não existe por conta dos desafios inerentes ao desenvolvimento de uma vacina. (Kaaijk et al, 2013)

A abordagem profilática atual é realizada através de imunidade passiva com anticorpos. O primeiro produto que surgiu foi a imunoglobulina policlonal enriquecida com anticorpos neutralizantes para VSR que reduziu a IVAI moderada a grave em 72% em crianças de alto risco, porém estava associado a episódios de cianose e óbito em crianças com cardiopatias congênitas (Groothuis et al, 1993) O uso do anticorpo policlonal foi descontinuado em 2003 quando foi aprovado o Palivizumabe onde foi demonstrado que o uso do anticorpo monoclonal poderia ser eficaz. Palivizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado específico para o sítio A da proteína F altamente conservada na superfície do vírus. Tem ação neutralizante e potente inibição da fusão contra os subtipos A e B do VSR. (Wegzyn et al, 2014)

As diretrizes da Academia Americana de Pediatria recomendam a realização do uso profilático de palivizumabe em crianças no primeiro ano de vida (ou até o segundo ano que ainda estiverem em uso de medicações ou suplementação de oxigênio) com doença pulmonar crônica (DPC) da prematuridade, cardiopatias congênitas (com repercussões hemodinâmicas) ou outra doença crônica (doenças neuromusculares, síndromes, alterações anatômicas do trato respiratório ou imunodeficiências) e para

crianças com idade gestacional \leq 28 semanas. (Academia Americana de Pediatria, 2014)

No Brasil, a última nota técnica divulgada pelo Ministério da Saúde, em 2015, a imunoprofilaxia está recomendada para crianças prematuras nascidas com idade gestacional \leq 28 semanas (até 28 semanas e 6 dias) com idade inferior a 1 ano (até 11 meses e 29 dias) e para crianças com idade inferior a 2 anos (até 1 ano, 11 meses e 29 dias) com DPC da prematuridade (displasia broncopulmonar) ou doença cardíaca congênita com repercussão hemodinâmica demonstrada. O diagnóstico de DPC da prematuridade (displasia broncopulmonar) é definido pela dependência de oxigênio em prematuros a partir de 28 dias de vida acompanhada de alterações típicas na radiografia pulmonar ou dependência de oxigênio com 36 semanas de idade gestacional corrigida, em prematuro extremo. As crianças com doença cardíaca congênita com repercussão hemodinâmica incluem aquelas com cardiopatia acianótica em uso de medicamentos para controlar insuficiência cardíaca congestiva e que irão precisar de procedimento cirúrgico, assim como crianças com hipertensão pulmonar moderada a grave. (Nota técnica Conjunta nº05/2015 – Ministério da Saúde)

Para a Sociedade Brasileira de Pediatria, as recomendações para receber as 5 doses de Palivizumabe são: pretermo com IG $<$ 28 semanas e 6 dias, sem DPC, estando com menos de 12 meses de idade no início do período de sazonalidade do VRS; pretermo entre 29 semanas a 31 semanas e 6 dias, sem DPC, estando com menos de 6 meses de idade no início da sazonalidade; crianças $<$ 2 anos com DPC, que necessitam tratamento (oxigênio inalatório, diuréticos, broncodilatador, corticoesteróide inalatório) nos 6 meses anteriores ao início do período de sazonalidade; crianças $<$ 2 anos com cardiopatia crônica que necessite tratamento da insuficiência cardíaca ou tenha hipertensão pulmonar moderada-grave ou com doença cardíaca cianótica. Considerar

fazer no máximo três doses em lactentes nascidos com 32 até 34,6 semanas de idade gestacional, apresentando um ou mais fatores de risco, nascidos três meses antes ou durante o período sazonal de VSR; lactentes com doença neuromuscular ou anomalia congênita de vias aéreas, usar no máximo cinco doses durante o primeiro ano de vida; lactentes gravemente imunodeprimidos fazer uso de cinco doses iniciando no primeiro mês do período sazonal. (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2011)

É recomendado que estas crianças recebam não mais que 5 doses do Palivizumabe, com o início da profilaxia um mês antes do início do pico do VSR. (Academia Americana de Pediatria, 2014)

A infecção pelo VSR tem caráter fundamentalmente sazonal e este depende das características climáticas de cada país ou região. No Brasil, a sazonalidade do VSR tem diferenças acentuadas devido às diferenças geográficas e climáticas do país, por isso a mesma é baseada nos dados do Sistema de Informação da Vigilância Sentinela de Influenza e outros vírus respiratórios – SIVEP-GRIPE. A nota técnica mais recente sobre o uso profilático do Palivizumabe foi baseado nos casos de Síndrome Gripal no período entre 2007 e 2014 (até a semana epidemiológica 27) e relatam que o período de sazonalidade na região nordeste é entre Março e Julho, sendo recomendado o período de aplicação do Palivizumabe entre Fevereiro e Julho. (Nota técnica Conjunta nº05/2015 – Ministério da Saúde)

V. JUSTIFICATIVA

Faz-se necessário a realização de estudos que busquem a epidemiologia, sazonalidade e fatores que estão associados ao VSR, já que o mesmo tem uma carga substancial para a saúde pública. Sabe-se que estes aspectos dependem da localização em que o estudo é realizado, por isso a importância de que este tipo de estudo seja realizado em diferentes regiões do país. A literatura mundial é vasta a respeito deste assunto, porém no Brasil, ainda existe uma lacuna a ser preenchida sobre a epidemiologia do VSR em cada região, já que se trata de um país de dimensões continentais, para se estabelecer protocolos locais de imunoprofilaxia. Isso justifica a relevância de estudos desta natureza.

VI. MÉTODOS

VI.1. DESENHO DO ESTUDO

Este é um estudo transversal prospectivo que avaliou crianças com sintomas de IRA, entre setembro de 2009 e outubro de 2013, em dois serviços de Emergência em Salvador, no Centro pediátrico Professor Hosannah de Oliveira e no 5º Centro de Saúde Professor Clementino Fraga. Crianças com idade entre 6 e 23 meses com febre, espirro, coriza, obstrução nasal ou tosse por até sete dias foram avaliadas. Crianças transferidas de outro hospital ou relatando episódio anterior de sibilância foram excluídas. Os pais ou responsáveis foram convidados a assinar o termo de consentimento antes do recrutamento. (ANEXO 1) Para as crianças elegíveis, um questionário padronizado com dados demográficos, clínicos e exame físico foi preenchido. (ANEXO 2)

VI.2. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Foram coletadas amostras de aspirado nasofaríngeo (ANF) que foram colocadas em tampão de lise Nuclisens (Biomeriux, Boxtel, Holanda) e congeladas a -70°C . A técnica para coleta destas amostras foi padronizada e realizado por pessoal previamente treinado. A criança foi posicionada em decúbito dorsal onde foi introduzido entre 1-2 ml de solução salina a 0,9% em cada narina e introduzida sonda de aspiração número 08 até a medida previamente determinada (da ponta do nariz ao lóbulo da orelha). O material foi aspirado de forma contínua e suave e 01 ml do ANF foi armazenado em frasco coletor contendo 1 ml de tampão de lise. O RNA total (10-50ng) obtido foi extraído utilizando RNeasy (Qiagen's, Hilden, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. Um multiplex de PCR em tempo real (RT-PCR) foi utilizado para identificar cada subgrupo com sondas específicas para VSR-A e VSR-B em que a região do terminal

carboxilo da proteína G foi amplificado através do One-Step RT-PCR (Qiagen, Westburg, Holanda). O primer para VSR-A (G267FW e F164RV) e o primer para VSR-B (BGF e BGR) foram testados separadamente. A quantificação de cada subtipo foi realizada por RT-PCR através da amplificação de uma quantidade conhecida do cDNA do VSR gerando uma curva padrão. (Houspie_2013) Os testes laboratoriais foram realizados em parceria com grupos de pesquisa da Bélgica.

VI.3. DEFINIÇÃO DE DADOS CLÍNICOS

Febre foi definida como temperatura axilar maior do que 37,4°C (El-Radhi_2006) e taquipnéia como frequência respiratória (FR) igual ou superior a 50 incursões / minuto em crianças de 2-11 meses e FR igual ou superior a 40 incursões / minuto em crianças de 12 meses de idade em diante. (WHO_2008)

IVAI foi considerada quando a criança apresentava taquipnéia e / ou qualquer desconforto respiratório, ou crépitos ou sibilos na ausculta pulmonar. (Harris et al, 2011)

VI.4. DADOS METEOROLÓGICOS

Os dados sobre precipitação, umidade relativa do ar, temperatura do ar e horas de sol foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) do Estado da Bahia. A estação meteorológica que forneceu os dados está localizada a cerca de 2 km de distância do Serviço de Emergência onde o estudo foi realizado. A precipitação foi medida como precipitação diária, em milímetros, e foi analisada como a quantidade total do mês. Umidade relativa do ar (%) e temperatura do ar (°C) foram medidas três vezes por dia e foi considerada a média mensal de cada uma delas. Horas de sol foram

medidas como duração diária da luz do sol, em horas, e foi calculado o total de horas mensais de sol.

VI.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi realizada, as variáveis categóricas foram comparadas usando o teste de Qui quadrado ou teste Exato de Fisher. As variáveis contínuas foram avaliadas pelo teste t de Student ou Mann Whitney U, conforme a distribuição das variáveis. Para estas análises foi utilizado o SPSS versão 9.0. A análise de séries temporais foi realizada por meio de regressão linear Prais-Winsten generalizada ($Y(i) = b_0 + b_1 * X(i) + b_2 * \text{sen}[2\pi X(i) / L] + b_3 * \text{cos}[2\pi X(i) / L]$ - em que "Y(i)" é a medida de série tempo para cada momento "i"; X(i) é a numeração sequencial dos momentos de tomada da medida (dia, semana, mês); "b0" é uma constante; "b1" é o indicador de tendência; "b2" e "b3" são indicadores de sazonalidade; e "L" é uma constante relacionada com a unidade de tempo) para a detecção da sazonalidade de VSR-A logarítmica mensal (variável transformada) ou contagem de VSR-B. De acordo com este modelo de regressão, quando o coeficiente de "b2" ou "b3" for estatisticamente diferente de zero, a série temporal demonstra uma variação sazonal. A associação entre a variável logarítmica de VSR-A mensal transformada ou a contagem de VSR-B com valores mensais de fatores meteorológicos foram avaliadas por regressão múltipla por meio de regressão linear generalizada de Prais-Winsten. Os testes estatísticos foram bicaudais, com um nível de significância de 0,05. O software Stata versão 12 (StataCorp, EUA) foi utilizado para esta análise de séries temporais.

VI.6. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Maternidade Clmério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia (parecer nº 067/2009). (ANEXO 3)

VII. ARTIGO

ARTIGO 1

“Respiratory Syncytial Virus A and B Display Markedly Different Temporal Patterns in A Unique Four-year Study among Children with Acute Respiratory Infection in A Tropical City” **Lancet Infectious Disease** [submetido, *vide* Normas de Publicação no ANEXO 4].

Fator de impacto (2014): 7,012.

Elsevier Editorial System(tm) for The Lancet

Infectious Diseases

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Respiratory syncytial virus A and B display markedly different temporal patterns in a unique four-year study among children with acute respiratory infection in a tropical city

Article Type: Articles (Original Research)

Keywords: immunoprophylaxis; RSV; respiratory virus; seasonality; viral load

Corresponding Author: Prof. Cristiana M. Nascimento-Carvalho, M.D., Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Bahia School of Medicine

First Author: Maiara L Bouzas, MSc

Order of Authors: Maiara L Bouzas, MSc; Juliana R Oliveira, MD; Kiyoshi F Fukutani, MSc; Igor C Borges, MD; Aldina Barral, MD; Winke V Gucht, MSc; Elke Wollants, MSc; Marc V Ranst, PhD; Camila I de Oliveira, PhD; Johan V Weyenbergh, PhD; Cristiana M. Nascimento-Carvalho, M.D., Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Background Respiratory syncytial virus (RSV) is one of the most common etiological agents of childhood respiratory infections. We aimed to describe the frequency, seasonality and age of infection by RSV A and B.

Methods This prospective cross-sectional study enrolled children (6-23-months-old) with respiratory infection for ≤ 7 days, from September 2009 to October 2013, in Salvador, Brazil. Upon recruitment, demographic, clinical data and nasopharyngeal aspirates (NPA) were collected. A multiplex quantitative RT-PCR with a subgroup-specific primer and probeset for RSV A and RSV B was used. Seasonal distribution of RSV incidence was evaluated by Prais-Winsten regression.

Findings Of 560 cases, the mean age was 11.4 ± 4.5 months and there were 287 (51.3%) females. Overall, 139 (24.8%) cases had RSV detected in NPA. RSV A was found in 74 (13.2%) and RSV B was found in 67 (12.0%). Two (0.4%) cases had co-infection. RSV A frequency was 9.6%, 18.4%, 21.6% and 3.1% in 2010, 2011, 2012 and 2013, respectively. RSV B frequency was 19.2%, 0.7%, 1.4% and 35.4% in the same years. RSV A was more frequent from-August-to-January compared to February-to-July (18.2% vs. 6.4%, $p < 0.001$). RSV B was more frequently found ($p < 0.001$) between-March-and-June (36.0%) than from-July-to-October (1.0%) or between-November-and-February (1.6%). RSV B infection showed seasonal distribution and positive association with humidity ($p = 0.02$). RSV A was more common among children ≥ 1 -year-old (17.8% vs. 1.8%; $p = 0.02$), but RSV B was not (11.5% vs. 12.2%; $p = 0.8$).

Interpretation One quarter of the patients had RSV. RSV A compromised more frequently children aged ≥ 1 year. Markedly different monthly as well as yearly patterns for RSV A and RSV B reveal independent RSV subgroup epidemics.

Funding FAPESB.

Respiratory syncytial virus A and B display markedly different temporal patterns in a unique four-year study among children with acute respiratory infection in a tropical city

Maiara L Bouzas, MSc,¹ Juliana R Oliveira, MD,¹ Kiyoshi F Fukutani, MSc,¹ Igor C Borges, MD,¹ Aldina Barral, PhD,^{1,2,3} Winke Van der Gucht, MSc,⁴ Elke Wollants, MSc,⁴ Marc Van Ranst, PhD,⁴ Camila I de Oliveira, PhD,^{1,2} Johan Van Weyenbergh, PhD,^{4*} Cristiana M Nascimento-Carvalho, MD,^{1,5*} and The Acute Respiratory Infection and Wheeze Study Group Phase I and II†

¹Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Bahia School of Medicine, Salvador, Brazil

²Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Brazil

³Department of Pathology, Federal University of Bahia School of Medicine, Salvador, Brazil

⁴Department of Microbiology and Immunology, Laboratory for Clinical and Epidemiological Virology, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Leuven, Belgium

⁵Department of Pediatrics, Federal University of Bahia School of Medicine, Salvador, Brazil

*JVW and CMNC contributed equally to this manuscript.

†Members listed at end of paper.

Corresponding author: Prof. Cristiana M. Nascimento-Carvalho, MD, PhD, Department of Pediatrics, Federal University of Bahia School of Medicine, Rua Prof. Aristides Novis, 105/1201B, Salvador, CEP 40210-630, Bahia, Brazil.

Tel.: +55 71 999848648; fax: +55 71 33320725.

E-mail: nascimentocarvalho@hotmail.com

Abstract

Background Respiratory syncytial virus (RSV) is one of the most common etiological agents of childhood respiratory infections. We aimed to describe the frequency, seasonality and age of infection by RSVA and B.

Methods This prospective cross-sectional study enrolled children (6-23-months-old) with respiratory infection for ≤ 7 days, from September 2009 to October 2013, in Salvador, Brazil. Upon recruitment, demographic, clinical data and nasopharyngeal aspirates (NPA) were collected. A multiplex quantitative RT-PCR with a subgroup-specific primer and probe set for RSVA and RSVB was used. Seasonal distribution of RSV incidence was evaluated by Prais-Winsten regression.

Findings Of 560 cases, the mean age was 11.4 ± 4.5 months and there were 287 (51.3%) females. Overall, 139 (24.8%) cases had RSV detected in NPA. RSVA was found in 74 (13.2%) and RSVB was found in 67 (12.0%). Two (0.4%) cases had co-infection. RSVA frequency was 9.6%, 18.4%, 21.6% and 3.1% in 2010, 2011, 2012 and 2013, respectively. RSVB frequency was 19.2%, 0.7%, 1.4% and 35.4% in the same years. RSVA was more frequent from August to January compared to February to July (18.2% vs. 6.4%; $p < 0.001$). RSVB was more frequently found ($p < 0.001$) between March and June (36.0%) than from July to October (1.0%) or between November and February (1.6%). RSVB infection showed seasonal distribution and positive association with humidity ($p = 0.02$). RSVA was more common among children ≥ 1 -year-old (17.8% vs. 1.8%; $p = 0.02$), but RSVB was not (11.5% vs. 12.2%; $p = 0.8$).

Interpretation One quarter of the patients had RSV. RSVA compromised more frequently children aged ≥ 1 year. Markedly different monthly as well as yearly patterns for RSVA and RSVB reveal independent RSV subgroup epidemics.

Funding FAPESP.

Keywords immunoprophylaxis; RSV; respiratory virus; seasonality; viral load.

Research in context**Evidence before this study**

The monthly and yearly distribution of infection by Respiratory Syncytial Virus (RSV) has been addressed during fall and winter months. As such, the distribution of the cases infected by RSV is known to occur during the RSV season. Based on this finding, recommendations for immunoprophylaxis have been made.

Added value of this study

The novelty in the results includes the markedly different patterns for RSVA and RSVB, either monthly or yearly, which reveals independent RSV subgroup epidemics in a tropical city. RSVA predominated in 2011 and 2012. RSVB predominated in 2010 and 2013. In regard to months, RSVA was more frequent from-August-to-January and RSVB was more often detected between-March-and-June. As a matter of fact, we demonstrated that RSV infection occurs not only during the expected RSV season. Indeed, RSVB infection occurs during the RSV season but this is not the case for RSVA.

Implications of all the available evidence

Guidelines for specific immunoprophylaxis against RSV should be reviewed in the tropical region. In the current form, prophylaxis is appropriate for infection by RSVB but not for infection by RSVA.

Introduction

Acute respiratory infections (ARI) are the leading cause of mortality in children less than five years-old worldwide.¹ Viruses are major contributors to the morbidity and mortality of ARI and the respiratory syncytial virus (RSV) is one of the most common etiological agents of respiratory infections such as bronchiolitis and pneumonia.^{2,3} It is estimated that nearly all children have been infected by RSV up to their second birthday.⁴ RSV incidence can be highly variable within countries and between regions within a country depending on the level of seasonal constraining.⁵ Temperature, rainfall, and humidity have been postulated to significantly impact RSV seasonality.⁶

In this study, we aimed to describe the frequency, seasonality and age of infection by RSV A and B among children with ARI in a four-year period.

Methods

Study design

This prospective cross-sectional study evaluated children with ARI seen at the Pediatric Emergency Department of the Federal University of Bahia Hospital, in Salvador, Northeastern Brazil, between September 2009 and October 2013. This city is located in a tropical region. Inclusion criteria comprised children aged from 6 to 23 months with fever, sneeze, running nose, nasal blockage, or cough for up to seven days. Children transferred from other hospitals or reporting a previous episode of wheeze were excluded. Clinical and demographic data, as well as findings on physical examination, were collected using a standardized questionnaire.

Clinical definitions

Fever was defined as axillary temperature higher than 37.4°C,⁷ and tachypnea as respiratory rate (RR) equal or higher than 50 breaths/minute in children aged 2-11 months and RR equal or higher than 40 breaths/minute in children from 12 months of age onwards.⁸ Lower

Respiratory Tract Infection (LRTI) was considered when the child had tachypnea and/or any respiratory distress or crackles or wheezing.⁹

Laboratory procedures

Nasopharyngeal aspirate (NPA) samples were collected at study enrollment, placed in Nuclisens Lysis Buffer (Biomerieux, Boxtel, The Netherlands) and frozen at -70°C. Total RNA was extracted using RNEasy (Qiagen's, Hilden, Germany) following manufacturer's instructions. A multiplex quantitative RT-PCR with a subgroup-specific primer and probeset for RSVA and RSVB was used to identify and quantify the subgroup of the virus strain.¹⁰ The carboxyterminal region of the G protein was amplified using the One-Step RT-PCR (Qiagen, Westburg, The Netherlands). The RSVA forward and reverse primers, G267FW and F164RV, respectively, and the RSVB forward and reverse primers, BGF and BGR, respectively were employed.¹⁰

Meteorological data

Data about rainfall, relative humidity, air temperature, and hours of sunshine were provided by the Institute of Environment and Water Resources (INMET) in the State of Bahia. The meteorological station that provided the data is located approximately 2 Km away from the Emergency Department where the study was carried out. Rainfall was measured as daily precipitation, in millimeters, and was analyzed as the total quantity of the month. Relative humidity (%) and air temperature (°C) were measured three times daily and were monthly averaged. Hours of sunshine were measured as daily duration of sunshine, in hours, and were calculated as total monthly hours of sunshine.

Statistical analyses

Categorical variables were presented as absolute number (percentage) and continuous variables as median (interquartile range [IQR]). Categorical variables were compared using the corrected chi square or Fisher exact test and the continuous variables were assessed by

Mann Whitney U test, as appropriate. Time series analysis using Prais-Winsten generalized linear regression ($Y(i) = b_0 + b_1 * X(i) + b_2 * \sin[2\pi X(i)/12] + b_3 * \cos[2\pi X(i)/12]$ – in which “Y(i)” is the time series measure for each moment “i”; “b0” is a constant; “b1” is the trend indicator; “b2” and “b3” are seasonality indicators) was used for seasonality detection of logarithmic transformed monthly RSVA or RSVB number of cases. This regression model detects monthly number of cases fluctuations that are consistent between years when the coefficient “b2” or “b3” is statistically different from zero. The association between logarithmic transformed monthly RSVA or RSVB number of cases with monthly values of meteorological factors was evaluated by multiple regression using Prais-Winsten generalized linear regression. Statistical tests were two-tailed, with a significance level of 0.05. A further analysis was performed considering the period of 7 days (one week) as the time unit. In such case, the level of significance was 0.0125 (Bonferroni correction for multiple comparisons). The software Stata version 12 (StataCorp, USA) was used for these analyses.

Ethical approval

The study was approved by the Ethics Committee from the Federal University of Bahia. Parents or legal guardians signed written informed consent before enrollment of each study participant.

Role of the funding source

The sponsor of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. CMN-C had full access to all the data in the study and JWV and CMN-C had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

Among 1,154 evaluated children, 504 (43.7%) reported at least one previous episode of wheezing, 16 (1.4%) did not have NPA collected successfully, 11 (1.0%) came from other hospitals and 63 (5.4%) did not consent. Thus, the study group comprised 560 cases. The

mean age was 11.4±4.5 months and there were 287 (51.3%) females. The most frequent complaints were cough (86.8%), running nose (83.9%), fever (82.5%), and sneeze (76.4%). On physical examination, the most frequent findings were fever (40.3%), ronchi (37.0%) and tachypnea (23.6%). Overall, 230 (41.1%) patients had lower respiratory tract involvement, out of which 130 (57%) had tachypnea, 92 (40%) presented wheezing, 51 (22.2%) presented crackles, and 32 (13.9%) presented thoracic recession. Forty-four (7.9%) children attended day care centers.

Overall, RSV was detected in 139 (24.8%) cases, RSVA in 74 (13.2%) cases, and RSVB in 67 (12.0%) cases. Two (0.4%) were co-infected. Table 1 shows the distribution of RSVA or B cases per year of study. RSVA occurred more frequently in 2011 and 2012 whereas RSVB occurred more often in 2010 and 2013. RSVB incidence demonstrated seasonal distribution ($b_2 = -0.44$ and $b_3 = -0.24$; $p = 0.01$) and was more frequent ($p < 0.001$) in March-June (36.0%) compared to July-October (1.0%) or November-February (1.6%). Conversely, RSVA was more frequent from-August-to-January compared to February-to-July (18.2% vs. 6.4%, $p < 0.001$). RSVA was mostly detected in distinct months in different years and the seasonal pattern was not statistically significant in a monthly scale. Table 2 shows the monthly distribution of RSVA and RSVB during the study period. It is possible to verify that there was an alternating pattern between RSVA and RSVB cases. When the temporal analysis was repeated considering one week as the unit of time, RSVA ($b_2 = 0.2$; $p = 0.007$) and RSVB ($b_2 = -0.2$; $p = 0.003$) showed seasonal distribution.

There was a positive association between monthly RSVB number of cases and humidity (multiple regression coefficient for humidity = 0.10; $p = 0.02$). There was no association between RSVA incidence and meteorological factors. Figure 1 shows the monthly distribution of mean relative humidity and of RSVA and RSVB cases during the study period. All meteorological factors showed seasonal distribution (Figure 2).

Table 3 shows that RSVA was more frequent among children aged one year and above compared to younger children (17.8% vs. 10.8%; $p=0.02$). No difference was found in the distribution of RSVB in regard to age strata (11.5% vs. 12.2%; $p=0.8$). RSVA was similarly found among patients with or without lower respiratory tract compromising (12.6% vs. 13.6%; $p=0.7$). Likewise, RSVB was similarly distributed among these subgroups (12.2% vs. 11.8%; $p=0.9$).

The median viral load of RSVA was 1.3×10^3 copies/mL (IQR: 1.3×10^2 - 8.2×10^4 ; min: 1.56; max: 9.2×10^6) and of RSVB was 1.6×10^4 copies/mL (IQR: 2.6×10^2 - 6.7×10^5 ; min: 1.82; max: 4.0×10^6). Median RSVB load was significantly higher than RSVA load ($p=0.03$). Median RSVB load was higher among children under-1-year-old compared to older children (Table 3). On the contrary, median RSVA load was similar between these age strata (Table 3).

Discussion

RSV infection was documented in one quarter of children aged 6-23 months with ARI, of which RSVA compromised more frequently children aged 1 year and above. Our study is the first to demonstrate that infection by RSVA or RSVB occurs in different months during the year. RSVB infection showed seasonal distribution with higher incidence in late summer and fall. In contrast, RSVA infection did not show a consistent seasonal pattern throughout the 4 studied years. The predominance of RSV groups that occurred in different months and the correlation of RSVB with humidity was demonstrated.

It has been shown that the activity of RSVA and B usually occurs in association with the rainy season and there is evidence that temperature and associated factors, primarily humidity, are important factors in the seasonality.⁶ These factors can influence the fusion of viruses with the cellular membranes allowing for cell entry and replication. Humidity strongly influences virus stability and transmissibility.¹¹ Herein, RSVB infection was

positively associated with humidity. Different studies conducted in Belgium, Finland, Pakistan, the UK, and Uruguay have presented the co-circulation of RSVA and B in the same period along the year.^{10,12-14} However, in our study, which lasted 4 years and was conducted in the tropical city of Salvador, Brazil, the circulation of RSVA and B was markedly different. There were different periods of high humidity during the 4 studied years (Figure 1). Herein, RSVA and B circulated in different years with alternating pattern (Table 1). The pattern of 2 to 4 consecutive years of subgroup A predominance followed by a single intervening year in which subgroup B is dominant was reported in countries like Uruguay and Finland.^{10,12} There are competitive relationship and cross-immunity between subgroups in the population. Following infection, individuals gain transient immunity which average duration is 2 years.¹³

Among our cases, RSV was found in 24.8%. A study conducted in Southeastern Brazil reported that 27.4% of children aged less than 2 years had RSV.² Other studies conducted in the Northern and Southeastern Brazil presented similar frequencies in children aged less than 2-3 years with ARI.^{15,16} One study carried out in another city in Northeastern Brazil showed that 48% of the children had RSV. This finding may be attributed to the study period as the study was carried out only in the rainy season.¹⁷ It has been shown that RSV frequencies depend on the local climate and can vary between 27.8% and 37.9% in temperate, subtropical and tropical countries, in the same age population.^{5,18-21} We showed that there was no difference between the overall RSV subgroups frequency (13.2% vs.12.0%). However, RSVA is usually predominant in the majority of the studies involving children with ARI.^{12,18,22} RSVA predominance has been attributed to the higher variability among these subgroup strains and normally the dominant strain has a mechanism for frequent re-infections by evasion of immunity induced by previous strains.²³ This absence of RSVA predominance

in our study may be explained by the unique total length of the study (4 years), of which two years were dominated by RSVA and two years were dominated by RSVB.

We found that RSVA was more common among children aged 1 year and above. A study conducted in 7 different countries presented that, across all countries, RSVA was more frequent in children aged 36-59 months whereas the lowest frequency was detected in the 6-11-months-old group. In that study, children between 6 months and 10 years of age were included.²⁴ In general, it has been described that RSV is frequent in children under 1 year of age. However, the distribution of different antigenic groups (A and B) is not commonly reported.

Almost half of the children presented lower respiratory tract involvement (41.1%) and the frequency of RSVA and B was not different among children with or without lower respiratory tract involvement. It has been reported that children with RSV infection present frequent involvement of the lower respiratory tract.^{25,26} Our samples were collected from children in the emergency department, without exclusion of cases with more severe disease. Moreover, the etiological diagnoses were performed with very sensitive methods. Our study showed that RSVB load was higher than RSVA and RSVB load was higher among children under 1 year of age. The higher viral load among children under 1 year is expected in primary infection.⁴

The RSV distribution along the year impacts on the immunoprophylaxis calendar with monoclonal antibody. In Brazil, palivizumab applications are recommended between February and July in the Northeastern region.²⁷ This practice is based on the assumption that RSV circulates between March and July in these regions. This routine is influenced by guidelines developed and implemented in countries in temperate regions.²⁸ Nonetheless, taking into account our results provided in a 4-year period of data collection, the guidelines for a tropical region need to be reviewed. Further studies conducted in tropical regions with

data collection during the whole year calendar for at least 4 years are highly appreciated. The duration of our study was fundamental in order to find our results.

We conclude that one quarter of the patients had RSV detected, similar to other studies in the same region. Strikingly, seasonality was markedly different between subtypes, while a positive association with humidity was found. RSVA compromised more frequently children aged 1 year and above and RSVB load was higher in children under 1 year. Guidelines for specific immunoprophylaxis against RSV should be reviewed in the tropical region.

Contributors

MLB and JRO collected and entered the data, took part in the analyses. MLB drafted the first version of the manuscript. KFF, AB, CIO extracted total RNA. ICB collected and analyzed the meteorological data. WVG, EW, MVR and JWV performed the PCR tests. CMNC conceived the research question, designed the study, supervised the data collection, analyses and proofread the manuscript. All authors contributed to the writing of the manuscript and have seen and approved the final draft of the manuscript.

The Acute Respiratory Infection and Wheeze Study Group Phase I and II

Elaine N Pacheco,¹ Eliana Silva,² Eveline Xavier,¹ Karen S Miranda,² Laise R Neri,² Patricia F Silva,² Ramon S Amoedo,¹ Rômulo B Menezes,² Sylvia Patricia T Lido² and Thamirys Marinho.¹

¹Federal University of Bahia School of Medicine, Salvador, Brazil

²Bahiana School of Medicine, Bahiana Foundation for Science Development, Salvador, Bahia, Brazil.

Declaration of interests

All authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Bahia State Agency for Research Funding (FAPESB) [grant numbers APP0045/2009 and PNX0019/2009]. AB, CIO, and CMNC are senior investigators at Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil.

References

1. Nair H, Simões EAF, Rudan I, et al. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2013; **381**: 1380-90.
2. Durigon GS, Oliveira DBL, Felício MCC, et al. Poor outcome of acute respiratory infection in young children with underlying health condition in Brazil. *Int J Infect Dis* 2015; **34**: e3-e7.
3. Nascimento-Carvalho CM, Cardoso MRA, Barral A, et al. Seasonal patterns of viral and bacterial infections among children hospitalized with community-acquired pneumonia in a tropical region. *Scand J Infect Dis* 2010; **42**: 839-44.
4. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus - a comprehensive review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2013; **45**: 331-79.
5. Moore HC, Jacoby P, Hogan AB, Blyth CC, Mercer GN. Modelling the seasonal epidemics of respiratory syncytial virus in young children. *PLoS One* 2014; **9**: e100422.
6. Haynes AK, Manangan AP, Iwane MK, et al. Respiratory syncytial virus circulation in seven countries with global disease detection regional centers. *J Infect Dis* 2013; **208**: 246-54.
7. El-Radhi AS, Barry W. Thermometry in paediatric practice. *Arch Dis Child* 2006; **91**: 351-56.
8. World Health Organization. Integrated Management of Childhood Illness chart booklet. (WC 503.2). Geneva: WHO, 2008. [WHO website]. Available at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241597289_eng.pdf. Accessed 15 January 2009.

9. Harris M, Clark J, Coote N, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax* 2011; **66**: ii1-23.
10. Houspie L, Lemey P, Keyaerts E, et al. Circulation of HRSV in Belgium: from multiple genotype circulation to prolonged circulation of predominant genotypes. *PLoS One* 2013; **8**: e60416.
11. Sloan C, Moore ML, Hartert T. Impact of pollution, climate, and socio-demographic factors on spatiotemporal dynamics of seasonal respiratory viruses. *Clin Transl Sci* 2011; **4**: 48-54.
12. Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001 – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; **100**: 221-30.
13. White LJ, Waris M, Cane PA, Nokes DJ, Medley GF. The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England & Wales and Finland: seasonality and cross-protection. *Epidemiol Infect* 2005; **133**: 279-89.
14. Aamir UB, Alam MM, Sadia H, Zaidi SSZ, Kazi BM. Molecular characterization of circulating respiratory syncytial virus (RSV) genotypes in Gilgit Baltistan Province of Pakistan during 2011-2012 winter season. *PLoS One* 2013; **8**: e74018.
15. Lamarão LM, Ramos FL, Mello WA, et al. Prevalence and clinical features of respiratory syncytial virus in children hospitalized for community-acquired pneumonia in northern Brazil. *BMC Infect Dis* 2012; **12**: 119.
16. Ferone EA, Berezin EN, Durigon GS, et al. Clinical and epidemiological aspects related to the detection of adenovirus or respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory tract infection. *J Pediatr (Rio J)* 2014; **90**: 42-9.

17. Cuevas LE, Nasser AMB, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**: 1626-28.
18. Zhang Z-Y, Du L-N, Chen X, et al. Genetic variability of respiratory syncytial viruses (RSV) prevalent in southwestern China from 2006 to 2009: emergence of subgroup B and A RSV as dominant strains. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 1201-7.
19. Hara M, Takao S, Shimazu Y, Nishimura T. Three-year study of viral etiology and features of febrile respiratory tract infections in Japanese pediatric outpatients. *Pediatr Infect Dis J* 2014; **33**: 687-92.
20. McCracken JP, Prill MM, Arvelo W, et al. Respiratory syncytial virus infection in Guatemala, 2007-2012. *J Infect Dis* 2013; **208**: S197-206.
21. Hacimustafaoglu M, Celebi S, Bozdemir SE, et al. RSV frequency in children below 2 years hospitalized for lower respiratory tract infections. *Turk J Pediatr* 2013; **55**: 130-9.
22. Oliveira TFM, Freitas GRO, Ribeiro LZG, et al. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2008; **103**: 417-22.
23. Gardinassi LGA, Simas PVM, Gomes DE, et al. Diversity and adaptation of human syncytial virus genotypes circulating in two distinct communities: public hospital and day care center. *Viruses* 2012; **4**: 2432-47.
24. Nolan T, Botja-Tabora C, Lopez P, et al. Prevalence and incidence of respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in children aged 6 months to 10 years with influenza-like illness enrolled in a randomized trial. *Clin Infect Dis* 2015; **60**: e80-9.
25. Calegari T, Queiroz DAO, Yokosawa J, et al. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in Midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2005; **9**: 156-61.

26. Panayiotou C, Richter J, Koliou M, Kalogirou N, Georgiou E, Christodoulou C. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010-2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity. *Epidemiol Infect* 2014; **142**: 2406-11.
27. Brazil. Ministry of Health. Technical note no. 05/2015. To establish the seasonality of respiratory syncytial virus in Brazil and to offer information in regard to the recommended use of palivizumab. [Brasil. Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta nº 05/2015. Estabelecer a sazonalidade do vírus sincicial respiratório no Brasil e oferecer esclarecimentos referentes ao protocolo de uso do Palivizumabe.]
28. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases and Bronchiolitis Guidelines Committee. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics* 2014; **134**: 415-20.

Table 1: Distribution of RSVA and RSVB cases per year of study among children with acute respiratory infection aged 6-23 months in a university hospital in Salvador, Northeast Brazil, between September 2009 and October 2013

	Study Year				
	2009 (n=28)	2010 (n=156)	2011 (n=141)	2012 (n=139)	2013 (n=96)
RSVA	-	15 (9.6%)	26 (18.4%)	30 (21.6%)	3 (3.1%)
RSVB	-	30 (19.2%)	1 (0.7%)	2 (1.4%)	34 (35.4%)

Table 2: Monthly distribution of RSV A and RSV B cases among children with acute respiratory infection aged 6-23 months in a university hospital in Salvador, Northeast Brazil, between September 2009 and October 2013

Months	Year														
	2009			2010			2011			2012			2013		
	RSVA	RSVB	Total	RSVA	RSVB	Total	RSVA	RSVB	Total	RSVA	RSVB	Total	RSVA	RSVB	Total
January	-	-	-	0	0	6	4 (28.6)	0	14	4 (28.6)	1 (7.1)	14	0	0	18
February	-	-	-	0	0	3	1 (7.7)	0	13	0	0	4	0	2 (16.7)	12
March	-	-	-	0	11 (57.9)	19	1 (11.1)	0	9	0	1 (12.5)	8	0	7 (63.6)	11
April	-	-	-	3 (23.1)	9 (69.2)	13	4 (28.6)	0	14	0	0	7	3 (13.6)	16 (72.7)	22
May	-	-	-	0	7 (70.0)	10	2 (11.1)	1 (5.6)	18	0	0	6	0	7 (87.5)	8
June	-	-	-	0	1 (33.3)	3	1 (7.7)	0	13	0	0	8	0	2 (66.7)	3
July	-	-	-	0	0	3	0	0	8	0	0	14	0	0	6
August	-	-	-	0	0	32	0	0	14	8 (53.3)	0	15	0	0	7
September	0	0	8	3 (15.8)	1 (5.3)	19	0	0	12	5 (31.3)	0	16	0	0	8
October	0	0	4	3 (21.4)	1 (7.1)	14	1 (25.0)	0	4	6 (30.0)	0	20	0	0	1
November	0	0	6	4 (17.4)	0	23	7 (100)	0	7	4 (26.7)	0	15	-	-	-
December	0	0	10	2 (18.2)	0	11	5 (33.3)	0	15	3 (25.0)	0	12	-	-	-

Results presented as absolute number (percentage).

Table 3: Comparison RSV viral load among children aged 6-23 months with acute respiratory infection in regard to age strata

RSV load		Age Strata		<i>p</i>
		6-11 months	12-23 months	
RSVA	N	40 (10.8%)	34 (17.8%)	0.02
	Median Load (IQR)	1.1×10^3 (1.5×10^2 - 1.0×10^5)	7.1×10^3 (68.1 - 8.5×10^4)	0.6
RSVB	N	45 (12.2%)	22 (11.5%)	0.8
	Median Load (IQR)	7.4×10^4 (3.0×10^2 - 2.8×10^6)	3.4×10^3 (34.8 - 1.8×10^4)	0.021
Total number of cases		369	191	

* Load is expressed as copies/ml

Figure 1. Monthly distribution of RSVA and RSVB cases among children with acute respiratory infection aged 6-23 months and of mean relative humidity (%) in Salvador, Northeastern Brazil, between September 2009 and October 2013.

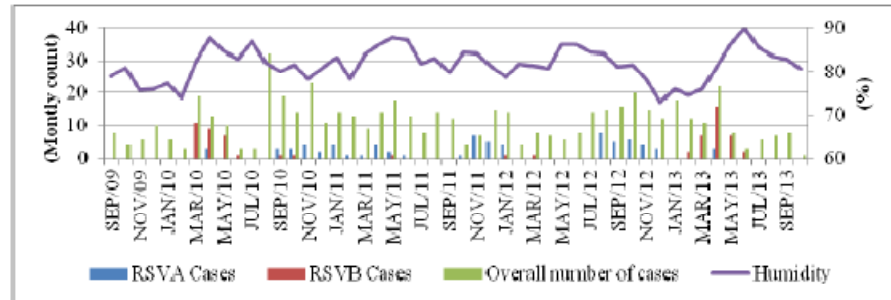
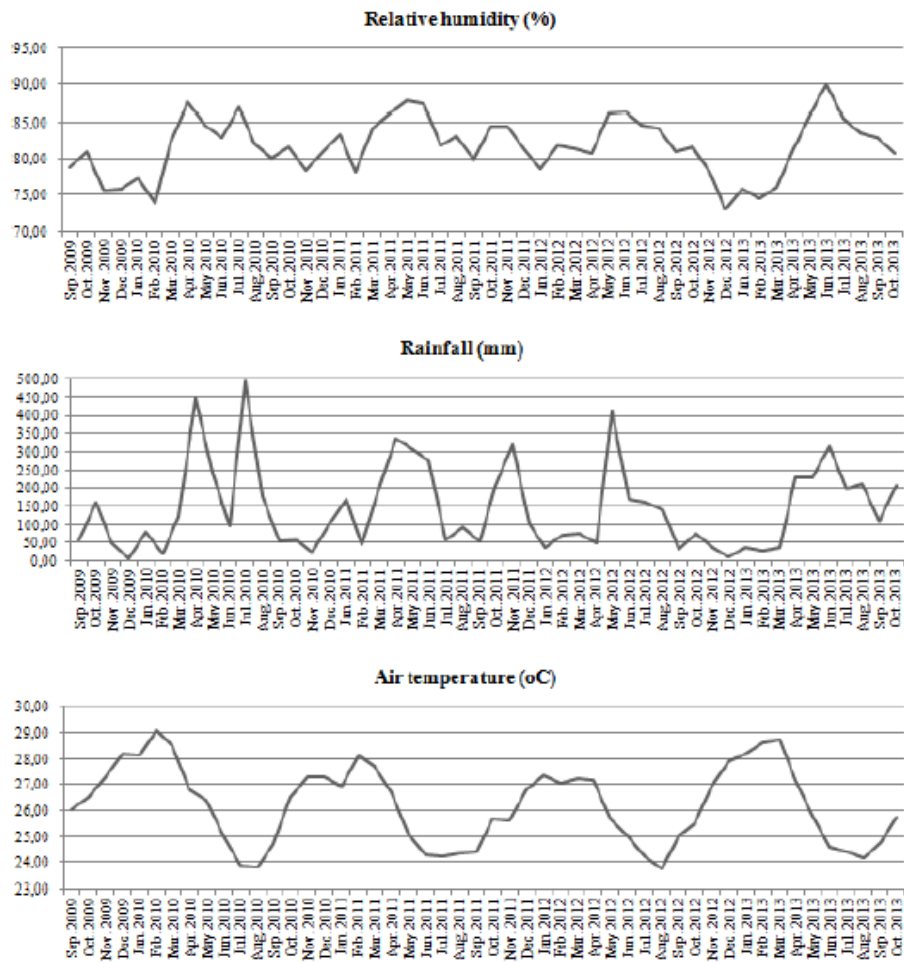
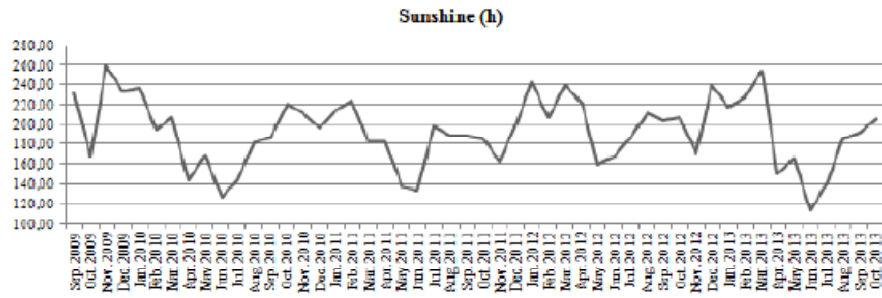


Figure 2: Seasonal distribution of meteorological factors during the study period in Salvador, Northeastern Brazil.





VIII. RESULTADOS

Das 1154 crianças avaliadas, 504 (43,7%) relataram episódio anterior de sibilância, 16 (1,4%) não tinham ANF coletada satisfatoriamente, 11 (1,0%) vieram transferidas de outro hospital, e os pais ou responsáveis de 63 (5,4%) não consentiram participar do estudo. Assim, este grupo de estudo foi composto por 560 casos.

A média de idade foi $11,4 \pm 4,5$ meses e 287 (51,3%) eram do sexo feminino. Tosse (86,8%), coriza (83,9%), febre (82,5%), e espirro (76,4%) foram os sintomas relatados com mais frequência. Ao exame físico, os achados mais frequentes foram febre (40,3%), roncos (37,0%) e taquipneia (23,6%). No total, 230 (41,1%) pacientes tiveram alguma alteração compatível com IVAI, dos quais 130 (57%) apresentavam taquipneia, 92 (40%) apresentavam chiado, 51 (22,2%) apresentavam crépitos e 32 (13,9%) apresentavam tiragem torácica. No momento do recrutamento, 44 (7,9%) crianças frequentavam creche.

No geral, 139 (24,8%) casos tiveram VSR detectado no ANF. VSR-A foi encontrado em 74 (13,2%), VSR-B em 67 (12,0%) e 2 (0,4%) crianças estavam co-infectadas. As amostra de ANF foram coletadas numa média de $3,7 \pm 1,7$ dias de duração de doença e não houve diferença significativa entre os pacientes que tiveram ou não o vírus detectado ($3,5 \pm 1,7$ vs. $3,8 \pm 1,8$; $p=0,3$).

A Tabela 1 mostra a distribuição do número de casos de VSR-A ou B por ano durante o período de estudo. Os casos de VSR-A ocorreram com maior frequência em 2011 e 2012 enquanto que os casos de VSR-B ocorreram mais frequentemente em 2010 e 2013.

Tabela 1. Distribuição do número de casos de VSR-A ou B por ano de estudo em crianças com infecção respiratória aguda com idade entre 6 e 23 meses entre setembro de 2009 e outubro de 2013.

	Período de estudo				
	2009 N=28	2010 N=156	2011 N=141	2012 N=139	2013 N=96
VSR-A	-	15 (9,6%)	26 (18,4%)	30 (21,6%)	3 (3,1%)
VSR-B	-	30 (19,2%)	1 (0,7%)	2 (1,4%)	34 (35,4%)

* $p < 0,001$ para a distribuição de VSR-A ou B por ano de estudo

O VSR-B apresentou uma distribuição sazonal ($b_2: -0,44$; $b_3: -0,24$ / $p = 0,01$) e foi mais frequente ($p < 0,001$) entre março e junho (36,0%) do que de julho a outubro (1,0%) ou entre novembro e fevereiro (1,6%). VSR-A foi mais frequente de agosto a janeiro, em comparação ao período de fevereiro a julho (18,2% vs. 6,4%, $p < 0,001$) e não apresentou um padrão de sazonalidade estatisticamente significativa em escala mensal ($b_2: 0,32$; $b_3: -0,12$ / $p = 0,12$). A Tabela 2 mostra a distribuição dos casos de VSR-A e VSR-B por mês durante o período de estudo. É possível verificar que houve um período do VSR-B alternado por 4 períodos do VSR-A para novamente acontecer um ciclo do VSR-B.

Quando a análise temporal foi repetida considerando uma semana como unidade de tempo, VSR-A ($b_2=0,2$; $p=0,007$) e VSR-B ($b_2=-0,2$; $p=0,003$) apresentaram distribuição sazonal.

Houve associação positiva entre a contagem mensal de VSR-B e umidade (coeficiente: 0.10; $p = 0,02$). Os casos de VSR-B começaram a surgir em março de 2010 quando a umidade relativa do ar sofreu uma variação acima de 11% com relação ao mês anterior, já no outro pico do vírus (março de 2013) a variação da umidade (7,2%) foi

determinante para o aumento significativo dos casos. A incidência de VSR-A não apresentou associação positiva com nenhum dos fatores meteorológicos. A Figura 1 mostra a distribuição mensal da umidade e dos casos de VSR-A e VSR-B durante o período de estudo.

A figura 2 apresenta a distribuição sazonal de todos os fatores meteorológicos. As horas de sol variaram entre 113,30h e 260,0h por mês, as precipitações entre 5,8mm e 492,5mm, a temperatura entre 23,8⁰C e 29,1⁰C e a umidade relativa do ar entre 73,0% e 87,4% durante o período de estudo.

VSR-A foi mais freqüente em crianças acima de 1 ano de idade (17,8% vs. 10,8%; $p = 0,021$). Não foi encontrada diferença na distribuição de VSR-B em relação aos 2 grupos etários (11,5% vs. 12,2%; $p = 0,8$). (Tabela 3)

O VSR foi encontrado de forma similar entre os pacientes com ou sem comprometimento de vias aéreas inferiores (24,6% vs. 25,1%; $p = 0,4$), assim como o VSR-A (12,6% vs. 13,6%; $p = 0,7$) e VSR-B (12,2% vs. 11,8%; $p = 0,9$).

A carga viral média dos pacientes com VSR-A foi 1,3x10³ cópias / ml (IQR: 1,3x10²-8,2x10⁴; mín:1,56; max:9,2x10⁶) e nos pacientes com VSR-B foi 1,6x10⁴ cópias / ml (IQR: 2,6x10²-6,7x10⁵; mínimo: 1,82; máx: 4,0x10⁶). A carga viral de VSR-B foi significativamente mais elevada do que a carga viral de VSR-A ($p = 0,025$). Não houve uma correlação entre a duração de doença em dias com a carga viral do VRS-A ($p=0,6$) e VSR-B ($p=0,1$). A Tabela 3 apresenta a comparação da carga viral por faixa etária por subtipos de VSR. A mediana (IQ) da carga de VSR-B foi maior nas crianças menores de 1 ano.

Tabela 2. Distribuição mensal dos casos de VSR-A e VSR-B em crianças com infecção respiratória aguda de 6 a 23 meses em Salvador, nordeste do Brasil, entre Setembro de 2009 e Outubro de 2013.

Meses	Ano														
	2009			2010			2011			2012			2013		
	VSR-A	VSR-B	Total	VSR-A	VSR-B	Total	VSR-A	VSR-B	Total	VSR-A	VSR-B	Total	VSR-A	VSR-B	Total
Janeiro	-	-	-	0	0	6	4 (28,6)	0	14	4 (28,6)	1 (7,1)	14	0	0	18
Fevereiro	-	-	-	0	0	3	1 (7,7)	0	13	0	0	4	0	2 (16,7)	12
Março	-	-	-	0	11 (57,9)	19	1 (11,1)	0	9	0	1 (12,5)	8	0	7 (63,6)	11
Abril	-	-	-	3 (23,1)	9 (69,2)	13	4 (28,6)	0	14	0	0	7	3 (13,6)	16 (72,7)	22
Mai	-	-	-	0	7 (70,0)	10	2 (11,1)	1 (5,6)	18	0	0	6	0	7 (87,5)	8
Junho	-	-	-	0	1 (33,3)	3	1 (7,7)	0	13	0	0	8	0	2 (66,7)	3
Julho	-	-	-	0	0	3	0	0	8	0	0	14	0	0	6
Agosto	-	-	-	0	0	32	0	0	14	8 (53,3)	0	15	0	0	7
Setembro	0	0	8	3 (1,8)	1 (5,3)	19	0	0	12	5 (31,3)	0	16	0	0	8
Outubro	0	0	4	3 (21,4)	1 (7,1)	14	1 (25,0)	0	4	6 (30,0)	0	20	0	0	1
Novembro	0	0	6	4 (17,4)	0	23	7 (100)	0	7	4 (26,7)	0	15	-	-	-
Dezembro	0	0	10	2 (18,2)	0	11	5 (33,3)	0	15	3 (25,0)	0	12	-	-	-

* Resultados em n (%)

Figura 1. Distribuição mensal dos casos de VSR-A e VSR-B entre crianças com infecção respiratória aguda de 6 a 23 meses e umidade relativa (%) em Salvador, nordeste do Brasil, entre Setembro de 2009 e Outubro de 2013.

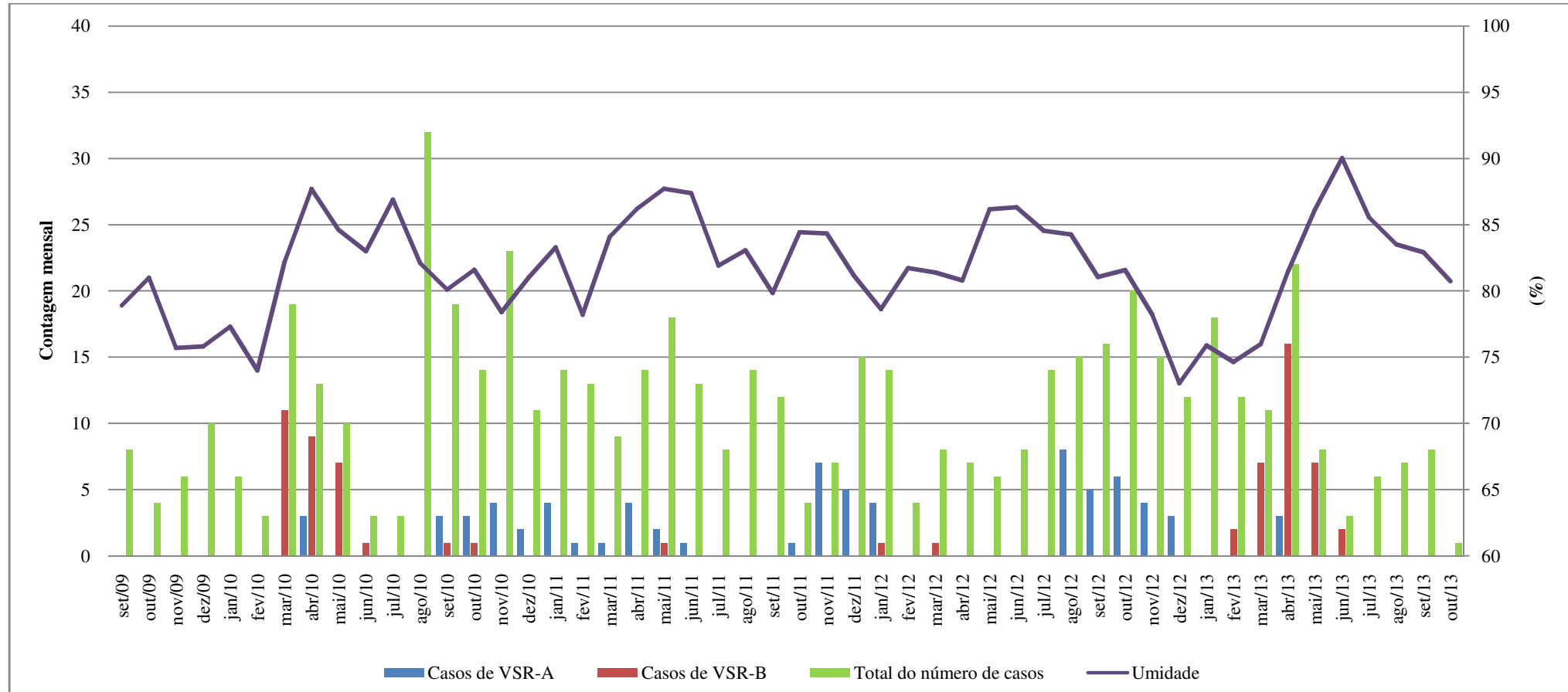
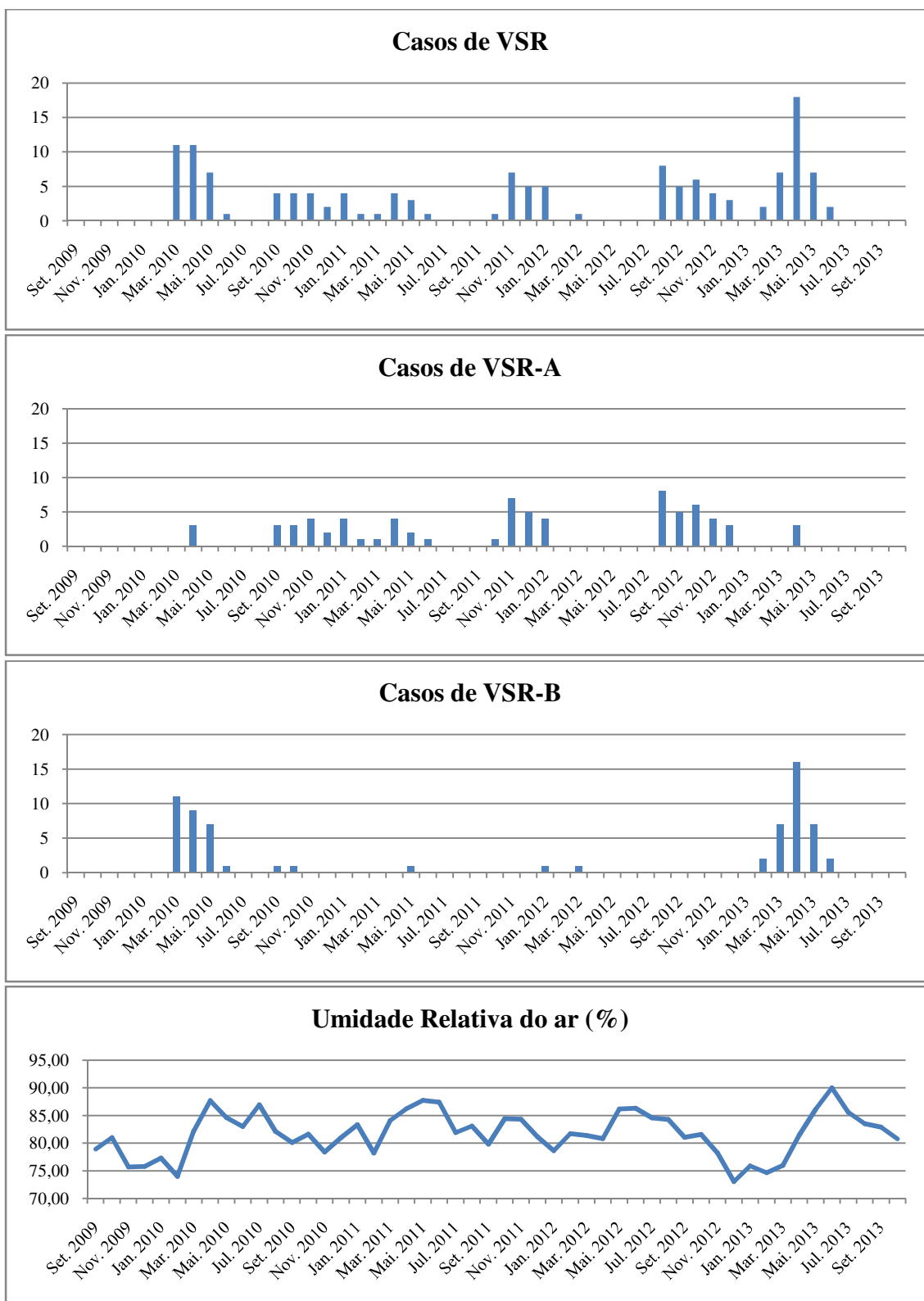


Figura 2. Distribuição sazonal dos fatores meteorológicos e os casos de VSR-A e -B durante o período do estudo em Salvador, Nordeste do Brasil.



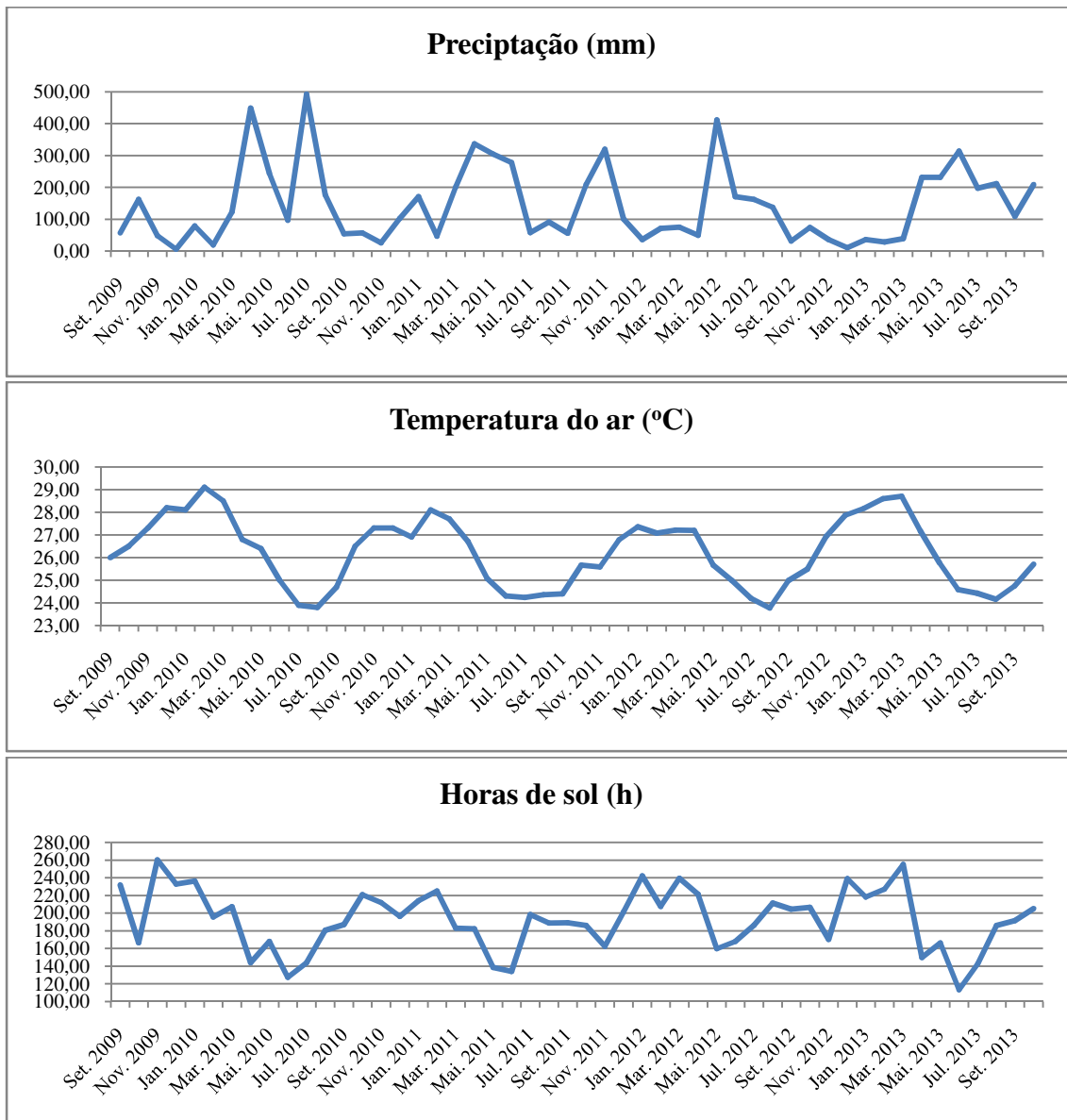


Tabela 3. Comparação das cargas de VSR em crianças de 6 a 23 meses com infecção respiratória aguda de acordo com as faixas etárias.

Carga de VSR		Faixa etária		<i>P</i>
		6-11 meses	12-23 meses	
VSR-A	N	40 (10,8%)	34 (17,8%)	0,02
	Mediana da carga (IQ)	1,1x10 ³ (1,5 x10 ² -1,0 x10 ⁵)	7,1 x10 ³ (68,1-8,5 x10 ⁴)	0,6
VSR-B	N	45(12,2%)	22 (11,5%)	0,8
	Mediana da carga (IQ)	7.4 x10 ⁴ (3,0 x10 ² -2,8 x10 ⁶)	3.4x10 ³ (34,8-1,8 x10 ⁴)	0,021

* Carga viral expressa em cópias/ml

IX. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que infecção por VSR foi encontrada em um quarto das crianças de 6-23 meses com IRA e as crianças acima de 1 ano foram mais comprometidas com VSR-A do que as crianças com idade inferior a 1 ano. As infecções por VSR-A ou VSR-B ocorrem em meses diferentes ao longo do ano.

Foi demonstrada a sazonalidade do VSR-B em que este aconteceu durante um período bem delimitado ao longo do ano em que foi predominante (entre março e julho). A sazonalidade do VSR-A foi de difícil demonstração por ter uma distribuição maior ao longo do ano, ou seja, o VSR-A somente não aconteceu nos meses de julho durante todo o período de estudo.

Houve uma associação da atividade do VSR-B com a umidade e este é um fator importante para determinar o início dos picos dos vírus. A umidade pode influenciar a fusão do vírus com as membranas celulares, permitindo a entrada na célula e a replicação. Este fator pode influenciar fortemente a estabilidade e a transmissibilidade do vírus. (Sloan et al, 2011)

A seguir estão estudos que mostram a co-circulação do VSR-A e VSR-B no mesmo período ao longo do ano, mas em nosso estudo foi demonstrada uma diferença expressiva entre estes. Estudo realizado em Montevidéu, Uruguai apresentou a epidemiologia do VSR entre 1985 e 2001 em que os dois subtipos circularam simultaneamente durante o ano com predominância frequente do subtipo A, mas a distribuição ao longo dos meses durante cada ano não foi demonstrada. (Arbiza et al, 2005) Outro estudo realizado em Leuven, Bélgica, também demonstrou a co-circulação entre os subtipos em que os picos de ambos aconteceram no inverno em torno da 50ª semana (Houspie et al, 2013) Esta co-circulação também foi demonstrada em estudos realizados no Reino Unido e Finlândia entre 1980 e 2001. (White et al 2005) Já o estudo

no Paquistão realizado somente no período do vírus entre dezembro de 2011 e março de 2012 também não demonstrou a diferença de distribuição entre os subtipos. (Aamir et al, 2013) Estudos realizados no Brasil também demonstram uma co-circulação entre os dois subtipos (Lamarão et al, 2012; Moura et al, 2013; Oliveira et al, 2008) Porém em nosso estudo com duração de quatro anos, realizado em uma cidade de clima tropical, a circulação do VSR-A e -B foi expressivamente diferente. Houve diferentes períodos de alta umidade durante o período de estudo (Figura 1), mas os subtipos A e B circularam em diferentes anos e com padrões alternados (Tabela 1) Os padrões de 2 a 4 picos consecutivos de predominância do subtipo A podem ser seguidos por um único pico intercalado em que subtipo B é dominante e isto foi relatado em países como Uruguai e Finlândia. Porém, a alternância nestes países aconteceu entre os anos, pois a atividade do vírus em regiões de clima temperado acontece uma vez por ano, o que não foi demonstrado neste estudo em região de clima tropical. (Arbiza et al, 2005; Houspie et al, 2013) Existe uma relação de concorrência e imunidade cruzada nas infecções pelos subtipos A e B na população. Após a infecção, os indivíduos ganham imunidade transitória para determinado subtipo, em média, durante 2 anos. (White et al, 2005)

Nosso estudo demonstrou uma frequência de infecção por VSR igual a 24,8%. Um estudo realizado em São Paulo, região Sudeste do Brasil, de clima subtropical, apresentou frequência igual a 27,4% em crianças com menores de 2 anos, entre março de 2008 e fevereiro de 2010 (Durigon et al, 2015) Outros estudos realizados em Belém do Pará, região Norte do Brasil e em São Paulo, região sudeste, apresentaram frequência igual a 23,1% e 27,3%, respectivamente, em crianças com idade inferior a 2-3 anos com IRA. Estes estudos incluíram crianças hospitalizadas com IVAI e foram realizados respectivamente durante 1 e 3 anos. (Lamarão et al, 2012; Ferone et al, 2014) Um estudo realizado em outra cidade no Nordeste do Brasil apresentou frequência igual a

48% de infecção por VSR e este achado pode ser atribuído ao fato deste estudo ter sido conduzido apenas durante a estação chuvosa local. (Cuevas et al, 2003) Assim como estudo realizado em quatro capitais nordestinas apresentou uma frequência de VSR de 40,2%, porém foi conduzido durante um ano e em crianças hospitalizadas demonstrando a importância deste patógeno encontrado em episódios de IVAI na região. (Gurgel et al, 2016) Tem sido demonstrado que as frequências de infecção por VSR dependem do clima local e podem variar entre 27,8% e 37,9% em países temperados, subtropicais e tropicais na mesma população. Países como China, Japão, Guatemala, Austrália e Turquia apresentaram estas frequências em estudos conduzidos durante 1 e 10 anos sobre a prevalência e variabilidade genética do VSR, exceto estudo realizado no Japão que buscou a prevalência de outros vírus respiratórios. (Zhang et al, 2010; Hara et al, 2014; McCracken et al, 2013; Moore et al, 2014; Hacımustafaoğlu et al 2014)

Demonstramos que não houve diferença quanto a frequência entre os casos estudados, entre os subtipos de VSR (13,2% vs.12,0%), mas VSR-A é mais predominante na maioria dos estudos que envolvem crianças com IRA. Estudo realizado no Japão apresentou uma frequência de 25,1% vs. 6,2% do VSR-A e -B respectivamente. (Zhang et al, 2010) Estudo conduzido no Uruguai, durante 1985 e 2001, apresentou predominância do subtipo A, exceto em quatro anos do período do estudo. (Arbiza et al, 2005) Também em estudo realizado em Uberlândia, Minas Gerais houve a predominância do subtipo A entre os anos de 2000 e 2007 (13,5% vs. 3,8%). (Oliveira et al, 2008) A predominância do VSR-A é atribuída a maior variabilidade de cepas deste subgrupo e, normalmente, a cepa dominante tem mecanismos para reinfecções frequentes por evasão da imunidade induzida por cepas anteriores. (Gardinassi et al, 2012) A ausência de predominância do VSR-A em nosso estudo pode ser explicada por ter sido conduzido durante quatro anos, ao passo que em dois anos

(2011-2012) o VSR-A foi predominante e nos outros dois anos do período do estudo (2010-2013), o VSR-B foi predominante, havendo assim, uma distribuição similar ao longo dos anos.

No estudo atual, o VSR-A foi mais comum em crianças acima de um ano. Um estudo realizado em sete países diferentes apresentou que o VSR-A foi mais frequente nas crianças entre 36 e 59 meses e menos comum na faixa etária de 6 a 11 meses, quando foram estudadas crianças com idade entre seis meses e 10 anos (Nolan et al, 2015). Sabe-se que a infecção por VSR é frequente em crianças com menos de um ano, mas a distribuição etária dos subtipos não é frequentemente relatada nos estudos.

Quase metade das crianças apresentou IVAI (41,1%) e não houve diferença entre as crianças com ou sem infecção por VSR-A ou VSR-B e ter ou não IVAI. Foi relatado que crianças com infecção por VSR apresentaram um maior comprometimento das vias aéreas inferiores, porém estes estudos foram realizados em crianças hospitalizadas (Calegari et al, 2005; Panayiotou et al, 2014), por isso é importante destacar as diferenças entre as metodologias dos estudos. Nossas amostras foram coletadas de crianças no Serviço de Emergência, onde não houve seleção para pacientes internados e o diagnóstico etiológico foi realizado através de método muito sensível.

Nosso estudo mostrou que a carga viral foi maior nas infecções causadas pelo VSR-B do que a carga viral nas infecções causadas pelo VSR-A. É possível especular que o menor número de cepas do VSR-B pode fazer com que a criança tenha menos infecções secundárias e, portanto uma resposta imune mais forte. A carga viral do VSR-B foi maior em crianças menores de 1 ano e esta carga mais elevada já é esperada em crianças menores de 1 ano, pois nesta faixa etária, trata-se habitualmente de uma infecção primária, mas a resposta imunológica pode diminuir de forma constante com as exposições subsequentes. (Borchers et al, 2013) Estudo conduzido em uma população

semelhante, porém hospitalizadas, demonstrou que não houve diferença significativa entre as cargas virais dos subtipos e por isso não conseguiram correlacionar a gravidade com a carga viral. (DeVicenzo, 2004)

A distribuição do VSR ao longo do ano impacta no calendário de imunoprofilaxia com anticorpo monoclonal. No Brasil, as aplicações do palivizumabe são recomendadas entre fevereiro e julho na região Nordeste. (Nota Técnica Conjunta nº 05/2015) Esta prática é baseada na inferência de que o VSR circula entre março e julho nesta região. Esta rotina é influenciada pelas diretrizes desenvolvidas e implementadas nos países de clima temperado. (American Academy of Pediatrics, 2014) Entretanto, levando em consideração os nossos resultados, diretrizes para uma região tropical precisam ser revistas. Outros estudos realizados em regiões tropicais, com coleta de dados durante todo ano e por pelo menos 4 anos serão muito importantes.

X. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Após a descrição da frequência de infecções por VSR em crianças entre 6 e 23 meses e seus diferentes subtipos, devemos buscar qual o papel dos demais agentes etiológicos virais como causa de infecção respiratória aguda nesta mesma faixa etária, observando também a sazonalidade e os fatores associados a estes .

Além disso, pretendemos acompanhar a evolução desta infecção respiratória em curto prazo em relação às principais complicações, o uso de medicações, hospitalizações e os custos diretos e indiretos da doença.

Entendemos que o acompanhamento desta população em longo prazo é importante para avaliar o desenvolvimento de doenças crônicas, os fatores ambientais que predispõem a estas e se a história de atopia familiar ou pessoal pode estar relacionado.

XI. CONCLUSÕES

1. Um quarto das crianças entre 6 e 23 meses com IRA tiveram infecção por VSR;
2. Não houve diferença na incidência dos VSR-A e -B durante o período do estudo;
3. Os padrões de sazonalidade do VSR-A e VSR-B foram expressivamente diferentes com relação aos meses do ano;
4. O VSR-B apresentou associação positiva com a umidade;
5. O VSR-A comprometeu com mais frequência as crianças com idade acima de ano;
6. A carga viral do VSR-B foi maior em crianças menores de 1 ano;

XII. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente estudo foi conduzido em apenas uma cidade e por isso a necessidade de estudos desta magnitude em outras cidades tropicais para convencer as autoridades sobre a necessidade de revisão das diretrizes de aplicação do Palivizumabe para esta.

Não houve uma avaliação da associação dos subtipos do VSR com a gravidade dos casos nas crianças por não ter utilizado um protocolo específico para esta. Além disso, a análise da associação dos subtipos e suas determinadas cargas virais com a gravidade seria importante para reforçar esta revisão. Tendo o presente estudo um caráter epidemiológico, apenas sugerimos que o protocolo pode ser revisto.

XIII. SUMMARY

TITLE: Seasonal differences of respiratory syncytial virus subtypes A and B in children with acute respiratory infection.

Viruses are major contributors to morbidity and mortality from ARI worldwide and among these viruses, Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the most common etiologic agents responsible for infections of the respiratory clinical conditions including bronchiolitis and pneumonia. **OBJECTIVE:** To describe the frequency, seasonality and age of infection by RSV subtype A and B among children with acute respiratory infection in a tropical city. **METHODS:** Prospective cross-sectional study conducted at a Pediatric Emergency Room in the city of Salvador, Northeastern Brazil. Children aged between 6-23 months with acute respiratory infection were evaluated from September 2009 to October 2013. Exclusion criteria were transference from other hospital or report of previous episode of wheezing. Upon recruitment, demographic and clinical data were collected along with nasopharyngeal aspirates (NPA) to diagnose RSV A and B by PCR method. **RESULTS:** Among 1.154 evaluated children, 504 (43.7%) reported previous episode of wheezing, 16 (1.4%) did not have NPA collected successfully, 11 (1.0%) came from other hospital and 63 (5.4%) did not consent. Thus, this study group comprises 560 cases. Overall, 139 (24.8%) cases had RSV detected in NPA. RSVA was found in 74 (13.2%) and RSVB was found in 67 (12.0%). Two (0.4%) were co-infected. RSVA was more frequent from August to January in comparison with the period from February to July (18.2% vs. 6.4%, $p < 0.001$). RSVB was more frequently found ($p < 0.001$) between March and June (36.0%) than from July to October (1.0%) or between November and February (1.6%). RSVA was more common among children above 1 year of age (17.8% vs. 1.8%; $p = 0.021$). **Conclusion:** One quarter of the patients had RSV detected. The distribution of cases per month was markedly different for RSVA

and RSVB. RSVA compromised more frequently children aged 1 year and above. Guidelines for specific immunoprophylaxis against RSV should be reviewed in the tropical region.

Keywords: immunoprophylaxis; RSV; respiratory virus; seasonality; viral load.

XIV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aamir UB, Alam MM, Sadia H, Zaidi SSZ, Kazi B. Molecular characterization of circulating respiratory syncytial virus (RSV) genotypes in Gilgit Baltistan Province of Pakistan during 2011-2012 winter season. *PLoS One* 2013;8(9):e74018.
2. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases; American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines Committee. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics* 2014 Aug;134(2):415-20.
3. Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001 – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005;100(3):221-30.
4. Berry M, Gamielien J, Fielding BC. Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses* 2015;7:996-1019.
5. Bloom-Feshbach K, Alonso WJ, Charu V, Tamerius J, Simonsen L, Miller MA, Viboud C. Latitudinal variations in seasonal activity of influenza and respiratory syncytial virus (RSV): a global comparative review. *PLoS One* 2013;8(2):e54445.
6. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus - A comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 2013;45:331-79.
7. Calegari T, Queiroz DAO, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TFM, Luiz LN, Oliveira RC, Diniz FC, Rossi LMG, Carvalho CJ, Lima AC, Mantese OC.

Clinical-Epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in Midwestern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2005;9(2):156-61.

8. Cevey-Macherel M, Galetto-Lacour A, Gervaix A, Siegrist CA, Bille J, Bescher-Ninet B, Kaiser L, Krahenbuhl JD, Gehrli M. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children based on WHO clinical guidelines. *European Journal of Pediatrics* 2009; 168(12):1429-36.

9. Chen K, Jia R, Li L, Yang C, Shi Y. The aetiology of community associated pneumonia in children in Nanjing, China and aetiological patterns associated with age and season. *BMC Public Health* 2015;15:113.

10. Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, Clos A, Patel JA, Nair S, Fan J, Henrickson KJ. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clinical Infectious Diseases* 2008;46:815-23.

11. Cuevas LE, Nasser AMB, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerging Infectious Disease* 2003; 9(12):1626-28.

12. DATASUS 2011, Indicadores e dados básicos. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0201>. Acesso em: 22 de junho de 2011.

13. DeVicenzo JP. Natural infection of infants with respiratory syncytial virus subgroups A and B: a study of frequency, disease severity, and viral load. *Pediatric research* 2004;56:914-7.

14. Durigon GS, Oliveira DBL, Felicio MCC, Finelli C, Pereira MFB, Storni JG, Caldeira RN, Berezin RC, Durigon EL, Berezin EN. Poor Outcome of Acute Respiratory Infection in Young Children with Underlying Health Condition in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases* 2015;34:3-7.
15. Eccles R. An explanation for the sazonality of acute upper respiratory tract viral infections. *Acta Oto-Laryngologica* 2002;122:183-91.
16. El-Radhi AS, Barry W. Thermometry in paediatric practice. *Archives of Disease in Childhood* 2006;91:351-6.
17. El-Sahrigy SAF, Abdel-Rahman AMO, Abou Shady EAE, Attia HR, Gomaa HE. Pneumoslide-M Technique for Rapid Detection of Atypical Pathogens in Critically Ill Children with Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of Medical Sciences*. 2006;6:793-9.
18. Esposito E, Piralla A, Zampiero A, Bianchini S, Di Pietro G, Scala A. Characteristics and their clinical relevance of respiratory syncytial virus types and genotypes circulating in northern Italy in five consecutive winter seasons. *PLoS ONE* 2015; 10(6): e0129369.
19. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B, Sarnes M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Archives of Internal Medicine* 2003;163:487-94.
20. Fernandes RM, Andrade MG, Constant C, Malveiro D, Magalhães M, Abreu D, Azevedo I, Sousa E, Salgado R, Bandeira T. Acute viral bronchiolitis: physician perspectives on definition and clinically important outcomes. *Pediatric Pulmonology* 2015; Nov 23. doi: 10.1002/ppul.23346. [Epub ahead of print]
21. Ferone EA, Berezin EN, Durigon GS, Finelli C, Felicio MCC, Storni JG, Durigon EL, Oliveira DBL. Clinical and epidemiological aspects related to the detection

of adenovirus or respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory tract infection. *The Journal of Pediatrics* 2014; 90(1): 42-9.

22. Fodha I, Vabret A, Ghedira L, Seboui H, Chouchane S, Dewar J, Gueddiche N, Trabelsi A, Boujaafar N, Freymuth F. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: association between viral load, virus subgroup, and disease severity. *Journal of Medical Virology* 2007;79:1951-8.

23. Fukutani KF, Nascimento-Carvalho CM, Gucht WV, Wollant E, Khouri R, Dierck D, Van Ranst M, Houspie L, Bouzas ML, Oliveira JR, Barral A, Van Weyenbergh J, Oliveira CI. Pathogen transcriptional profile in nasopharyngeal aspirates of children with acute respiratory tract infection. *Journal of Clinical Virology* 2015;69:190–6.

24. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2012; 31(8):808-13.

25. Gardinassi LGA, Simas PVM, Gomes DE, Bonfim CM, Nogueira FC, Garcia GR, Carareto CMA, Rahal P, Souza FP. Diversity and adaptation of human syncytial virus genotypes circulating in two distinct communities: Public hospital and day care center. *Viruses* 2012;4:2432-47.

26. Geiss GK1, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature Biotechnology* 2008 Mar;26(3):317-25.

27. Gilca R, Serres G, Tremblay M, Vachon ML, Leblanc E, Bergeron MG, Déry P, Boivin G. Distribution and Clinical Impact of Human Respiratory Syncytial Virus

Genotypes in Hospitalized Children over 2 Winter Seasons. *The Journal of Infectious Diseases* 2006; 193:54-8.

28. Groothuis JR, Simoes EA, Levin MJ. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *The New England Journal of Medicine* 1993;329:1524–30.

29. Gurgel RQ, Bezerra PGM, Duarte MCMB, Moura AA, Souza EL, Silva LSS, Suzuki CE, Peixoto RB. Relative frequency, possible risk factors, viral codetection rates, and seasonality of respiratory syncytial virus among children with lower respiratory tract infection in northeastern Brazil. *Medicine Journal* 2019;95(15):e3090.

30. Hacimustafaoglu M, Celebi S, Bozdemir SE, Ozgur T, Ozcan I, Guray A, Deniz C. RSV frequency in children below 2 years hospitalized for lower respiratory tract infections. *Turkish Journal of Pediatrics* 2013;55:130-9.

31. Hara M, Takao S, Shimazu Y, Nishimura T. Three-year study of viral etiology and features of febrile respiratory tract infections in Japanese pediatric outpatients. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2014 Jul;33(7):687-92.

32. Harris JA, Huskins WC, Langley JM, Siegel JD. Health care epidemiology perspective on the October 2006 recommendations of the Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. *Pediatrics* 2007;120(4):890-2.

33. Harris M, Clark J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, Mckean M, Thonsom A. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax* 2011;66:ii1-23.

34. Haynes AK, Manangan AP, Iwane MK, Sturn-Ramirez K, Homaira N, Brooks WA, Luby S, Rahman M, Klena JD, Zhang Y, Yu H, Zhan F, Dueger E, Mansour AM, Azazy N, McCracken JP, Bryan JP, Lopez MR, Burton DC, Bigogo G, Breiman RF, Feikin DR, Njenga K, Montgomery J, Cohen AL, Moyes J, Pretorius M, Cohen C, Venter M, Chittaganpitch M, Thamthitiwat S, Sawatwong P, Baggett HC, Lubber G, Gerber SI. Respiratory syncytial virus circulation in seven countries with global disease detection regional centers. *The Journal of Infectious Diseases* 2013;208(S3):246–54.
35. Houspie L, Lemey P, Keyaerts E, Reijmen E, Vergote V, Vankeerberghen A, Vayens F, Beenhower HD, Van Ranst M. Circulation of HRSV in Belgium: From Multiple Genotype Circulation to Prolonged Circulation of Predominant Genotypes. Leung FCC. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60416.
36. Jansen AG, Sanders EA, Hoes AW, van Loo AM, Halk E. Influenza and respiratory syncytial virus associated mortality and hospitalizations. *European Respiratory Journal* 2007;30:1158-66.
37. Kaaijk P, Luytjes W, Rots NY. Vaccination against RSV: is maternal vaccination a good alternative to other approaches? *Human vaccines & immunotherapeutics* 2013;9:1263–7.
38. Lamarão LM, Ramos FL, Mello WA, Santos MC, Barbagelata LS, Justino MCA, Silva AF, Quaresma AJPG, Silva VB, Burbano RR, Linhares AC. Prevalence and clinical features of respiratory syncytial virus in children hospitalized for community-acquired pneumonia in northern Brazil. *BMC Infectious Diseases* 2012;12:119.
39. Leung AKC, Kellner JD, Davies HD. Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *Journal of the National Medical Association* 2005;97:1708-13.

40. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 2012; 379: 2151–61.
41. Loscertales MP, Roca A, Ventura PJ, Abacassamo F, Dos Santos F, Sitaube M. Epidemiology and clinical presentation of respiratory syncytial virus infection in a rural area of southern Mozambique. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2002;21:148-55.
42. Mallol J, Garcia-Marcos L, Solé D, Brand P, the EISL group. International prevalence of recurrent wheezing during the first year of life: variability, treatment patterns and use of health resources. *Thorax* 2010;65:1004-9.
43. McCracken JP, Prill MM, Lindblade KA, López MR, Estevez A, Muller ML. Respiratory syncytial virus infection in Guatemala, 2007-2012. *The Journal of Infectious Diseases* 2013;208(3):197-206.
44. Moore HC, Jacoby P, Hogan AB, Blyth CC, Mercer GN. Modelling the seasonal epidemics of respiratory syncytial virus in young children. *PLoS One* 2014;9(6):e100422.
45. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratou E, Sutanto A, Sedyaningsih ER, Ngama M, Munywoki PK, Kartasmita C, Simões EAF, Rudan I, Weber MW, Campbell H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010; 375: 1545-5.
46. Nair H, Simões EAF, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JSF, Feikin DR, Moisi JC, Roca A, Baggett HC, Zaman SMA, Singleton RJ, Lucero MG, Chandran A, Gentile A, Cohen C, Krishnan A, Bhutta ZA, Arguedas A, Clara AF,

Andrade AL, Ope M, Ruvinsky RO, Hortal M, McCracken JP, Madhi SA, Bruce N, Qazi SA, Morris SS, El Arifeen S, Weber MW, Scott JAG, Brooks WA, Breiman RF, Campbell H. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2013;381:1380-90.

47. Nascimento-Carvalho CM, Cardoso MRA, Barral A, Araujo-Neto C, Oliveira J, Sobral LS, Saukkoriipi A, Paldanius M, Vainionpaa R, Leinonen M, Ruuskanen O. Seasonal patterns of viral and bacterial infections among children hospitalized with community-acquired pneumonia in a tropical region. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2010;42(11-2):839-44.

48. Nolan T, Botja-Tabora C, Lopez P, Weckx L, Ulloa-Gutierrez R, Lazcano-Ponce E, Kerdpanich A, Weber MAR, Los Santos AM, Tinoco JC, Safadi MAP, Seng LF, Mezerville MH, Faingezicht I, Cruz-Valdez A, Feng Y, Li P, Durviaux S, Haars G, Roy-Ghanta S, Vaughn DW, Taylor S. Prevalence and incidence of respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in children aged 6 months to 10 years with influenza-like illness enrolled in a randomized trial. *Clinical Infectious Diseases* 2015;26: Feb 11. pii: civ065. [Epub ahead of print]

49. Brazil. Ministry of Health. Technical note no. 05/2015. To establish the seasonality of respiratory syncytial virus in Brazil and to offer information in regard to the recommended use of palivizumab. [Brasil. Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta nº 05/2015. Estabelecer a sazonalidade do vírus sincicial respiratório no Brasil e oferecer esclarecimentos referentes ao protocolo de uso do Palivizumabe.]

50. Oliveira TFM, Freitas GRO, Ribeiro LZG, Yokosawa J, Siqueira MM, Portes SAR, Silveira HL, Calegari T, Costa LF, Mantese OC, Queiroz DAO. Prevalence and

clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2008;103(5):417-22.

51. Panayioutou C, Richter J, Koliou M, Kalogirou N, Georgiou E, Christodoulou C. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010-2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity. *Epidemiology & Infection* 2014;142:2406-11.

52. Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clinical Infectious Diseases* 2011;52:284-9.

53. Pica N and Bouvier NM. Ambient Temperature and Respiratory Virus Infection. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2014;33(3):311-3.

54. Rietveld E, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Huysman MW, de Groot R, Moll HA. Hospitalization for respiratory syncytial virus infection in young children: development of a clinical prediction rule. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2006;25(3):201-7.

55. Rotzen-Ostlund M, Eriksson M, Lindell AT, Allander T. Children with multiple viral respiratory infections are older than those with single viruses. *Acta Paediatrica* 2014;103:100-4.

56. Sloan C, Moore ML, Hartert T. Impact of pollution, climate, and socio-demographic factors on spatiotemporal dynamics of seasonal respiratory viruses. *Clinical and Translational Science* 2011;4(1):48-54.

57. Sociedade Brasileira de Pediatria, 2011. Diretrizes para o manejo da infecção causada pelo vírus sincicial respiratório (VSR). Disponível em:

http://www.sbp.com.br/pdfs/diretrizes_manejo_infec_vsr_versao_final1.pdf. Acesso em: 17 de março de 2016.

58. Stensballe LG, Devasundaram J, Simoes EAF. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2003;22:21-32.

59. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatrica* 2009; 98(1): 123-6.

60. Thompson TM, Roddam PL, Harrison LM, Aitken JA, DeVicenzo JP. Viral specific factors contribute to clinical respiratory syncytial virus disease severity differences in infants. *Clinical Microbiology* 2015;4(3).

61. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Journal of the American Medical Association* 2003;289(2):179-86.

62. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: Causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clinical Microbiology Reviews* 2010; 23:74-98.

63. Wegzyn C, Toh LK, Notario G, Biguenet S, Unnebrink K, Park C, Makari D, Norton M. Safety and Effectiveness of Palivizumab in Children at High Risk of Serious Disease Due to Respiratory Syncytial Virus Infection: A Systematic Review. *Infectious disease and therapy* 2014;3:133-58.

64. White LJ, Waris M, Cane PA, Nokes DJ, Medley GF. The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England &

Wales and Filand: seasonality and cross-protection. *Epidemiology & Infection* 2005;133:279-89.

65. World Health Organization. Integrated Management of Childhood Illness chart booklet. (WC 503.2). Geneva: WHO, 2008. [WHO website]. Available at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241597289_eng.pdf. Accessed January 15, 2009.

66. Wu W, Macdonald A, Hiscox JA, Barr JN. Different NF-kappaB activation characteristics of human respiratory syncytial virus subgroups A and B. *Microbial Pathogenesis* 2012;52:184-91.

67. Zhang Z-Y, Du L-N, Chen X, Zhao Y, Liu E-M, Yang X-Q, Zhao X-D. Genetic variability of respiratory syncytial viruses (RSV) prevalent in southwestern China from 2006 to 2009: Emergence of subgroup B and A RSV as dominant strains. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48(8):1201-7.

XV. ANEXOS

XV.1. ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: Prevalência de chiado, infecção respiratória viral

{ID}: ____ _

Eu,....., fui procurado(a) por Maiara Lanna Bouzas orientanda da Profa. Cristiana Nascimento de Carvalho, Professora da Universidade Federal da Bahia, e convidado (a) para conversar sobre a possibilidade da criança poder participar sob minha inteira responsabilidade, do projeto de pesquisa de nome: **PREVALÊNCIA DE CHIADO E INFECÇÃO POR VÍRUS INFLUENZA EM LACTENTES**. Fui informado que a infecção por Influenza, ou seja, gripe é extremamente comum em todo o mundo, e que ela leva a várias complicações, como pneumonias, otites, convulsões, principalmente em crianças pequenas, além de fazer com que nós, os pais ou responsáveis, percamos nosso trabalho para cuidar da nossa criança. No entanto, ainda não se sabe a quantidade exata de crianças doentes por ano e para isso é necessário fazer esta pesquisa coletando secreção do nariz da criança e sangue. Além disso, após 14 dias, eu serei contatado (a) por telefone para que minha criança seja reavaliada por Dr Juliana R de Oliveira, quando coletará a segunda amostra de sangue. Se eu concordar, minha criança poderá participar deste estudo, e se eu não concordar a minha criança será tratada com o que apresenta agora, de maneira igual a qualquer outro paciente. As informações clínicas e laboratoriais registradas na pesquisa serão usadas de forma totalmente anônima. A qualquer momento poderei tirar minha criança da pesquisa sem que isso venha a prejudicar ou impedir seu atendimento no CPPHO.

CONSENTIMENTO

Autorizo a inclusão da criança _____

Sob minha responsabilidade no estudo acima citado, sob condução de Maiara Lanna Bouzas, tel.(71) 8895-2221.

Assinatura de um dos pais/guardiões

Assinatura do médico

Assinatura da testemunha

Local

Data

DOCUMENTO EM 2 VIAS, SENDO UMA PARA SER ENTREGUE AO RESPONSÁVEL PELA CRIANÇA QUE PARTICIPARÁ DA PESQUISA

XV.2. ANEXO 2

Ficha de Avaliação Pesquisa Clínica Inicial

Projeto de Pesquisa: Prevalência de chiado, infecção respiratória viral e desenvolvimento de chiado recorrente em lactentes

Sexo {CSEXO}: (1) Masculino (2) Feminino

No. do Prontuário {CPRONT}: _____ Data Avaliação {CDATAV} ____/____/____

Nome (Iniciais) {CNOME}: _____

Naturalidade {CNATUR}: _____ Procedência {CPROC}: _____

Data Nascimento {CNASC}: ____/____/____ Idade (anos /meses) {CIDADE}: __ __ a/ __ m

Cor {CCOR}: _____ Peso (g) {CPESO}: __ __ __ __ __ (99999) NS/NR

Altura (cm) {CALTU} __ __ __ (999) NS/NR

Ocup. Mãe/Resp. {COCMAE}: _____

1. Doença Atual

	Sim	Não	NS/NR
	Há quantos dias?		
Febre {CFEBRE}		0	9
Tosse {CTOSSE}		0	9
Se sim, {CTOSSET} (1) Seca (2) Cheia			
2.3. Espirros {CESPIRR}		0	9
2.4. Coriza {CCORIZA}		0	9
2.5. Hialina {CHIALI}		0	9
Se sim, {CHIALIC} (1) Amarela (2) Verde			
2.6. Rouquidão {CROUQ}		0	9
2.7. Otdalgia {COTALG}		0	9
2.8. Secreção ouvido? {CSOUV}		0	9
2.9. Chiado ou Sibilância {CCHIAD}		0	9
2.10. Dispneia {CDISP}		0	9
Se sim há quanto tempo? {CDISP} _____			
2.11. Tiragem {CTIRAG}		0	9
Se sim há quanto tempo? {CDISPT} _____			
2.12. Convulsão {CCONVU}		0	9
Se sim há quanto tempo? {CCONVUT} _____			
2.13. Cianose {CCIANO}		0	9
Se sim há quanto tempo? {CCIANOT} _____			

2.14. Outros sinais / sintomas: {COUTR}		0	9
Qual? {QUAL}			

3. Antecedentes

3.1. Obstétricos e Neonatais

	Sim	Não	NS/NR
3.1.1. Pré-Natal {CPRENAT}	1	2	9
3.1.2. Parto {CPARTO}	(1) Natural	(2) Cesário	9
3.1.3. Peso ao Nascer: _____ {CPESNAT}	(99) NS/NR		
3.1.4. Doença ao nascer {CDONAT}	1	2	9
Qual? {QDONAT} _____			
3.1.5. Permaneceu internado após o nascimento? {CINTNAT}	1	2	9
Quantos dias ? {CTEMPINT} _____			
3.1.6. Prematuridade {CPREMAT}	1	2	9
Caso sim, Idade gestacional: _____			
3.1.7. Desconforto respiratório precoce? {CDRSPNAT}	1	2	9
3.1.8. Uso de O ₂ {CUO2}	1	2	9
Quantos dias ? {CTEMPO2} _____			
3.1.9. Halo {CHALONAT}	1	2	9
3.1.10. Respirador {CRESPNAT}	1	2	9
3.1.11. Mãe Fumante {CMAEFUMG} durante a gestação	1	2	9
3.1.12. Mãe Fumante {CMAEFUMA} atualmente	1	2	9
3.1.13. Mãe Usuária de drogas {CMAEDROG}	1	2	9

3.2. Fisiológicos

3.2.1. Andou com quantos meses? (meses) {CTEMPAND}		99
3.2.2. Sentou com quantos meses? (meses) {CTEMPSNT}		99

3.3. Contatos com IRA – Rede de contatos doentes

3.3.1. Quem acha que contaminou a criança {CCONTCRN}?
(0) Irmão Maior (1) Irmão do meio (2) Irmão Menor (3) Pai / Mãe (4) Outro (5) Colega creche (6) Indeterminado (7) Acha que foi em casa (8) Acha que foi na creche (9) NS/NR

3.4. Alimentares

3.4.1. Foi amamentado? {CAMAMENT}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Se não, por quê? {CNAMMOT}			
3.4.2. Amamentação exclusiva? {CAMEXC}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Se sim, até quando? (meses) {CTAMEXC}			
3.4.3. Amamentação mista? {CAMMIS}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Se sim, até quando? (meses) {CTAMMIS}			

3.6 Antecedentes Familiares

3.6.1. Alergia de pele {CALPL}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Se sim, quem na família? {CALPLFAM}	(0) Pai (4) Tios	(1) Mãe (5) Outros	(2) Irmãos (9) NS/NR
3.6.2. Asma {CASMAF}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Se sim, quem na família? {CASMAFAM}	(0) Pai (4) Tios	(1) Mãe (5) Outros	(2) Irmãos (9) NS/NR
3.6.3. Rinite {CRINIF}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Se sim, quem na família? {CRINIFAM}	(0) Pai (4) Tios	(1) Mãe (5) Outros	(2) Irmãos (9) NS/NR
3.6.4. A mãe fez uso de vacina para Influenza na gravidez? {CINFVMAEG}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR

3.7. Patológicos Pessoais – Doenças Associadas

Doenças Respiratórias

	Sim	Não	
3.7.1. Rinite {CRINI}	1	2	(9) NS/NR
3.7.2. Displasia Bronco-Pulmonar {CDBP}	1	2	(9) NS/NR
3.7.3. Outras {COTRSP}	1	2	(9) NS/NR
Se sim, quais? {COTRSPQ}			
3.7.4. Asma {CASMA}	1	2	(9) NS/NR
3.7.5. Eczema {CECZ}	1	2	(9) NS/NR
3.7.6. Rinite {CRINI}	1	2	(9) NS/NR

3.7.7. Refluxo Gastroesofágico {CREFL}	1	2	(9) NS/NR
3.7.8. Cardiopatia {CCARD}	1	2	(9) NS/NR
3.7.9. Neuropatia {CNEUR}	1	2	(9) NS/NR
3.7.10. Anemia Falciforme {CANEFA}	1	2	(9) NS/NR
3.7.11. Malformações {CMALFORM}	1	2	(9) NS/NR
3.7.12. Outras {COTPAT}	1	2	(9) NS/NR
Qual: _____			
3.7.13. Fez teste do pezinho? {CTESTPZ}	1	2	(9) NS/NR

3.8. Hábitos de Vida

3.8.1. Casa – número de habitantes {CCASAQ}: _____

Nome	Idade
	{CID1}
	{CID2}
	{CID3}
	{CID4}
	{CID5}
	{CID6}
	{CID7}

3.8.2. Cama compartilhada? {CCAMCOMP}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Se sim, com quem? {CCAMCOMPQ}			
3.8.3. Há poeira em casa? {CPOEIRC}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.4. Há poeira no quarto? {CPOEIRQ}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.5. Há mofo em casa? {CMOFOC}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.6. Há mofo no quarto? {CMOFOQ}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.7. Há baratas em casa? {CBRT}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.8. Há fumantes em casa? {CFUMA}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Se sim, quem? {CFUMAQ}			
Se sim, quanto cigarros por dia {CFUMANC}			
3.8.9. Há poluição em casa? {CPOLUI}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Que tipo: _____			
3.8.10. Há ventilação em casa? {CVENTILA}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.11. Freqüente creche? {CCRECHE}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
Se sim, há quanto tempo (meses)? {CCRECHEQ}	(9) NS/NR		
Se sim, em que turno(s)? {CCRECHET}	(0) Manhã	(1) Tarde	(2) Manhã e Tarde (9) NS/NR
3.8.12. Número de habitantes no mesmo quarto? {CNHQ}			

Caso sim, quais as idades:			
3.8.13. Tem cão em casa? {CCAO}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.14. Tem gato em casa? {CGATO}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.15. Tem galinha em casa? {CGALINHA}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.16. Tem passarinho em casa? {CPASSARO}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.17. Tem rato em casa? {CRATO}	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.18. Tem inseto em casa {CINSET} Caso sim, qual:	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR
3.8.19. Tem outro animal em casa? {COUTROAN} Caso sim, qual: _____	(1) Sim	(2) Não	(9) NS/NR

Exame Clínico

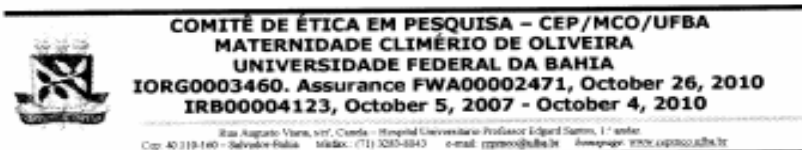
4.1.FC {CFC} (bpm)			
4.2. FR {CFR} (ipm)			
4.3. TEC {CTEC} (s)			
4.4. Temperatura Axilar {CTAXI} (°C)			
4.5. Apresenta tosse? {CTOSSE}	(1) Sim	(2) Não	
Se sim, qual a característica? {CTOSSEC}	(0) Seca	(1) Produtiva	
4.6. Apresenta hiperemia nos olhos? {CHIPEREM}	(1) Sim	(2) Não	
4.7. Apresenta edema nos olhos? {CEDEMOL}	(1) Sim	(2) Não	
4.8. Apresenta rinorréia? {CRINORREIA}	(1) Sim	(2) Não	
4.9. Apresenta prurido nasal? {CPRURIDO}	(1) Sim	(2) Não	
4.10. Apresenta obstrução nasal? {COBSTNAS}	(1) Sim	(2) Não	
4.11. Apresenta rouquidão? {CROUQUI}	(1) Sim	(2) Não	

Aparelho Respiratório

4.12. Apresenta Tiragem? {CTIRAG}	(1) Presente	(2) Ausente	
Se sim, qual? {CTIRAGQ}	(1) Intercostal	(2) Subdiafragmática	
4.12. Apresenta Murmúrio Vesicular? {CMURMU}	(0) Normal	(1) Aumentado	(2) Diminuído
4.13. Apresenta crépitos no pulmão esquerdo? {CCREPEQ}	(1) Presentes	(2) Ausentes	
4.14. Apresenta crepitos no pulmão direito? {CCREPDR}	(1) Presentes	(2) Ausentes	
4.15. Apresenta sibilos no pulmão esquerdo? {CSIBEQ}	(1) Presentes	(2) Ausentes	
4.16. Apresenta sibilos no pulmão direito? {CSIBDR}	(1) Presentes	(2) Ausentes	

4.17. Apresenta roncos no pulmão esquerdo? {CRONEQ}	(1) Presentes	(2) Ausentes
4.18. Apresenta roncos no pulmão direito? {CRONDR}	(1) Presentes	(2) Ausentes
4.19 Outros sinais {COTSIN}		

XV.3. ANEXO 3



PARECER/RESOLUÇÃO N.º 067/2009

Registro CEP: 070/09 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Título do Projeto. “Prevalência de Chiado, infecção respiratória viral e desenvolvimento de chiado recorrente em lactantes.”

Patrocínio/Financiamento. Solicitado financiamento à FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia.

Pesquisadora Responsável. Professora, **Cristiana Maria Costa Nascimento de Carvalho**. Pesquisadoras associadas: Professoras **Aldina Maria Prado Barral** e **Maria Regina Alves Cardoso**. “*Currícula Vitae*” anexos.

Instituição. Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos, Universidade Federal da Bahia (CPHO/C-HUPES/UFBA).

Área do Conhecimento. 4.00, Ciências da Saúde; 4.01, Medicina; Nível E; Grupo III.

Objetivos. Geral — estimar a carga de infecção pelos vírus Influenza (Flu) e Sincicial Respiratório (VSR). **Específicos** — estimar a prevalência de chiado progressivo, sibilos no atendimento, complicações e hospitalização associadas à infecção por esses vírus; descrever a sazonalidade da infecção por Flu/VSR; estimar a incidência de chiado após o episódio índice de infecção por Flu ou VSR.

Resumo. Estudo de corte transversal seguido de coorte prospectiva para avaliar 550 (quinhentos e cinquenta) crianças, com idade entre 6 a 23 meses de vida, diagnosticadas com Infecção Respiratória Aguda. Exclusão daquelas que apresentarem passado de “chiado”. Após recrutamento, as crianças serão avaliadas em três momentos. Através de seus responsáveis, serão obtidos, na **1ª avaliação**, os dados da história clínica e procedido o exame físico com colheita de amostras da secreção da nasofaringe e de sangue para realização de hemograma e sorologia para vírus **Flu** e **VSR**. Subseqüentemente, após 14 (quatroze) dias da visita inicial, ocorrerá a **2ª avaliação** mediante o preenchimento da Ficha de Seguimento que conterá informações acerca da evolução, internamento, uso de antibióticos, desenvolvimento de chiado, pneumonia, otite, entre outras complicações e nova colheita de sangue (soros pareados). Em seguida, os familiares serão contatados mensalmente através de telefonemas ou presença ambulatorial, para levantamento de informações sobre o desenvolvimento de chiado com utilização da Ficha de Seguimento. Completados os dois anos de vida,



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Rua Augusto Viana, s/nº, Candeias - Hospital Universitário Professor Edgard Souto, 17º andar
 Cep: 40.110-100 - Salvador-Bahia - telef: (71) 3205-6943 e-mail: cep@ufba.br homepage: www.cep@ufba.br

segue-se a 3ª avaliação, a fim de ser constatada a higidez física, e procedida a última colheita de amostra de sangue. Para a inserção dos dados e análise destes serão utilizados o Programa STATA, versão 9.0, e o programa EPI-DATA, versão 6.1, e as variáveis através de intervalos de confiança de 95%.

Comentários. Projeto bem estruturado, relevante, com infra-estrutura suficiente no próprio CPPHO e contrapartida do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz-FIOCRUZ/Salvador (Declarações apenas ao Protocolo). Inexiste maleficência. Equipe qualificada. **Orçamento e Cronograma** presentes. "Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido" ético e obedecendo às normas vigentes para pesquisas em seres humanos. Devem ser acrescentadas, entretanto, com atualizações, como os "responsáveis legais" poderão contatar os Pesquisadores e este Institucional para orientação ou dirimir dúvidas ou eventos ocorridos no curso da Pesquisa.

Projeto aprovável.

ANTÔNIO DOS SANTOS BARATA

Salvador, 22 de Julho de 2009

Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata
 Coordenador - CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (ã) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução, bem como as "Recomendações Adicionais" apenas, além da **impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

XV.4. ANEXO 4

Information for Authors

The Lancet Infectious Diseases considers any original research contribution that advocates change in or illuminates infectious disease clinical practice and informative reviews on any topic connected with infectious diseases. Because the journal has an international readership from a wide range of specialties, it is vital that articles should be written clearly and should not assume a level of knowledge above that of, say, a reasonably well-read, recently qualified, doctor in training. One way to find out if your article is understandable to those reading outside their immediate field of interest is to show the manuscript to colleagues in other specialties. If they find it difficult to follow, so will a good proportion of the readership. Wherever possible, figures and good quality photographs (colour or black and white) should be used to supplement and to enhance the text. Further details on the different sections of *The Lancet Infectious Diseases*, and how to submit to the journal, are provided below. If you require further clarification, the journal's editorial staff will be pleased to help (email IDeditorial@lancet.com).

Manuscripts must be solely the work of the author(s) stated, must not have been previously published elsewhere, and must not be under consideration by another journal. *The Lancet* journals are signatories of the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](http://www.icmje.org), issued by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE Recommendations), and to the Committee on Publication Ethics (COPE) code of conduct for editors. We follow [COPE's guidelines](http://www.elsevier.com/locate/COPE).

[Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](http://www.icmje.org)
<http://www.icmje.org>

How to submit your paper

Manuscript submission

Manuscript submission to all *Lancet* journals is free. Manuscripts should be submitted online via the *The Lancet Infectious Diseases'* online submission and peer review website (known as EES) at <http://ees.elsevier.com/thelancetid>

- Simply log on to EES and follow the onscreen instructions for all submissions
- If you have not used EES before, you will need to register first. In EES, the corresponding author is the person who enters the manuscript details and uploads the submission files
- Inclusion of illustrations (photographs, graphs, diagrams, etc) is a prerequisite for publication. Submission of original and editable artwork files is encouraged. Digital photography files should have a resolution of at least 300 dpi and be at least 107 mm wide
- In almost all cases, if you have a finished manuscript, you should submit it, rather than contacting *The Lancet Infectious Diseases* to enquire whether an unseen manuscript is likely to be accepted. Unless you have been asked by the Editor to submit by email, you should use the online system for all types of submission, including Correspondence
- If you have any technical problems or questions, please contact our dedicated customer support (available 24 h a day, 365 days a year):

For the Americas: +1 888 834 7287 (toll-free in USA and Canada)
For Asia and Pacific: +81 3 5561 5032
For Europe and rest of the world: +353 61 709190
Email: IDeditorial@lancet.com

Covering letter

- You should upload your covering letter at the "Enter Comments" stage of the online submission process
- Use the covering letter to explain why your paper should be published in *The Lancet Infectious Diseases*—the leading international infectious diseases journal—rather than elsewhere
- It is helpful to indicate what could shorten your paper—the full

paper can be reviewed and a shorter version published; a table or figure, details of a DNA sequence, or further references, for example, can be published on our website or made available from the authors

First submissions to *The Lancet Infectious Diseases* should include:

- 1 Covering letter
- 2 Manuscript including tables and panels
- 3 Figures
- 4 Author statement form (see next section)
- 5 Declaration of interests and source of funding statements (see next section)
- 6 In-press papers—one copy of each with acceptance letters
- 7 Protocols and CONSORT details for randomised controlled trials (see Articles)
- 8 We encourage disclosure of correspondence from other journals and reviewers, if previously submitted, and we might contact relevant editors of such journals
- 9 Research in context panel, for all primary research Articles

[COPE Code of Conduct](http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf)
http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf

Statements, permissions, and signatures

Authors and contributors

- Designated authors should meet all four criteria for authorship in the ICMJE Recommendations
- All authors, and all contributors (including medical writers and editors), should specify their individual contributions at the end of the text
- *The Lancet Infectious Diseases* will not publish any paper unless we have the signatures of all authors
- We suggest you use the [author statement form](http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/tlid-author-signatures.pdf) and either upload the signed copy with your submission, or fax to +44 (0) 1865 853 016
- Please include written consent of any cited individual(s) noted in acknowledgments or personal communications

[ICMJE Recommendations](http://www.icmje.org)
<http://www.icmje.org>

[Author statement form](http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/tlid-author-signatures.pdf)
<http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/tlid-author-signatures.pdf>

Declaration of interests

A conflict of interest exists when professional judgement concerning a primary interest (such as patients' welfare or validity of research) may be influenced by a secondary interest (such as financial gain).

Information for Authors

Financial relationships are easily identifiable, but conflicts can also occur because of personal relationships and rivalries, academic competition, or intellectual beliefs. A conflict can be actual or potential, and full disclosure to the Editor is the safest course. Failure to disclose conflicts might lead to publication of a correction or even to retraction. All submissions to *The Lancet Infectious Diseases* must include disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential or actual conflict of interest (see *Lancet* 2001; 358: 854–56 and *Lancet* 2003; 361: 8–9). The Editor may use such information as a basis for editorial decisions, and will publish such disclosures if they are believed to be important to readers in judging the manuscript. Agreements between authors and study sponsors that interfere with authors' access to all of a study's data, or that interfere with their ability to analyse and interpret the data and to prepare and publish manuscripts independently, may represent conflicts of interest, and should be avoided.

- At the end of the text, under a subheading "Declaration of interests", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of financial conflicts include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patents or patent applications, and travel grants, all within 3 years of beginning the work submitted. If there are no conflicts of interest, authors should state that
- All authors are required to provide a Conflict of Interest Statement and should complete a standard form, which is available at <http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/icmje-coi-form.pdf>. This form can be uploaded with the manuscript at submission or faxed to +44 (0)1865 853017. The form has been modified by the ICMJE following consultation with authors and editors. Further information is available in a joint ICMJE statement published on July 1, 2010. For more information see *Lancet* 2009; 374: 1395–96
- For Comment and Reviews, *The Lancet Infectious Diseases* will not publish if an author, within the past 3 years, and with a relevant company or competitor, has any stocks or shares, equity, a contract of employment, or a named position on a company board; or has been asked by any organisation other than *The Lancet Infectious Diseases* to write, be named on, or to submit the paper (see *Lancet* 2004; 363: 2–3)

Role of the funding source

- All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text
- At the end of the Methods section, under a subheading "Role of the funding source", authors must describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication
- If there is no Methods section, the role of the funding source should be stated as an acknowledgment. If the funding source had no such involvement, the authors should so state
- The corresponding author should confirm that he or she had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication

Role of medical writer or editor

- If a medical writer or editor was involved in the creation of your manuscript, we need a signed statement from the corresponding author to include their name and information about funding of this person
- This information should be added to the Acknowledgments or Contributors section
- We require signed statements from any medical writers or editors declaring that they have given permission to be named as an author, as a contributor, or in the Acknowledgments section

Patient and other consents

- Appropriate written consents, permissions, and releases must be obtained where you wish to include any case details, personal information, and/or images of patients or other individuals in *The Lancet* journals in order to comply with all applicable laws and regulations concerning privacy and/or security of personal information. Studies on patients or volunteers need approval from an ethics committee and informed consent from participants. These should be documented in your paper
- Do not use "blackout" bars or similar devices to anonymise patients in clinical images: if you have taken consent appropriately masking is not needed.
- Since the consent form needs to comply with the relevant legal requirements of your particular jurisdiction, we do not provide sample forms; this is your responsibility. Your affiliated institution should be able to provide an appropriate form
- For the purposes of publishing in *The Lancet* journals, a consent, permission, or release should include, without limitation, publication in all formats (including print, electronic, and websites), in sublicensed and reprinted versions (including translations), and in other works and products
- To respect your patient's and any other individual's privacy, please do not send signed forms to *The Lancet Infectious Diseases*. Please instead complete the patient consent section of the *Author statements* while retaining copies of the signed forms in the event they should be needed
- If consent, permission, or release is made subject to any conditions, *The Lancet Infectious Diseases* must be made aware in writing of all such conditions before publication
- For more information about our policy, please visit <http://www.elsevier.com/about/company-information/policies/patient-consent>.

Signatures

At the external peer review stage you will need to send signed copies of the following statements:

- Authors' contributions
- Conflicts of interest statements
- Statements of role, if any, of medical writer or editor
- Acknowledgments—written consent of cited individual
- Personal communications—written consent of cited individual
- Use of copyright-protected material—signed permission statements from author and publisher

These statements can be scanned and submitted electronically to eesTheLancetID@lancet.com. To minimise delays, we strongly

ICMJE COI form
<http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/icmje-coi-form.pdf>

Joint ICMJE statement
<http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/icmje-statement.pdf>

Patient Consent form
http://www.thelancet.com/pb/assets/raw/Lancet/authors/lancet_consent_form.pdf

advise that you prepare signed copies of these statements before you submit your manuscript.

Types of article and manuscript requirements

Please ensure that anything you submit to *The Lancet Infectious Diseases* follows the guidelines provided for each article type. For instruction on how to format the text of your paper, including tables, figures, panels, and references, please see our [Formatting guidelines](#).

Red section (Articles)

Articles

- The *Lancet Infectious Diseases* prioritises reports of original research that are likely to change clinical practice or thinking about a disease
- We invite submission of all clinical trials, whether phase 1, 2, 3, or 4. For phase 1 trials, we especially encourage those of a novel substance for a novel indication, if there is a strong or unexpected beneficial or adverse response, or a novel mechanism of action
- We require the registration of all interventional trials, whether early or late phase, in a primary register that participates in WHO's [International Clinical Trial Registry Platform](#) (see *Lancet* 2007; 369: 1909–11). We also encourage full public disclosure of the minimum 20-item trial registration dataset at the time of registration and before recruitment of the first participant (see *Lancet* 2006; 367: 1631–35). The registry must be independent of for-profit interest
- Reports of trials must conform to [CONSORT 2010 guidelines](#) and should be submitted with their protocols
- All reports of randomised trials should include a section entitled Randomisation and masking, within the Methods section. Please refer to [The Lancet's formatting guidelines](#) for randomised trials
- Cluster-randomised trials must be reported according to [CONSORT extended guidelines](#)
- Randomised trials that report harms must be described according to [extended CONSORT guidelines](#)
- Studies of diagnostic accuracy must be reported according to [STARD guidelines](#)
- Observational studies (cohort, case-control, or cross-sectional designs) must be reported according to the [STROBE statement](#), and should be submitted with their protocols
- Studies of molecular epidemiology in infectious diseases must be reported according to the [STROME-ID statement](#) (see *Lancet Inf Dis* 2014; 14: 341–52)
- We encourage the registration of all observational studies on a WHO-compliant registry (see *Lancet* 2010; 375: 348)
- Genetic association studies must be reported according to [STREGA guidelines](#)
- Meta-analyses must be reported according to [PRISMA guidelines](#)
- To find reporting guidelines see: <http://www.equator-network.org>

All Articles should, as relevant:

- Be up to 3000 words (4500 for randomised controlled trials) with 30 references (the word count is for the manuscript text only)

- Include an abstract (semistructured summary), with five paragraphs (Background, Methods, Findings, Interpretation, and Funding), not exceeding 250 words. Our electronic submission system will ask you to copy and paste this section at the "Submit Abstract" stage
- For randomised trials, the abstract should adhere to CONSORT extensions: abstracts (see *Lancet* 2008; 371: 281–83)
- For intervention studies, the abstract should include the primary outcome expressed as the difference between groups with a confidence interval on that difference (absolute differences are more useful than relative ones). Important secondary outcomes can be included as long as they are clearly marked as secondary
- Use the SI system of units and the recommended international non-proprietary name (rINN) for drug names. Ensure that the dose, route, and frequency of administration of any drug you mention are correct
- Use gene names approved by the [Human Gene Organisation](#). Novel gene sequences should be deposited in a public database (GenBank, EMBL, or DDBJ), and the accession number provided. Authors of microarray papers should include in their submission the information recommended by the [MIAME guidelines](#). Authors should also submit their experimental details to one of the publicly available databases: [ArrayExpress](#) or [GEO](#)
- Include any necessary additional data as part of your EES submission
- All accepted Articles should include a link to the full study protocol published on the authors' institutional website (see *Lancet* 2009; 373: 992 and *Lancet* 2010; 375: 348)

[Human Gene Organisation
http://www.genenames.org](http://www.genenames.org)

[MIAME guidelines
http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_checklist.html](http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_checklist.html)

[CONSORT 2010 guidelines
http://www.consort-statement.org/consort-statement/overview/0/](http://www.consort-statement.org/consort-statement/overview/0/)

[WHO's International Clinical Trial Registry Platform
http://www.who.int/ictrp/network/trds/en/index.html](http://www.who.int/ictrp/network/trds/en/index.html)

[CONSORT extended guidelines
http://www.consort-statement.org/extensions/extensions/](http://www.consort-statement.org/extensions/extensions/)

[STARD guideline
http://www.stard-statement.org/](http://www.stard-statement.org/)

[STROBE statement
http://www.strobe-statement.org/](http://www.strobe-statement.org/)

[Array and GEO
http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/aer
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/aer)

[STREGA guidelines
http://www.medicine.uottawa.ca/public-health-genomics/web/eng/strega.html](http://www.medicine.uottawa.ca/public-health-genomics/web/eng/strega.html)

[PRISMA guidelines
http://www.prisma-statement.org/](http://www.prisma-statement.org/)

[To find reporting guidelines, see
http://www.equator-network.org](http://www.equator-network.org)

Putting research into context

- From Jan 1, 2015, all research papers submitted to any journal in *The Lancet* family must include a panel putting their research into context with previous work, with an enhanced structure and subheadings compared with papers submitted before this date (see *Lancet* 2014; 384: 2176–77, and panel below for guidance). This panel should not contain references. Editors will

Research in context

Evidence before this study

This section should include a description of all the evidence that the authors considered before undertaking this study. Authors should briefly state: the sources (databases, journal or book reference lists, etc) searched; the criteria used to include or exclude studies (including the exact start and end dates of the search), which should not be limited to English language publications; the search terms used; the quality (risk of bias) of that evidence; and the pooled estimate derived from meta-analysis of the evidence, if appropriate.

Added value of this study

Authors should describe here how their findings add value to the existing evidence.

Implications of all the available evidence

Authors should state the implications for practice or policy and future research of their study combined with existing evidence.

Research in context panels should not contain references; key studies mentioned here should be referenced in the main text.

Information for Authors

use this information at the first assessment stage and peer reviewers will be specifically asked to check the content and accuracy

- The Discussion section should contain a full description and discussion of the context. Authors are also invited to either report their own, up-to-date systematic review or cite a recent systematic review of other trials, putting their trial into context of the review

Blue section (Comment, Correspondence, Newsdesk, Media Watch, etc)

Editorial

- Editorials are the voice of *The Lancet Infectious Diseases*, and are written in-house by the journal's editorial-writing team and signed "The Lancet Infectious Diseases"

Comment

- Commentaries may discuss articles in *The Lancet Infectious Diseases* or in other journals
- Commentaries should be about 700 words and 12 references
- The place to respond to something we have published is in our Correspondence section
- See [Conflicts of Interest](#) guidelines

Correspondence

- Letters should be written in response to previous content published in *The Lancet Infectious Diseases*
- Letters for publication in the print journal must reach us within 6 weeks of publication of the original item and should be no longer than 400 words
- Only one table or figure is permitted, and there should be no more than five references and five authors
- All accepted letters are edited, and proofs will be sent out to authors before publication

Newsdesk

- Most of the writers of Newsdesk articles are professional journalists, but an important event in your country that might be of wider interest can be brought to the attention of our Newsdesk editors via IDeditorial@lancet.com

Media Watch

- Readers with an interest in contributing book, film, TV, or web reviews should contact the Editor via IDeditorial@lancet.com. In general, these submissions should be between 350 and 400 words

Corrections

- Any substantial error in any article published in *The Lancet Infectious Diseases* should be corrected as soon as possible. Blame is not apportioned; the important thing is to set the record straight
- *The Lancet* journals have a [policy](#) for types of errors that we do and do not correct. We will always correct any error affecting a non-proprietary drug name, dose, or unit, any numerical error in the results, or any factual error in interpretation of results

For *The Lancet* journals' policy on correction of errors see <http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/correction-policy.pdf>

Green section (Reviews, Historical Reviews, Personal Views, Grand Rounds, Clinical Pictures, etc)

From July 1, 2015, papers submitted for the Green section of the journal will be eligible only for online publication, with the exception of Clinical Pictures (see *Lancet Inf Dis* 2015; 15:760)

Reviews

- Reviews may be commissioned or submitted unsolicited, although in the latter case it would be wise to send the Editor a one page outline first (IDeditorial@lancet.com) to ensure that a review on the same subject has not already been commissioned. If you have already written the paper, please submit it for consideration via our online system
- Complete transparency about the choice of material included is important to any Review paper. Therefore, all Reviews should include a brief section entitled "Search strategy and selection criteria" stating the sources (including databases, MeSH and free text search terms and filters, and reference lists from journals or books) of the material covered, and the criteria used to include or exclude studies. Citations to papers published in non-peer-reviewed supplements are discouraged. Since these papers should be comprehensive, we encourage citation of publications in non-English languages. An example is shown below:

Search strategy and selection criteria

References for this review were identified through searches of PubMed for articles published from January, 1971, to June, 2010, by use of the terms "Guillain-Barré syndrome", "influenza", "H1N1", "immunization", and "vaccination". Relevant articles published between 1918 and 1920 were identified through searches in the authors' personal files, in Google Scholar, and Springer Online Archives Collection. Articles resulting from these searches and relevant references cited in those articles were reviewed. Articles published in English, French, and German were included.

- Systematic reviews that do not include meta-analysis will be considered under the Review heading and must be reported according to the [PRISMA](#) guidelines
- Reviews should be 3000–5000 words, with a maximum of 150 references. A 150-word unstructured summary should be included. These papers should include about five illustrations to aid the reader

Historical Reviews

- These should follow the same rules and guidelines as for Reviews, but should cover the chronological developments in an important or interesting area of infectious diseases

Personal Views

- These should be around 1500–3000 words in length, with a maximum of 75 references
- These opinion pieces are thought provoking essays on an infection-related subject and must be prepared in a similar way to a Review article
- Unsolicited contributions are welcome, but it is best to contact

the Editor (IDeditorial@lancet.com) before submission to ensure that the proposed topic is suitable for the journal

Grand Rounds

- These use a brief case report as the starting point for a review of the patient's diagnosis. Rather than rarity, we are looking for single cases that address common problems and evidence-based review of the implications of the case
- The case report part of the text should be no longer than 800 words and the review part no longer than 3000. Up to 75 references are allowed
- Consent for publication in print and electronically must be obtained from the patient or, if this is not possible, the next of kin before submission. See [Patient and other consents](#)

Clinical Pictures

- The ideal Clinical Picture provides visual information that will be useful to other clinicians
- Clinical Pictures should be interesting, educational, and respectful of the patient. *The Lancet Infectious Diseases* is less interested in pictures that simply illustrate an extreme example of a medical condition
- Authors must obtain signed informed consent for publication (see [Patient and other consents](#)). Do not use "blackout" bars or similar devices to anonymise patients: if you have taken consent appropriately, masking is not necessary
- Use no more than 300 words, with no references

Formatting guidelines

Language

- Manuscripts should be submitted in English. Authors writing in Chinese, Portuguese, or Spanish may wish to use the Webshop (<http://webshop.elsevier.com/languageservices>) to provide an English translation of their manuscript for submission

Title page

- A brief title, author name(s), preferred degree (one only), affiliation(s), and full address(es) of the authors must be included. The name and address of the corresponding author should be separately and clearly indicated with email and telephone details

Formatting of text

- Type a single space at the end of each sentence
- Do not use bold face for emphasis within text
- We use a comma before the final "and" or "or" in a list of items
- Type decimal points midline (ie, 23.4, not 23.4). To create a midline decimal on a PC: hold down ALT key and type 0183 on the number pad, or on a Mac: ALT shift 9
- Numbers one to ten are written out in words unless they are used as a unit of measurement, except in figures and tables
- Use single hard-returns to separate paragraphs. Do not use tabs or indents to start a paragraph
- Do not use the automated features of your software, such as hyphenation, endnotes, headers, or footers (especially for references). You can use page numbering

References

- Cite references in the text sequentially in the Vancouver numbering style, as a superscripted number after any punctuation mark. For example:
"...as reported by Saito and colleagues.¹⁵"
- Two references are cited separated by a comma, with no space. Three or more consecutive references are given as a range with an en rule. To create an en rule on a PC: hold down CTRL key and minus sign on the number pad, or on a Mac: ALT hyphen
- References in tables, figures, and panels should be in numerical order according to where the item is cited in the text
- Here is an example for a journal reference (note the use of tab, bold, italic, and the en rule or "long" hyphen):
"...15[tab]Saito N, Ebara S, Ohotsuka K, Kumeta J, Takaoka K. Natural history of scoliosis in spastic cerebral palsy. *Lancet* 1998; 351: 1687-[en rule]92."
- Give any subpart to the title of the article. Journal names are abbreviated in their standard form as in [Index Medicus](#)
- If there are six authors or fewer, give all six in the form:
surname space initials comma
- If there are seven or more give the first three in the same way, followed by et al
- For a book, give any editors and the publisher, the city of publication, and year of publication
- For a chapter or section of a book, also give the authors and title of the section, and the page numbers
- For online material, please cite the URL, together with the date you accessed the website
- Online journal articles can be cited using the DOI number
- Do not put references in the Summary

[Index Medicus
http://www.nlm.nih.gov/](http://www.nlm.nih.gov/)

Formatting guidelines for revised manuscripts

Guidelines on format for text and figures can be found at <http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/artwork-guidelines.pdf>

Guidelines for web extra material

All material should be submitted as one PDF (with numbered pages) with the paper and will be peer reviewed. Material will be published at the discretion of *The Lancet* journals' editors. All material should be provided in English.

[Formatting guidelines for randomised trials
http://www.thelancet.com/pb/assets/raw/Lancet/authors/Rctguidelines.pdf](http://www.thelancet.com/pb/assets/raw/Lancet/authors/Rctguidelines.pdf)

Text

- Main heading for the web extra material should be in 12 point Times New Roman font **BOLD**
- Text should be in 10 point Times New Roman font, single spaced
- Headings should be in 10 point **BOLD**

Tables

- Main table heading should be in 10 point Times New Roman font **BOLD**
- Legends should be in 10 point, single spaced
- Tables should be in 8 point Times New Roman font, single spaced
- Headings within tables should be in 8 point **BOLD**

Data

- SI units are required
- Numbers in text and tables should always be provided if % is shown
- Means should be accompanied by SDs, and medians by IQR
- Exact p values should be provided, unless $p < 0.0001$

Information for Authors

Drug names

- Recommended international non-proprietary name (rINN) is required

References

- Vancouver style—eg,
 - Smith A, Jones B, Clements S. Clinical transplantation of tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; **372**: 1201–09.
 - Hourigan P. Ankle injuries. In: Chan D, ed. *Sports medicine*. London: Elsevier, 2008: 230–47.
- Numbered in order of mention in Webappendix and numbered separately from references in the full paper

Figures

- All images must have a minimum resolution of 300 dpi, width 107 mm
- Main figure heading should be in 10 point Times New Roman font **BOLD**
- Legends should be in 10 point, single spaced

Audio/video material

- The paper to which the audio or video clip relates should be mentioned in the recording
- Audio clip and video files should be accompanied with brief text explaining the content of the audio, names of interviewers/interviewees, date of recording, and place of recording if relevant
- Written consent from all parties must be supplied at submission

Audio

- Audio material submitted as an mp3 file, no larger than 50 Mb
- Your paper may be selected for a podcast. If so, the Web Editor will contact you to arrange a pre-recorded interview to discuss your paper. For more information, see [Audio](#)

Video

- Video material should preferably be submitted in .mpg (or .mov, .avi, or .gif) format with aspect ratio of 16:9, no larger than 50 Mb
- We welcome your videos and invite you to submit any video material (reports, interviews, scans, imaging) for consideration in the online journal. Please ensure that all those featured in the video have given permission for publication (see also the above section on [Patient and other consents](#))
- All video files can be submitted alongside your article in EES

Disclosure of results before publication

- Presentation of data at a scientific meeting, as a poster, abstract, orally, on a CD, or as an abstract on the web does not conflict with submission to *The Lancet Infectious Diseases*
- As a member journal of the International Committee for Medical Journal Editors, *The Lancet Infectious Diseases* does not regard results that are posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides as prior publication, if the results are presented in the form of a brief structured abstract or table

(<500 words; see *Lancet* 2007; **369**: 1909–11). However, presentation of results in other circumstances (eg, investors' meetings) is discouraged and could jeopardise consideration of the manuscript

Fast-track publication

- All Articles judged eligible for consideration by the journal's staff will be peer-reviewed within 72 h and, if accepted, published in 4–8 weeks
- All accepted Articles will be published online (Online First Publication) before appearing in the print journal
- The online article does not differ from the version subsequently published in print and is citable by the digital object identifier (DOI) assigned at the time of online publication
- All other manuscripts will be peer-reviewed via our standard process
- See [Articles](#) section for manuscript requirements

Online First publication

- *The Lancet Infectious Diseases* increasingly publishes articles online ahead of print publication. You will be informed at least a week in advance of the Online First publication date
- The online article is identical to the version subsequently published in the print journal, and is citable by the digital object identifier (DOI) assigned at the time of online publication

How *The Lancet Infectious Diseases* handles your paper

Acknowledgment

- Receipt of your paper will be acknowledged by an email containing a reference number, which should be used in all future communications

Checking for plagiarism, duplicate publication, and text recycling

- All Reviews, Personal Views, and similar non-research material that we are interested in publishing will be checked by editors using CrossCheck (see *Lancet* 2011; **377**: 281–82). We expect that such papers are written in a way that offers new thinking without recycling previously published text

Peer review

- Every Article, Review, Historical Review, Personal View, or Grand Round published in *The Lancet Infectious Diseases* has been peer reviewed. Occasional contributions (eg, commentaries) are accepted without peer review
- On submission to *The Lancet Infectious Diseases*, your report will first be read by one or more of the journal's staff of physicians and scientists. This is an important feature of our selection process that many papers are turned away on the basis of in-house assessment alone. That decision will be communicated quickly
- Research papers and most other types of paper that receive positive in-house reviews are followed by peer review by at least three reviewers. You will receive notification of which editor is handling the peer review of your paper

Audio
<http://www.thelancet.com/audio>

Decision

- Submissions that survive in-house and peer review might be referred back to authors for revision. This is an invitation to present the best possible paper for further scrutiny by the journal; it is not an acceptance
- Authors should give priority to such revisions; the journal will reciprocate by making a final decision quickly
- Two copies of the revised version should be sent back, one of which should be highlighted to show where changes have been made. Detailed responses to reviewers' comments, in a covering letter, are also necessary

The Lancet journals and other Elsevier journals

- If your paper is rejected by *The Lancet Infectious Diseases*, we might judge it suitable to pass to other editors in the Lancet-group for consideration, or to editors of other relevant journals within Elsevier's portfolio

Appeals

- Sometimes editors make mistakes. When we do, we like to hear about them. If an author believes that an editor has made an error in declining a paper, we welcome an appeal. In your appeal letter, which should be sent to IDeditorial@lancet.com, please state why you think the decision is mistaken, and set out your specific responses to any peer reviewers' comments if those seem to have been the main cause of rejection
- At least two editors will decide whether to invite a revised manuscript and whether re-review, or otherwise is indicated

Proofs

- The Lancet journals employ highly skilled Assistant Editors, and it is likely that your paper will be substantially edited after acceptance to ensure that it is accurate, clear, and understandable to a wide readership
- All figures will be redrawn into *The Lancet Infectious Diseases* style by our in-house illustrators
- You will receive a proof from an Assistant Editor. That proof should be corrected and returned within 48 h

Editorial research

- We are keen to better understand and improve editorial conduct, decision making, and issues related to peer review. Therefore, we occasionally take part in or conduct editorial research. Your submitted paper might be used in such research. If you do not want your paper entered into such a study, please let us know in your covering letter. Your decision to take part or not will have no effect on the editorial decision on your paper

Open access and funding

Open access

- The Lancet journals are committed to support authors in making their research publicly and freely available. The editors encourage all authors to post a Word version of their peer-reviewed, accepted article on their personal or institutional websites any time after publication in print or online. Your document should indicate the article's citation and a link to the published article on *The Lancet* website

- For authors of research articles funded by Arthritis Research UK, Austrian Science Fund, British Heart Foundation, Cancer Research UK, UK Chief Scientist Office, UK Department of Health UK, UK Department of International Development (DFID), Dunhill Medical Trust, Motor Neuron Disease Association, Parkinson's UK, one of the UK Research Councils, Telethon Italy, or Wellcome Trust, and, for submissions from Jan 1, 2016, WHO (including International Agency for Research on Cancer (IARC)) or the Bill & Melinda Gates Foundation, we offer either a "gold" open access choice with a creative commons licence after payment of an article processing charge of US\$5000, or a "green" open access solution—where authors can deposit the final accepted version of their paper in any repository they choose 6 months after publication. In addition, for authors who choose the green open access solution, we will also make the published paper free to access on our websites 6 months after publication. For the gold open access solution we offer a choice of creative commons licences (CC BY or CC BY-NC-ND). See below for copyright and reuse information
- These options apply only to research papers submitted for publication in *The Lancet* journals after April 1, 2013. They will not be applied retrospectively

Authors funded by NIH

- Authors funded by the National Institutes of Health (NIH) can comply with the NIH's public-access policy via the Journal Publishing Agreement (copyright transfer form), which is sent to the corresponding author of accepted Articles. All Howard Hughes Medical Institute scientists who are authors of accepted Articles can also have their accepted manuscripts deposited in PubMed Central if they complete the relevant section of the Journal Publishing Agreement

Click [here](#) for Elsevier's agreements with funding bodies.

What happens after publication?

Press release

Press releases are issued by *The Lancet* journals' press office for selected content published in our journals. You will be advised in advance if your paper has been selected for press release. *The Lancet* journals' media relations team will contact you with detailed instructions about the embargo for your paper, and will provide a draft press release for your comments ahead of the publication date. If your institution would like to issue a press release for your paper, please inform pressoffice@lancet.com.

Author interview

Your paper may be selected for a podcast. If so, the Web Editor will contact you to arrange a pre-recorded interview to discuss your paper. For more information, see [Audio](#)

Offprints and Reprints

100 offprints of Articles and Meta-analyses are dispatched free of charge. All requests for reprints should be addressed to the Reprints Department in the London office: tel: +44 [0]20 7424 4221, email e.steel@elsevier.com

Data storage

Authors may be required to provide the raw data for research papers

Press release

For further details on *The Lancet*'s press release see <http://www.thelancet.com/press-room>

Audio

<http://www.thelancet.com/audio>

Information for Authors

when they are under review and up to 10 years after publication in *The Lancet Infectious Diseases*.

Copyright and reuse

- Authors will be asked to sign a transfer of copyright agreement, which recognises the common interest that both journal and author(s) have in the protection of copyright. We accept that some authors (eg. government employees in some countries) are unable to transfer copyright. However, such policies do not provide anyone other than *The Lancet* journals the right to make in any form facsimile copies of the version printed
- Gold open access articles are published under Creative Commons licensing, which enables authors to retain copyright while allowing others to copy, distribute, and make some uses of their work, provided full credit is given to them as originators. Authors will be offered a choice of two licences (CC BY or CC BY-NC-ND) depending on whether or not they wish to allow commercial reuse of their work and whether or

not they wish to allow others to alter their work in the course of its reuse. Authors will be asked to sign an exclusive licence (or non-exclusive licence for government employees) to permit our publisher, Elsevier, to publish the work

- For Creative Commons licensing see <http://creativecommons.org/licenses/>
- All requests to reproduce or make available anything in the journal—in whole or in part, in electronic or in any other form, including translation—should be made through our Rightslink Service. For more information, please visit <http://www.elsevier.com/authors/obtaining-permission-to-re-use-elsevier-material>
- Authors may wish to visit our Permission-Seeking FAQ available at <http://www.elsevier.com/authors/permission-seeking-guidelines-for-elsevier-authors>
- For general permissions queries, please contact Elsevier's Permissions Helpdesk at Tel: +1-800-523-4069 extension 3808 or permissionshelpdesk@elsevier.com

Rightslink Service
<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/permissionsguide>