

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Maitê Marques da Silva

**Detecção de vírus respiratórios por
PCR em tempo real em crianças com
otite média aguda recorrente**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2019**

Maitê Marques da Silva

**Detecção de vírus respiratórios por
PCR em tempo real em crianças com
otite média aguda recorrente**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Vlademir Vicente Cantarelli

Co-orientador: Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

**Porto Alegre
2019**

Catálogo na Publicação

Silva, Maitê Marques da
Detecção de vírus respiratórios por PCR em tempo real
em crianças com otite média aguda recorrente / Maitê
Marques da Silva. -- 2019.

86 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Orientador(a): Prof. Dr. Vlademir Vicente Cantarelli ;
coorientador(a): Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias.

1. Otite média aguda recorrente. 2. Vírus
respiratórios. 3. PCR em tempo real. 4. Fluido de orelha
média. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que participaram de alguma forma do meu mestrado, pois sem a ajuda e o apoio destas importantes pessoas, a realização deste sonho não seria possível! Assim sendo, meus sinceros agradecimentos...

À Deus, por me dar condições de lutar e alcançar meus objetivos, conforme meus merecimentos.

Aos meus amados pais, Sérgio e Margarete, e a minha querida irmã Maiara, pela incansável disposição em me apoiarem nesta trajetória. Obrigada por serem meu porto seguro e ao mesmo tempo por serem os maiores incentivadores da minha evolução pessoal e profissional. Amo vocês!

Ao meu namorado Michel, que sempre esteve ao meu lado e compartilhou comigo todos os sentimentos deste percurso. Obrigada por toda compreensão, paciência, parceria, ajuda e estímulos para alcançar meu objetivo. Te amo!

Ao meu orientador, Vlademir Vicente Cantarelli e meu co-orientador, Cícero Armídio Gomes Dias, por terem acreditado em mim. Obrigada pela confiança depositada, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência e serenidade mantidas e principalmente por serem meus exemplos neste trajeto acadêmico.

A Denise Rotta Ruttkay Pereira, por ter compartilhado as amostras do seu estudo comigo, para que o meu trabalho se tornasse possível. Obrigada por ser sempre prestativa aos meus pedidos de ajuda.

As minhas amigas kauana Pizzutti e Juliana Comerlato, que foram essenciais no desenvolvimento do meu mestrado. Obrigada meninas por sempre estarem disponíveis pra me orientar e auxiliar na conquista deste meu objetivo.

A todos os amigos que conquistei na UFCSPA durante o mestrado, e que compartilharam comigo os prazeres e dificuldades desta jornada. Obrigada pela parceria, pela troca de conhecimentos e experiências, pelas ajudas e principalmente pelas risadas.

Aos meus colegas e amigos de trabalho, do Hemocentro Regional de Caxias do Sul, pela compreensão das minhas ausências no trabalho e pelo forte apoio e incentivo na realização deste sonho.

*Você nunca sabe que resultados virão da sua ação...
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

A otite média aguda (OMA) se define pela presença de secreção no ouvido médio com o rápido aparecimento de sinais e sintomas inflamatórios do mesmo. Na ocorrência de três episódios de OMA em seis meses ou quatro episódios em um ano, se caracteriza OMA recorrente (OMAR).

A OMA é uma das doenças mais diagnosticadas e prevalentes em crianças do mundo todo, sendo considerada a principal causa de consultas médicas, prescrição de antibióticos e cirurgias na prática pediátrica, constituindo um problema de saúde mundial na infância.

Esta patologia é multifatorial, com diversos fatores de risco, tanto genéticos e imunológicos, associados ao hospedeiro, quanto ambientais e microbiológicos. Mas apesar de ser multifatorial, a OMA é principalmente uma doença infecciosa, com etiologia viral ou bacteriana, ou ambas.

A OMA é normalmente considerada uma infecção bacteriana, sendo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* e *Moraxella catarrhalis* os principais patógenos bacterianos envolvidos nesta patologia. Entretanto, a maioria dos casos de OMA ocorre concomitantemente ou logo após uma infecção viral do trato respiratório superior. Os vírus respiratórios (VRs) são os responsáveis por uma cascata de eventos que levam ao desenvolvimento da OMA, e inclusive, aumentam o risco de infecção bacteriana. Assim sendo, os VRs podem ser identificados como os únicos agentes causadores de OMA ou como co-patógenos, juntamente com patógenos bacterianos.

Cientes disto, o objetivo deste estudo foi pesquisar a prevalência de VRs em amostras de fluídos de ouvido médio de crianças com OMAR, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real).

A população do estudo consistiu em 107 crianças que apresentavam diagnóstico médico de OMAR, com indicação de procedimento cirúrgico, no período de julho de 2016 a outubro de 2017. Das 107 crianças, com OMA uni ou bilateral, foram obtidas 204 amostras de fluído de ouvido médio, que foram coletadas por otorrinolaringologistas através de timpanocentese e analisadas no Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Para as 204 amostras de fluído de ouvido médio foram realizados PCR em tempo real para os seguintes VRs: vírus influenza A (FluV A) e B (FluV B), vírus sincicial respiratório (RSV), vírus parainfluenza 1 (PIV 1), 2 (PIV 2) e 3 (PIV 3), rinovírus humano (hRNV), metapneumovírus humano (hMPV), adenovírus (AdV) e bocavírus humano (hBoV).

Do total de 107 crianças, 29 (27,1%) tiveram amostras de fluído de ouvido médio positivas para detecção dos VRs analisados, uni ou bilateralmente. Os VRs detectados nas amostras destas crianças foram hBoV, hRNV, AdV, PIV 1 e PIV 3, os demais VRs não foram detectados.

Palavras-chave: Otite média aguda (recorrente); Fluído de ouvido médio; Vírus respiratórios; PCR em tempo real.

ABSTRACT

The acute otitis media (AOM) is defined by the presence of middle ear fluid with rapid appearance of signs and inflammatory symptoms. Occurring three AOM episodes within six months or four episodes within one year, it characterizes recurrent AOM (RAOM).

AOM is one of the most diagnosed and prevalent diseases in children worldwide, being considered the main cause of medical visits, antibiotics prescription and surgeries in pediatric practice, constituting a global health problem in childhood.

This pathology is multifactorial, with several risk factors, both genetic and immunological associated with the host, as well as environmental and microbiological ones. But despite being multifactorial, AOM is mainly an infectious disease, with viral or bacterial etiology, or both.

AOM is normally considered a bacterial infection, being *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* and *Moraxella catarrhalis* the main bacterial pathogens involved in this pathology. However, most cases of AOM occur concurrently or right after a viral infection of the upper respiratory tract. Respiratory viruses (RVs) are responsible for a cascade of events that lead to the development of AOM, and even increase the risk of bacterial infection. Thus, RVs can be identified as the sole causative agents of AOM or as co-pathogens, along with bacterial pathogens.

Aware of this, the aim of this study was to investigate the prevalence of RVs in samples of middle ear fluids of children with RAOM, by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).

The study population consisted of 107 children who presented medical diagnosis of RAOM, with indication of surgical procedure, from July 2016 to October 2017. Of the 107 children with unilateral or bilateral AOM, 204 samples of middle ear fluid were collected by otolaryngologists through tympanocentesis and analyzed at the Laboratory of Molecular Microbiology of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA).

For the 204 middle ear fluid samples, real-time PCR were performed for the following RVs: influenza A (FluV A) and B (FluV B) viruses, respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza virus 1 (PIV 1), 2 (PIV 2) and 3 (PIV 3), human rhinovirus

(hRNV), human metapneumovirus (hMPV), adenovirus (AdV) and human bocavirus (hBoV).

From the total of 107 children, 29 (27.1%) had positive middle ear fluid samples for the detection of the RVs analyzed uni or bilaterally. The RVs detected in the samples of these children were hBoV, hRNV, AdV, PIV 1 and PIV 3, the other RVs were not detected.

Keywords: Acute otitis media (recurrent); Middle ear fluid; Respiratory viruses; Real-time PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Anatomia do ouvido.....	15
Figura 2	Membrana timpânica: normal e em caso de OMA.....	23
Figura 3	Miringotomia com colocação de tubo de ventilação.....	30
Figura 4	Representação da estrutura da partícula do FluV.....	32
Figura 5	Representação da estrutura da partícula do RSV.....	34
Figura 6	Representação da estrutura da partícula do hMPV.....	36
Figura 7	Representação da estrutura da partícula do PIV.....	37
Figura 8	Representação da estrutura da partícula do hRNV.....	38
Figura 9	Representação da estrutura da partícula do AdV.....	39
Figura 10	Representação da estrutura da partícula do hBoV.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Pediatria
AdV	<i>Adenovirus</i> / Adenovírus
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico complementar
CT	<i>Cycle threshold</i> / Ciclo de ultrapassagem da fluorescência
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
DNAfd	Ácido desoxirribonucleico de fita dupla
DNAfs	Ácido desoxirribonucleico de fita simples
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> / Desoxinucleotídeo trifosfato
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
FluV	<i>Influenza virus</i> / Vírus influenza
FluV A	<i>Influenza A virus</i> / Vírus influenza A
FluV B	<i>Influenza B virus</i> / Vírus influenza B
FluV C	<i>Influenza C virus</i> / Vírus influenza C
HA	Hemaglutinina
hBoV	<i>Human bocavirus</i> / Bocavírus humano
hMPV	<i>Human metapneumovirus</i> / Metapneumovírus humano
hRNV	<i>Human rhinovirus</i> / Rinovírus humano
IRA	Infecção respiratória aguda
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IVAS	Infecção das vias aéreas superiores
Kb	Kilobases
NA	Neuraminidase
nm	Nanômetro
OM	Otite média
OMA	Otite média aguda
OMAR	Otite média aguda recorrente
OMC	Otite média crônica
OME	Otite média com efusão
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> / Reação em cadeia da polimerase

PCV	<i>Pneumococcal conjugate vaccine</i> / Vacina conjugada pneumocócica
PIV	<i>Parainfluenza virus</i> / Vírus parainfluenza
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> / Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido ribonucleico
RNAfs	Ácido ribonucleico de fita simples
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i> / Vírus sincicial respiratório
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase - polymerase chain reaction</i> / Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase
SG	Síndrome gripal
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
SUS	Sistema Único de Saúde
VR	Vírus respiratório

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1 Otite média (OM).....	16
1.2 Otite média aguda (OMA)	17
1.2.1 Epidemiologia.....	18
1.2.2 Fatores de risco	19
1.2.3 Manifestações clínicas	22
1.2.4 Diagnóstico clínico	22
1.2.5 Diagnóstico microbiológico	23
1.2.6 Prevenção e tratamento	25
1.2.6.1 Vacinas	25
1.2.6.2 Terapia antimicrobiana	27
1.2.6.3 Procedimento cirúrgico.....	29
1.3 Vírus na otite média aguda	30
1.3.1 Vírus respiratórios (VRs).....	31
1.3.1.1 Vírus Influenza (FluV)	32
1.3.1.2 Vírus Sincicial Respiratório (RSV).....	34
1.3.1.3 Metapneumovírus Humano (hMPV).....	35
1.3.1.4 Vírus Parainfluenza (PIV).....	36
1.3.1.5 Rinovírus Humano (hRV).....	38
1.3.1.6 Adenovírus (AdV).....	39
1.3.1.7 Bocavírus Humano (hBoV)	40
1.3.2 Mecanismos de ação dos vírus respiratórios na otite média aguda	41
1.3.3 Diagnóstico laboratorial dos vírus respiratórios	42
1.3.4 Diagnóstico molecular dos vírus respiratórios.....	44
1.3.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	44
1.3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (<i>Real Time PCR</i>)	45
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	54
4.1 Manuscrito	54

5 CONCLUSÕES	69
ANEXO A – Parecer de aprovação do CEP da UFCSPA	70
ANEXO B – Normas da revista para submissão do artigo científico.....	74

1 REVISÃO DA LITERATURA

O ouvido é um órgão muito complexo, anatomicamente e funcionalmente. Anatomicamente, o ouvido é dividido em três maiores partes: ouvido externo, ouvido médio e ouvido interno (figura 1) (ALBERNAZ et al., 1997). E funcionalmente, o ouvido tem duas funções fundamentais à vida, a função do sentido da audição e a função na manutenção do equilíbrio (PILTCHER et al., 2015). No contexto desta pesquisa, será enfatizado o ouvido médio.

O ouvido médio funciona como um transmissor/ transformador de impulsos, de um meio gasoso para um meio líquido, isto é, do ar circulante para a perilinfa do ouvido interno. No ouvido interno é onde se encontram as células sensoriais específicas para função auditiva e também para a função de equilíbrio. E é no ouvido externo que os impulsos são captados e conduzidos até o ouvido médio (ALBERNAZ et al., 1997).

Quanto a sua anatomia, o ouvido médio é constituído pela cavidade timpânica ou caixa do tímpano, pela cadeia de ossículos: martelo, bigorna e estribo, que são conectados por articulações, ligamentos, pregas e músculos distribuídos entre os ossículos, pela tuba auditiva ou trompa de Eustáquio, e pelas células da mastoide (ALBERNAZ et al., 1997).

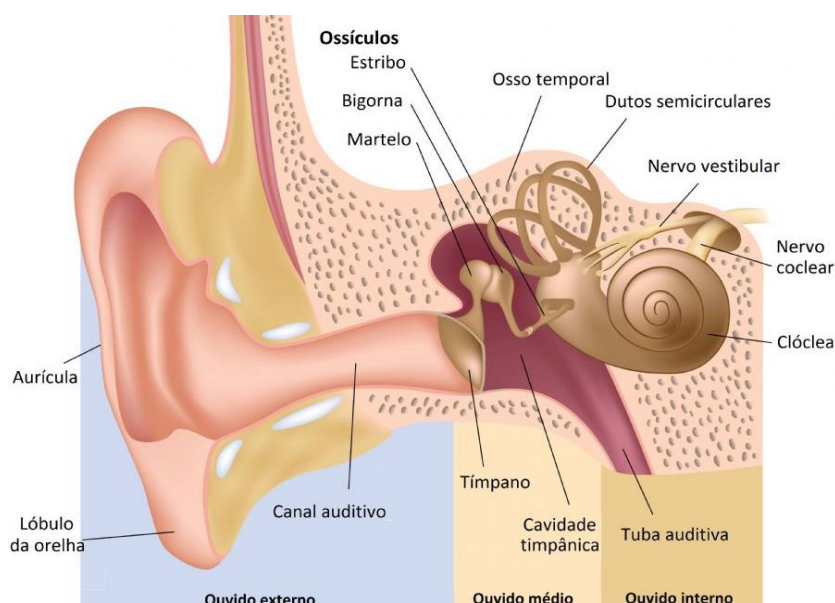


Figura 1: Anatomia do ouvido.

Fonte: Figura adaptada de <http://www.argosy.com.br/noticias-detalhes.asp?id=89>, acesso em 25/05/2019.

As cavidades do ouvido médio são revestidas por mucosa respiratória em quase toda sua totalidade, com a presença de muco e cílios. Para o funcionamento normal do ouvido médio é necessário uma boa ação mucociliar, com a existência de ar nas cavidades, cílios móveis e muco com características reológicas compatíveis com a função (SAFFER; MOCELLIN, 1989).

Com a membrana timpânica íntegra, a única comunicação do ouvido médio com o exterior é pela tuba auditiva (SAFFER; MOCELLIN, 1989). É através da tuba auditiva que o ar penetra no ouvido médio e faz com que a pressão atmosférica seja igual dos dois lados da membrana timpânica (ALBERNAZ et al., 1997).

A tuba auditiva tem esta função de transporte de ar da nasofaringe para o ouvido médio e também a função de drenagem das secreções do ouvido para nasofaringe. Porém, normalmente, as patologias do ouvido médio estão relacionadas com disfunções da tuba auditiva (SAFFER; MOCELLIN, 1989).

Quando há disfunção da tuba auditiva, ocorre a formação de uma pressão negativa no ouvido médio que provoca a sucção de secreções da nasofaringe para dentro do ouvido médio (SHAWABKEH et al., 2017). Estas secreções se acumulam no ouvido médio, aumentam a pressão no local e originam o aparecimento de sintomas inflamatórios (NOKSO-KOIVISTO et al., 2016). Além disso, estas secreções podem estar infectadas por bactérias e vírus que colonizam a nasofaringe (MARTINES et al., 2016).

Infelizmente, o funcionamento da tuba auditiva é um mecanismo vulnerável em adultos, e mais ainda em crianças. Nas crianças, a tuba auditiva é menos desenvolvida, mais curta, horizontalizada e susceptível a frequentes infecções das vias aéreas superiores. Estes fatores desfavoráveis resultam em altas prevalências de otite média (OM) (PILTCHER et al., 2015).

1.1 Otite média (OM)

A OM é definida como o processo inflamatório do ouvido médio (ROCHA; PEDROSO, 2009), frequentemente relacionado com aumento de fluído, infectado ou não, no ouvido médio (BORGES et al., 2016). A inflamação do ouvido médio não necessariamente tem origem infecciosa (SAFFER; MOCELLIN, 1989), mas geralmente tem etiologia viral, bacteriana (SIH, 2001), ou ambas.

As OMs podem ser divididas em subcategorias, sendo estas: OM aguda (OMA), OMA recorrente (OMAR), OM com efusão (OME) e OM crônica (OMC) (DEANTONIO et al., 2016). Juntas, as subcategorias citadas geram a mesma patologia, sendo cada uma responsável por diferentes fases da doença (ROCHA; PEDROSO, 2009). Como em qualquer processo inflamatório, as alterações observadas na OM progridem através de estágios agudos e subagudos para estágios crônicos (SIH, 2001).

1.2 Otite média aguda (OMA)

A OMA consiste na presença de secreção no ouvido médio, com rápido desenvolvimento de sinais e sintomas inflamatórios (DOWELL et al., 1998).

Normalmente, a OMA apresenta três fases, uma fase inicial de curta duração, com rápida evolução dos sintomas, seguida de uma fase de expressão total do quadro clínico e uma terceira fase, de resolução da inflamação (SAFFER; MOCELLIN, 1989).

Quando há a ocorrência de três episódios de OMA em seis meses ou quatro episódios de OMA em um ano, se caracteriza como OMAR (DOWELL et al., 1998). Nestes casos há a normalização total do ouvido médio nos intervalos entre as crises (NETO; HEMB; SILVA, 2006).

A recorrência dos casos de OM pode estar relacionada com a idade da primeira ocorrência, sendo que quanto mais cedo, principalmente antes dos seis meses, aumenta consideravelmente as chances de novos episódios durante a infância (PILTCHER et al., 2015). E a associação de fatores de risco para OMA também estão relacionados com uma maior incidência de recorrência das crises (SIH, 2001).

As OMARs se tornam um problema para o paciente, para a família e para o médico. O paciente sofre com o desconforto dos sintomas, a família sofre com a ansiedade e preocupação com o desfecho da doença, com os gastos com o tratamento e com tempo disponibilizado com os atendimentos médicos, e o médico sofre com o anseio de realizar o diagnóstico e tratamento corretos, evitando a possibilidade de complicações (SIH, 2001).

1.2.1 Epidemiologia

A OMA é uma das doenças infecciosas mais diagnosticadas e prevalentes em crianças no mundo todo (AMORIM et al., 2004), sendo considerada a principal causa de consultas médicas, prescrição de antibióticos e cirurgias na prática pediátrica (CHONMAITREE et al., 2016).

As infecções do ouvido médio são mais frequentes entre os lactentes e crianças pequenas, menos comum em crianças maiores e adolescentes e, embora possa acometer adultos, é infrequente nesta fase (PEREIRA; RAMOS, 1998).

O primeiro pico de prevalência de OMA ocorre entre os seis e trinta e seis meses de idade (AMORIM et al., 2004; COSTA et al., 2011), com maior incidência entre os seis e doze meses (OYAMADA et al., 2014; WU et al., 2018), e um segundo pico ocorre dos quatro aos sete anos. Após os sete anos, a prevalência decresce significativamente (AMORIM et al., 2004; COSTA et al., 2011).

Mais de oitenta por cento das crianças apresentam pelo menos um episódio de OMA até seu terceiro aniversário (PENIDO et al., 2016; RUOHOLA et al., 2013; THOMAS et al., 2014).

As OMs, de um modo geral, são um problema mundial de saúde na infância. Além de causar angústia para a criança e família, é também um fardo econômico para o sistema de saúde e para sociedade (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003). Além disso, é responsável por uma grande maioria da morbidade infantil (ALSHAMMARI et al., 2017). Segundo ALSHAMMARI et al. (2017), estima-se que anualmente cerca de 20.000 pessoas veem a óbito por complicações relacionadas com OM, com maior índice de mortes em crianças abaixo de cinco anos de idade.

Vários estudos epidemiológicos sobre OMs foram realizados em diversos países, mas pouco se conhece sobre o perfil das otites no Brasil, principalmente devido à escassez de trabalhos sobre o assunto. Alguns dados são limitados em nosso meio, visto que não são avaliadas as variações ambientais e sazonais regionais. As condutas terapêuticas adotadas são baseadas em informações de ambientes diferentes, o que diminui as chances de orientações de tratamento bem sucedidas. Estudos epidemiológicos da população brasileira seriam muito importantes para o desenvolvimento de um “modelo brasileiro” para tratamento das otites (SIH, 2001).

1.2.2 Fatores de risco

Mesmo sendo uma doença infecciosa, a OM é considerada multifatorial (PEREIRA; RAMOS, 1998; ROCHA; PEDROSO, 2009). A presença de alguns fatores isolados ou em combinação com outros, aumentam o risco para a doença. E inclusive fatores não diretamente ligados com a fisiopatologia da doença, podem influenciar um ou mais mecanismos causais (NETO; HEMB; SILVA, 2006).

Tais fatores, chamados de fatores de risco, podem ser genéticos ou imunológicos, associados ao hospedeiro, ou ambientais e microbiológicos. Eles podem interagir entre si, tornando a criança mais predisposta e susceptível a OM (RAMAKRISHNAN; SPARKS; BERRYHILL, 2007; SHAWABKEH et al., 2017).

Os principais fatores de risco para OM associados ao hospedeiro são:

- *Doença do refluxo gastroesofágico (DRGE)*: alguns autores sugerem que a DRGE seja uma importante causa de OM, pois pode causar uma disfunção na regulação da pressão e na depuração mucociliar do ouvido médio (NETO; HEMB; SILVA, 2006).
- *Fatores anatômicos*:
 - ✓ *Adenoides*: adenoides hipertrofiadas podem causar obstrução da tuba auditiva por compressão mecânica extrínseca e desencadear OM, porém, adenoides pequenas também podem desencadear a doença por refluxo tubário ou por serem colonizadas por bactérias patogênicas da nasofaringe (ROCHA; PEDROSO, 2009);
 - ✓ *Anormalidades craniofaciais*: crianças com fenda palatina ou com anormalidades craniofaciais com Síndrome de Down apresentam a tuba auditiva funcionalmente obstruída, e conseqüentemente, maior prevalência para OM (NETO; HEMB; SILVA, 2006);
 - ✓ *Disfunção tubária*: a tuba auditiva da criança é mais curta (~13mm) e reta (horizontal) do que a dos adultos, que possuem a tuba auditiva mais longa (~35mm) e inclinada. Sendo assim, nas crianças a drenagem de secreções da nasofaringe para o ouvido médio é facilitada (PEREIRA; RAMOS, 1998), o que diminui a proteção das infecções ascendentes da nasofaringe (ROCHA; PEDROSO, 2009). Ademais, a tuba auditiva pode ser obstruída funcionalmente ou

mecanicamente (PEREIRA; RAMOS, 1998; ROCHA; PEDROSO, 2009). A obstrução funcional é devido a alguma incompetência muscular (ROCHA; PEDROSO, 2009) e a obstrução mecânica, pode ser intrínseca (inflamação por infecção ou alergia) ou extrínseca (hipertrofia das adenoides ou tumores da rinofaringe) (PEREIRA; RAMOS, 1998). A obstrução tubária causa um desequilíbrio da pressão no ouvido médio, criando uma pressão negativa, que impede a drenagem normal das secreções, e provoca a aspiração das secreções da nasofaringe para o ouvido médio, podendo causar OM (ROCHA; PEDROSO, 2009);

- *Idade*: a grande prevalência de OMA ocorre na primeira infância (BORGES et al., 2016). Nesta fase, a tuba auditiva é menor e menos inclinada. E as respostas fisiológicas e imunológicas são subdesenvolvidas em casos de infecções (RAMAKRISHNAN; SPARKS; BERRYHILL, 2007);
- *Raça/ Etnia*: nativos americanos, canadenses (RAMAKRISHNAN; SPARKS; BERRYHILL, 2007), e aborígenas australianos têm incidência aumentada para OM em comparação com outras raças (PEREIRA; RAMOS, 1998; SHAWABKEH et al., 2017);
- *Sexo*: crianças do sexo masculino têm uma tendência levemente aumentada a desenvolver OM se comparado com as crianças do sexo feminino (COSTA et al., 2011; PEREIRA; RAMOS, 1998; RAMAKRISHNAN; SPARKS; BERRYHILL, 2007);

Dentre os fatores de risco ambientais e microbiológicos, destacam-se:

- *Amamentação*: há evidências que o aleitamento materno seja fator protetor para OM, pois promove o desenvolvimento da musculatura facial (drenagem mais eficiente da tuba auditiva) (PEREIRA; RAMOS, 1998), e o leite materno transmite uma imunidade passiva (SHAWABKEH et al., 2017), através do fornecimento de imunoglobulinas (PEREIRA; RAMOS, 1998), além de diminuir a colonização de bactérias patogênicas na nasofaringe (COSTA et al., 2011). Contudo, é importante que a posição da amamentação seja mais próxima possível da posição sentada, que diminui o risco de refluxo do leite para tuba auditiva (PEREIRA; RAMOS, 1998);

- *Creches e berçários*: crianças que frequentam creches e berçários apresentam maior incidência de OM do que aquelas criadas em ambiente exclusivamente domiciliar (PEREIRA; RAMOS, 1998). O contato com múltiplas crianças facilita a propagação de patógenos virais e bacterianos (RAMAKRISHNAN; SPARKS; BERRYHILL, 2007), que causam infecções das vias aéreas superiores (IVAS) e conseqüentemente OM;
- *Estação do ano*: a OM é mais frequente no inverno e outono, e menos comum no verão (COSTA et al., 2011; PEREIRA; RAMOS, 1998). Isto pode ser decorrente da maior incidência de IVAS nestas estações de inverno e outono;
- *Fatores socioeconômicos e culturais*: é declarado que há uma relação inversa entre nível socioeconômico e cultural com a ocorrência de episódios de OM. Os riscos de desenvolvimento e recorrência de OM aumentam consideravelmente quando as condições de vida e saúde são precárias (COSTA et al., 2011);
- *Fumo passivo*: crianças expostas a fumaça de cigarro têm maiores chances de desenvolver OM, pois se acredita que a fumaça possa causar danos à função mucociliar e alterar a competência imunológica do trato respiratório (COSTA et al., 2011; PEREIRA; RAMOS, 1998);
- *Infecções das vias aéreas superiores*: as IVAS são um dos fatores mais importantes para OM (ROCHA; PEDROSO, 2009), pois as OM são consideradas uma complicação das IVAS. As IVAS provocam uma congestão no nariz, nasofaringe, tuba auditiva e ouvido médio, o que ocasiona uma obstrução da tuba auditiva, causando uma pressão negativa, criando uma sucção do muco da nasofaringe para o ouvido médio, o que pode levar ao desenvolvimento de OM (NETO; HEMB; SILVA, 2006);
- *Predisposição familiar*: crianças com histórico de pais ou irmãos com OMA ou OMAR prévias tem maior risco para OM, se comparado com crianças com histórico familiar negativo para doença (COSTA et al., 2011; PEREIRA; RAMOS, 1998);
- *Uso de chupetas*: estudos apontam o uso de chupeta como fator de risco para OM, pois as crianças que usam chupeta têm mais episódios de otite se comparado com aquelas que não usam (COSTA et al., 2011).

1.2.3 Manifestações clínicas

Crianças com OMA apresentam rápida manifestação de sinais e sintomas, a maioria deles inespecíficos, como: febre, irritabilidade, cefaleia, anorexia, vômito, diarreia, entre outros (PEREIRA; RAMOS, 1998).

Mas a otalgia é o sintoma mais comum (OYAMADA et al., 2014; PEREIRA; RAMOS, 1998). Em crianças menores, o ato de puxar a orelha pode ser indicativo de dor no ouvido (PEREIRA; RAMOS, 1998).

1.2.4 Diagnóstico clínico

O diagnóstico da OMA pode ser determinado através de anamnese e exame físico (OYAMADA et al., 2014), mas a otoscopia, que consiste no exame da membrana timpânica, é a chave do diagnóstico correto (THOMAS et al., 2014).

A anamnese é utilizada para avaliar os fatores de risco ambientais que a criança esteve exposta, a data do início dos sintomas da doença, o histórico de tratamentos prévios e o grau de aderência a estes tratamentos (PEREIRA; RAMOS, 1998). E o exame físico da cabeça e pescoço é realizado para identificar a existência de fatores no hospedeiro associados com a presença da doença, como por exemplo, obstrução nasal, anomalias craniofaciais, entre outros (PEREIRA; RAMOS, 1998).

A otoscopia é fundamental para a confirmação da presença de efusão e alterações inflamatórias agudas no ouvido médio, sendo considerada um exame crítico no diagnóstico da OMA (ALSHAMMARI et al., 2017).

Conforme PILTCHER et al. (2015), na otoscopia normal (figura 2A) a membrana timpânica se apresenta íntegra, transparente (semitransparente), com coloração (âmbar-neutra), em posição neutra (levemente côncava com ponto de depressão máximo no umbigo do martelo) e com mobilidade (pode ser aferida pela otoscopia pneumática).

Na otoscopia em casos de OMA (figura 2B) a membrana timpânica normalmente se mostra hiperemiada, com aumento da vascularização, opaca ou com menor transparência, e abaulada, sendo esta última característica a mais marcante e importante. Na pneumotoscopia (otoscopia pneumática), se visualiza

uma membrana timpânica com diminuição da mobilidade (OYAMADA et al., 2014; PEREIRA; RAMOS, 1998; PILTCHER et al., 2015).

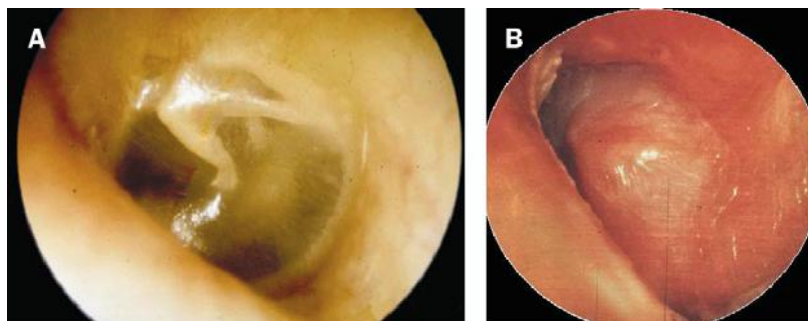


Figura 2: Membrana timpânica: (A) Normal (B) Caso de OMA.

Fonte: Figura adaptada de ROVERS et al., 2004.

As dúvidas diagnósticas por inadequações nas habilidades clínicas de otoscopia pediátrica, muitas vezes geram diagnósticos exagerados de OMA, e conseqüentemente maiores custos com encaminhamentos cirúrgicos e com prescrições desnecessárias de antibióticos, que também causam aumento da incidência de resistência antimicrobiana (ALSHAMMARI et al., 2017).

1.2.5 Diagnóstico microbiológico

A OMA é normalmente considerada uma infecção bacteriana (PETTIGREW et al., 2011). A etiologia bacteriana da OMA é bem estabelecida e os principais patógenos bacterianos desta doença são *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* (RUOHOLA et al., 2013), seguidos por *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* em um menor número de casos (ALSHAMMARI et al., 2017; THOMAS et al., 2014).

Bactérias patogênicas normalmente são encontradas em fluídos de ouvido médio em cerca de 70% dos casos de OMA (MONOBE et al., 2003). Em alguns estudos, bactérias foram isoladas de fluídos de ouvido médio em altas proporções, de 80 a 90% dos casos (ALSHAMMARI et al., 2017; NOKSO-KOIVISTO et al., 2016). Todavia, aproximadamente 12 a 35% dos casos de OMA, apresentam resultados negativos para bactérias (CHONMAITREE, 2006).

É reconhecido que quando se utiliza a metodologia de cultura pode haver perda de crescimento bacteriano devido a técnicas inadequadas ou pela presença de microrganismos fastidiosos (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003). *H. influenzae* e *S. pneumoniae*, os principais patógenos bacterianos da OMA, são microrganismos fastidiosos, e requerem uma demanda especial de tempo e meio de cultura adequado para crescimento e isolamento (YATSYSHINA et al., 2016).

Além disso, o método de cultura depende da presença e quantidade de microrganismos viáveis na amostra, tem sensibilidade limitada, é trabalhoso e dispende tempo. Já os métodos moleculares, como reação em cadeia da polimerase (PCR), tem demonstrado alta sensibilidade na detecção de patógenos bacterianos em comparação com a cultura, pelo fato de não dependerem da viabilidade bacteriana e por serem indiferentes em relação às bactérias fastidiosas (YATSYSHINA et al., 2016).

Com o estabelecimento das técnicas moleculares, principalmente o PCR, que podem ser utilizados para identificação de qualquer microrganismo, a frequência da detecção de patógenos em fluidos de ouvido médio tem aumentado. E além de repercutir num aumento da prevalência de infecções bacterianas, diversos vírus têm também sido identificados por esta mesma técnica e propostos como potenciais patógenos da OMA (YATSYSHINA et al., 2016).

Vírus têm sido identificados em 20 à 70% dos casos de fluídos de ouvido médio de crianças com OMA (ALSHAMMARI et al., 2017; NOKSO-KOIVISTO et al., 2016), e em dois terços dos casos está presente juntamente com bactérias, como co-patógenos (RUOHOLA et al., 2013).

As primeiras tentativas de detecção de vírus em fluídos de ouvido médio foram nas décadas de 1950 e 1960, quando se tinha disponível apenas cultura viral. Em muitos estudos não eram encontrados vírus, e embora pudessem ser encontrados vírus em alguns outros estudos, a taxa de detecção era baixa. Nas décadas seguintes, houve melhorias nas técnicas de cultura viral e surgimento de métodos de detecção de antígenos virais, o que aumentou consistentemente as taxas de detecção viral nos fluídos de ouvido médio. Com o advento da técnica de PCR, houve um aumento drástico nas taxas de detecção viral em amostras de ouvido médio (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

Contudo, se sabe que a detecção de vírus, mesmo com PCR, ainda é insuficiente, pois existem limitações, como o uso de *primers* específicos para cada vírus que está sendo pesquisado e a pequena quantidade de fluído obtido do ouvido médio para realização de uma ampla gama de testes para diferentes tipos virais (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

A prevalência e a distribuição dos vírus em fluídos de ouvido médio variam de acordo com as configurações de cada estudo, conforme as regiões geográficas, as flutuações sazonais e os métodos empregados pra detecção (YATSYSHINA et al., 2016).

E em alguns casos de OMA nenhum agente etiológico tem sido identificado. Isto pode ser explicado, algumas vezes, pelo pouco volume de fluído do ouvido médio obtido por procedimento cirúrgico, que impossibilita testes diagnósticos para um amplo espectro de microrganismos. Ou também, pelo fato das modernas abordagens microbiológicas ainda não terem sido utilizadas para pesquisa de todos os possíveis patógenos bacterianos e virais que causam OM (RUOHOLA et al., 2006).

1.2.6 Prevenção e tratamento

Quanto à prevenção das otites, alguns cuidados para redução de fatores de risco podem ser tomados para minimização da doença e de sua recorrência, como: evitar o fumo passivo, evitar o uso de mamadeiras (principalmente em decúbito dorsal) e estimular a amamentação materna, atrasar o ingresso das crianças em creches e berçários, suspender o uso de chupetas, evitar ou tratar casos de rinosinusites e alergias, entre outros (OYAMADA et al., 2014).

Além da redução de fatores de risco, a ativa imunoprofilaxia com vacinas e o tratamento precoce com terapia antiviral são recomendados na prevenção das OMs. Ao contrário, antibióticos profiláticos em longo prazo não são recomendados (SCHILDER et al., 2017).

1.2.6.1 Vacinas

Atualmente, temos disponíveis duas vacinas que auxiliam na prevenção das

OMs e que são recomendadas pela Academia Americana de Pediatria (AAP): a vacina conjugada pneumocócica (PVC) e a vacina contra o vírus influenza (FluV) (SHAWABKEH et al., 2017).

A PVC previne doenças causadas por sorotipos da bactéria *S. pneumoniae*, inclusive OMA. Esta vacina foi introduzida no ano 2000 e tem sido implementada em programas nacionais de imunização no mundo todo (NOKSO-KOIVISTO et al., 2016). No Brasil, a PVC faz parte do Calendário Nacional de Vacinação e é disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (“Portal Ministério da Saúde”, [s.d.]).

Dos principais otopatógenos bacterianos, apenas o *S. pneumoniae* possui vacina para prevenção de OMA. A vacina contra *H. influenzae* é ativa apenas contra a forma capsulada desta bactéria, a qual é causadora de doenças invasivas e sistêmicas. O *H. influenzae* causador de otites não é capsulado, portanto, não passível de prevenção através desta vacina (PEREIRA; RAMOS, 1998).

A vacina contra o FluV é recomendada para prevenir influenza sazonal e consequentemente influenza associado à OMA (NOKSO-KOIVISTO et al., 2016). Esta vacina faz parte das campanhas anuais de vacinação no Brasil, promovidas pelo Ministério da Saúde juntamente com Secretarias de Saúde de estados, municípios e Distrito Federal (“Portal Ministério da Saúde”, [s.d.]). A vacinação contra o influenza foi incorporada no Programa Nacional de Imunizações em 1999, mas até 2010 era disponível apenas para idosos e alguns grupos de riscos, somente a partir de 2011 novos grupos populacionais foram beneficiados com a vacina (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, [s.d.]).

A vacina contra influenza é a única vacina licenciada até o momento para o controle de vírus respiratórios (VRs) (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003). Os dois principais tipos de vacina contra influenza que podem ser utilizadas em crianças são: a vacina inativada, que pode ser utilizada em crianças a partir dos seis meses de idade e a vacina viva atenuada, utilizada em crianças com dois anos de idade ou mais. Contudo, a eficácia da vacina contra influenza varia a cada estação, pois depende da correspondência antigênica entre os vírus contidos na vacina e as cepas virais circulantes na população (HEIKKINEN, 2016).

Vários tipos de vacinas contra outros VRs estão sendo atualmente desenvolvidas, mas ainda estão no início dos ensaios clínicos, apesar de décadas

de pesquisa (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003). É muito provável que vacinas contra outros VRs também sejam eficazes na prevenção do desenvolvimento de OMA (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003), visto que infecções virais respiratórias são um dos principais fatores de risco para OMA (PETTIGREW et al., 2017). Além disto, como a maioria das infecções respiratórias bacterianas são precedidas por infecções virais, é provável que vacinas contra VRs também possam prevenir o desenvolvimento de complicações bacterianas (HEIKKINEN, 2016).

Portanto, qualquer progresso futuro a ser feito em relação à vacinação contra VRs terá um impacto na redução nas taxas de OMA (NOKSO-KOIVISTO et al., 2016), sendo assim, as vacinas são uma abordagem promissora global na redução de OM. Entretanto, sabemos que a OM é uma doença polimicrobiana e que existem desafios significativos no desenvolvimento de vacinas (PETTIGREW et al., 2017).

1.2.6.2 Terapia antimicrobiana

A OMA é a principal causa da prescrição de antibióticos em pediatria (PEREIRA; RAMOS, 1998). Mas o uso destes fármacos em muitos casos de OMA não é necessário, por se tratar de uma “infecção viral pura” ou pelo exsudato do ouvido médio com bactérias (pus) poder ser drenado pela tuba auditiva, uma vez que a função da tuba retornar ao normal (ALSHAMMARI et al., 2017; NOKSO-KOIVISTO et al., 2016).

O uso criterioso de antibióticos para OMA tem sido cada vez mais incentivado. Esta decisão criteriosa do uso ou não de antibióticos deve considerar a certeza diagnóstica de OMA, a gravidade dos sintomas, a idade do paciente e a possibilidade de um seguimento adequado, com novas avaliações em caso de piora ou melhora do paciente. E se houver uma decisão de tratamento de OMA com antibiótico, a escolha do mesmo também deve ser criteriosa (PILTCHER et al., 2015).

Conforme a diretriz de prática clínica sobre diagnóstico e tratamento da OMA, da AAP, atualizada em 2013, a terapia inicial com antibióticos é recomendada apenas para bebês e crianças com severos sintomas de OMA ou com otorrêia, presumivelmente com ruptura da membrana timpânica. Crianças com sintomas não graves, incluindo aquelas menores de dois anos de idade com OMA unilateral,

podem ser observadas sem antibiótico inicialmente (ALSHAMMARI et al., 2017; NOKSO-KOIVISTO et al., 2016).

Diferentemente da terapia com antibióticos, a terapia com antivirais é relativamente nova. Em princípio, os agentes antivirais podem ser utilizados tanto na prevenção quanto no tratamento de infecções virais. É esperado que o uso de drogas antivirais causem uma atenuação suficiente da infecção viral, com supressão da resposta inflamatória, e conseqüentemente, diminuição da incidência de complicações, como a OMA (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

Atualmente, existem antivirais licenciados para uso contra o FluV e RSV, para os demais VRs algumas drogas já foram testadas, mas ainda não têm eficiência comprovada *in vivo* ou não foram licenciadas para o uso (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Mas para crianças pequenas, a única opção de tratamento antiviral é o oseltamivir, inibidor de neuraminidase viral, em casos de infecção por influenza (HEIKKINEN, 2016).

Existem estudos sobre a prevenção de OMA através do tratamento precoce de infecção viral por influenza em crianças com o uso de oseltamivir oral, que resultaram em uma redução significativa no desenvolvimento de OMA (ALSHAMMARI et al., 2017; HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003). Os resultados destes estudos indicam que o tratamento precoce de infecção viral com antiviral específico pode prevenir OMA, e que eficácia similar poderia ser observada também com antivirais contra outros VRs que predisõem a OMA (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

Porém, mesmo que antivirais específicos estejam disponíveis e sejam efetivos contra a maioria dos vírus, existem dois problemas práticos. Primeiro, as manifestações clínicas das diferentes infecções virais são normalmente indistinguíveis, especialmente em crianças, e o uso de específicos antivirais requerem a identificação específica do vírus que esta causando a infecção. Segundo, a iniciação do tratamento antiviral deveria ocorrer o mais rápido possível após o aparecimento dos sintomas, preferivelmente em menos de 48 horas (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

Além do mais, o desenvolvimento de antivirais é muito mais difícil do que o desenvolvimento de antibióticos, pois os vírus são organismos intracelulares obrigatórios, e necessitam de uma célula com metabolismo ativo para replicação

viral, ao contrário das bactérias, que independem do hospedeiro. Para mais, é complicado o antiviral inibir as funções do vírus sem interferir no metabolismo celular do hospedeiro, sendo que, os primeiros antivirais eram tóxicos aos pacientes, pois agiam no DNA viral e também na síntese do DNA celular (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

1.2.6.3 Procedimento cirúrgico

Em alguns casos de OM, quando não há melhora espontânea ou quando o tratamento clínico não é bem sucedido, é indicado o procedimento cirúrgico com paracentese. Paracentese é a drenagem de líquido de uma cavidade, por meio de punção. No caso de drenagem de líquido do ouvido médio, existem duas formas de paracentese: timpanocentese e miringotomia (SIH, 2001).

A timpanocentese é a perfuração da membrana timpânica com uma agulha, após a limpeza do conduto externo da orelha, para obtenção de fluido do ouvido médio para realização de exames e identificação do agente etiológico da OM. A timpanocentese é feita preferencialmente no local de maior abaulamento do tímpano, mas respeitando o quadrante pósterior superior, com ajuda de um microscópio e com paciente imobilizado e, se possível, sedado (SIH, 2001).

A miringotomia é uma incisão feita na membrana timpânica, realizada preferencialmente nos quadrantes inferiores da membrana, depois da limpeza do conduto auditivo externo (SIH, 2001). Assim como na timpanocentese, a miringotomia é realizada com auxílio de um microscópio, com paciente imobilizado e sedado, se possível (SIH, 2001).

A miringotomia pode ser acompanhada da colocação de tubo de ventilação (figura 3), também conhecido como carretel. O tubo de ventilação é introduzido no orifício aberto do tímpano (feito pela incisão da miringotomia), no qual fica preso, aguardando sua rejeição ou, se conveniente, sua retirada. Os tubos de ventilação são tubos plásticos de diversos formatos e podem ser de curta ou longa duração, conforme o caso (SAFFER; MOCELLIN, 1989).



Figura 3: Miringotomia com colocação de tubo de ventilação.

Fonte: Figura adaptada de ROVERS et al., 2004.

Há indicação de miringotomia com tubo de ventilação quando for necessária a drenagem ou ventilação prolongada do ouvido médio (PEREIRA; RAMOS, 1998). Entretanto, a indicação da miringotomia é bastante discutida, porque apresenta eficácia comprovada, mas é considerada muito agressiva por alguns otorrinolaringologistas, que indicam esta intervenção apenas para casos mais graves de OM (SIH, 2001), pois como em qualquer procedimento cirúrgico, pode apresentar complicações e deixar sequelas (SAFFER; MOCELLIN, 1989).

1.3 Vírus na otite média aguda

Os vírus podem ter um papel essencial no desenvolvimento da OMA (WU et al., 2018), pois na maioria das vezes esta patologia ocorre concomitantemente ou logo após uma infecção viral do trato respiratório superior (NOKSO-KOIVISTO et al., 2016). Portanto, a OMA é considerada uma consequência destas infecções respiratórias virais (WU et al., 2018), sendo que mais de 60% dos episódios destas infecções são complicados com OMA (SALIH; AL-KHAFAJI; AL-MOLA, 2017; STOCKMANN et al., 2014)

A alta incidência de OMA poderia ser explicada pelas taxas extremamente altas de infecções virais do trato respiratório superior (ALSHAMMARI et al., 2017; NOKSO-KOIVISTO et al., 2016) sendo que a sazonalidade da incidência de OMA é paralela às ocorrências de infecções virais (HEIKKINEN, 2001).

1.3.1 Vírus respiratórios (VRs)

Os vírus, classificados como respiratórios, são assim denominados por terem o trato respiratório como sítio alvo para entrada e replicação viral. Estes vírus infectam o trato respiratório superior através da nasofaringe, se replicam e podem se disseminar no organismo através de uma transmissão célula a célula ou por viremia (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A transmissão de VRs de uma pessoa para outra ocorre através de gotícula ou aerossóis, por contato direto ou contato com superfícies contaminadas (BROOKS et al., 2012). E alguns fatores de risco contribuem para que a infecção viral aconteça, como as características virais, a quantidade de inóculo viral e os fatores do hospedeiro (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Os VRs podem causar doenças com diversos graus de gravidade, desde quadros clínicos brandos até casos graves, que podem ser fatais (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). E podem infectar pessoas de todas as idades, mas a maior incidência ocorre em crianças de até cinco anos de idade, que podem sofrer em média de seis a oito infecções por ano (HEIKKINEN, 2016).

Acredita-se que todos os VRs possam causar OMA, mas tem sido sugerido que alguns vírus são mais propensos a desenvolver OMA que outros, ou seja, são mais ototrópicos (NOKSO-KOIVISTO et al., 2016). Porém, a habilidade relativa de cada um dos diferentes vírus em predispor a OMA é difícil determinar, porque o desenvolvimento da OMA depende também da presença de outros fatores de risco (HEIKKINEN, 2001).

Alguns estudos apontaram maior risco de OMA em crianças com infecção viral do trato respiratório superior quando associado com alguns VRs como: FluV, vírus sincicial respiratório (RSV), metapneumovírus humano (hMPV), vírus parainfluenza (PIV), rinovírus humano (hRNV), adenovírus (AdV) e bocavírus humano (hBoV) (NOKSO-KOIVISTO et al., 2016).

Estes VRs pertencem a diferentes famílias virais (KUTTER et al., 2018). A classificação taxonômica e a nomenclatura dos vírus é de responsabilidade do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*) (ADAMS et al., 2017), que periodicamente publica atualizações. Conforme o ICTV, alguns VRs envolvidos nesta pesquisa

apresentaram alterações recentes em suas classificações e nomenclaturas, mas nesta pesquisa foram mantidas as mais conhecidas e utilizadas até o momento.

1.3.1.1 Vírus Influenza (FluV)

O FluV, também conhecido como vírus da gripe (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008), é responsável por milhões de mortes em todo o mundo (BROOKS et al., 2012).

Este vírus foi primeiramente isolado em suínos, no ano de 1930, e três anos mais tarde em humanos (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O FluV é classificado na família *Orthomyxoviridae*, sendo as espécies Influenza A (FluV A), B (FluV B) e C (FluV C) responsáveis por causar doenças em humanos (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

As partículas deste vírus são esféricas, medindo cerca de 80 a 120 nanômetros (nm) de diâmetro (BROOKS et al., 2012). O vírus possui genoma RNA de fita simples (RNAs), com polaridade negativa e segmentado (FluV A e B possuem oito segmentos; FluV C possui sete segmentos) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O genoma deste vírus é circundado por capsídeo proteico helicoidal (figura 5), proteína de matriz e envelope (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). É no envelope que estão inseridas e expostas duas glicoproteínas de superfície: hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), as quais constituem antígenos responsáveis pelas variações antigênicas do vírus (BROOKS et al., 2012). São conhecidas pelo menos 16 hemaglutininas antígenicamente específicas (H1-H16) e nove neuraminidasas (N1-N9) (FIGUEIREDO, 2009).

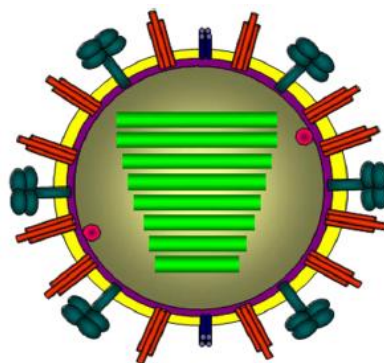


Figura 4: Representação da estrutura da partícula do FluV.

Fonte: Figura adaptada de SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008.

As possíveis variações de HA e NA são responsáveis por causar mutações antigênicas e funcionais no FluV, produzindo novos vírus e dificultando o controle do influenza devido a falta de resposta imunológica do homem, resultando na ocorrência de surtos, epidemias e pandemias (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008), (BROOKS et al., 2012), (SCOTTA, 2013). Há duas formas de geração de mutações nestes vírus: variações antigênicas menores (*drift*), alterando epítomos alvos dos anticorpos neutralizantes; e variações maiores (*shift*), quando há rearranjos genéticos de dois tipos de FluV, gerando um novo subtipo (FIGUEIREDO, 2009). Este novo subtipo do vírus pode apresentar pouca ou nenhuma imunidade prévia na população, podendo causar pandemias (SCOTTA, 2013). Como, por exemplo, as pandemias de 1918 (H₁N₁), 1957 (H₂N₂), 1968 (H₃N₂) (FIGUEIREDO, 2009) e 2009 (H₁N₁) (SCOTTA, 2013).

A imunidade ao FluV é específica do subtipo e permanente, não havendo proteção cruzada. Anticorpos contra a HA auxiliam na resistência ao desenvolvimento da infecção, enquanto anticorpos contra NA, colaboram na redução da gravidade da doença e na redução da capacidade de transmissão por contato (BROOKS et al., 2012).

Quanto a antigenicidade do FluV, o FluV A é altamente variável, o FluV B menos variável, e o FluV C é estável (BROOKS et al., 2012), sendo assim, o FluV A possui maior número de hospedeiros e causa epidemias e até pandemias. O FluV B tem um número menor de hospedeiros, causando epidemias menos comumente que o FluV A. E o FluV C, afeta praticamente apenas seres humanos, e apresenta menor valor clínico (SCOTTA, 2013).

O período de incubação do FluV varia de um a três dias, podendo chegar a atingir quatro a cinco dias, dependendo da infecciosidade, quantidade de inóculo viral e do estado imunológico do hospedeiro (ALBUQUERQUE, 2009).

O quadro clínico associado ao FluV se caracteriza como uma síndrome gripal (SG). Os sinais e sintomas da SG são febre, dor de garganta, tosse, coriza, obstrução nasal, hiperemia conjuntival, mal-estar, cefaleia, mialgia e artralgia. Sintomas gastrointestinais como vômitos, diarreia e dor abdominal são mais comuns em crianças. Mas o quadro clínico pode evoluir e complicar, acometendo as vias aéreas inferiores, podendo causar pneumonia viral, com síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e insuficiência respiratória. Além disto, outras complicações também

podem ocorrer, como: OMA, pneumonia bacteriana, miosite, miocardite, pericardite, encefalite, Síndrome de Reye e Síndrome de Guillain-Barré (SCOTTA, 2013).

O FluV tem distribuição mundial e o pico de incidência ocorre no inverno. Os três principais gêneros do vírus apresentam perfis epidemiológicos diferentes, conforme suas características (BROOKS et al., 2012).

1.3.1.2 Vírus Sincicial Respiratório (RSV)

O RSV foi isolado pela primeira vez em 1956, de chimpanzés, que apresentavam sintomas de resfriado comum. Por isto, inicialmente este vírus foi chamado de agente da coriza do chimpanzé (*Chimpanzee Coryza Agent - CAA*). Mais tarde, o RSV foi identificado em humanos, e devido seu efeito citopático, com formação de sincícios em cultura de células, foi denominado “Vírus Sincicial Respiratório” (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O RSV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Pneumovirus*. Apresenta apenas um sorotipo, e dois subgrupos antigênicos, A e B (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Trata-se de um vírus é envelopado, pleomórfico, medindo de 100 a 350nm de diâmetro. O capsídeo apresenta simetria helicoidal (figura 6). O genoma viral é RNAs, linear, com polaridade negativa, não segmentado, com aproximadamente 15 kilobases (kb) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). O genoma do RSV, se comparado com o do influenza, é mais estável, sem grande atividade mutagênica (FIGUEIREDO, 2009).

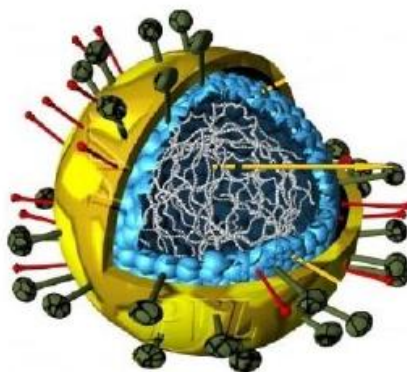


Figura 5: Representação da estrutura da partícula do RSV.

Fonte: Figura adaptada de <https://www.niehs.nih.gov/research/atniehs/labs/iidl/pi/enviro-gen/studies/rsv/index.cfm>, acesso em 25/05/2019.

O período de incubação do RSV é de três a cinco dias (BROOKS et al., 2012). A infecção mais comum causada pelo RSV é a do trato respiratório superior, que se manifesta como uma gripe comum, caracterizada por coriza, congestão nasal, tosse e febre. Nas crianças o vírus pode atingir o trato respiratório inferior, causando laringite, bronquiolite, pneumonia e broncopneumonia. Em crianças com menos de cinco anos de idade, o RSV é a causa mais comum de pneumonia viral. E OMA também ocorre em cerca de um terço das crianças com infecção por RSV (LOURENÇÃO et al., 2005).

As reinfecções por RSV são frequentes, pois a imunidade induzida na infecção primária é incompleta. A partir da terceira infecção, a gravidade da doença é reduzida (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O RSV apresenta distribuição mundial (BROOKS et al., 2012), e um ciclo sazonal, causando epidemias no inverno em regiões de clima temperado e na primavera-verão em regiões subtropicais (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

1.3.1.3 Metapneumovírus Humano (hMPV)

O hMPV foi isolado pela primeira vez em 2001, de aspirados de nasofaringe de crianças com infecção do trato respiratório (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Os hMPVs são classificados na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Metapneumovirus*. Possuem apenas um sorotipo, com dois subgrupos genéticos A e B (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

As partículas virais são pleomórficas, com cerca de 150 a 600nm de diâmetro. São envelopadas e apresentam capsídeo com simetria helicoidal (figura 7). O genoma viral é formado por RNAs, linear, com polaridade negativa, não segmentado, com cerca de 13kb (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).



Figura 6: Representação da estrutura da partícula do hMPV.

Fonte: Figura adaptada de SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008.

O período de incubação do hMPV tem sido estimado de quatro a seis dias (ALBUQUERQUE, 2009). As manifestações clínicas causadas pelo hMPV são similares as causadas pelo RSV, e variam desde quadros brandos do trato respiratório superior até quadros graves do trato respiratório inferior (BROOKS et al., 2012), como bronquiolites, asma exacerbada e pneumonias (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). A presença de OM já foi descrita em associação com este vírus em cerca de um terço dos casos. E o hMPV também já foi associado com à doença cardíaca congestiva e doença pulmonar obstrutiva (ALBUQUERQUE, 2009).

O hMPV circula por todo mundo, principalmente na “temporada respiratória”, ou seja, no outono/ inverno em locais de clima temperado e primavera/ verão em locais com clima subtropical (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008), com frequência sobrepondo parcial ou totalmente as epidemias de RSV (ALBUQUERQUE, 2009).

1.3.1.4 Vírus Parainfluenza (PIV)

O nome “parainfluenza” se deve a relação deste vírus com o FluV, tanto em suas características físicas e morfológicas, quanto na natureza da infecção (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O PIV foi descrito pela primeira vez entre 1956 e 1960, após ser isolado de um material de necropsia de um bebê com doença respiratória (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Existem cinco tipos antigênicos de PIVs que foram isolados em humanos, denominados 1, 2, 3, 4a e 4b. Os tipos 1 e 3 são classificados no gênero *Respirovirus* e os tipos 2, 4a e 4b no gênero *Rubulavirus*. Estes gêneros pertencem a subfamília *Paramyxovirinae*, a família *Paramyxoviridae* e ordem *Mononegavirales* (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Os PIVs normalmente apresentam morfologia esférica e medem de 150 a 200nm de diâmetro. O genoma deste vírus é RNAfs, linear, com polaridade negativa, não segmentado, com 15 a 19kb de extensão. O capsídeo viral apresenta simetria helicoidal (figura 8), e é envolto por um envelope viral (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

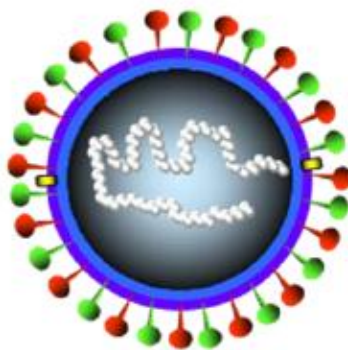


Figura 7: Representação da estrutura da partícula do PIV.

Fonte: Figura adaptada de SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008.

As infecções por PIV normalmente se manifestam no trato respiratório superior, com sintomas de tosse e dor de garganta. Mas o PIV também podem causar doença no trato respiratório inferior. Cada um dos tipos de PIV é mais associado a determinado quadro clínico. Os tipos 1 e 2 estão mais associados ao cruce, mas podem causar outros tipos de infecção também, tanto no trato superior quanto inferior. O tipo 3 está frequentemente associado a bronquiolite e pneumonia. E os tipos 4a e 4b estão relacionados com infecções mais brandas do trato respiratório superior (ALBUQUERQUE, 2009). Os PIV também estão associados com OMA, visto que são detectados em fluídos de ouvido médio e na nasofaringe de crianças com esta patologia (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

Os PIV tipos 1, 2 e 3 ocorrem no mundo todo e entre pessoas de todas as idades, mas são mais frequentes durante a infância. Os tipos 4a e 4b são menos prevalentes. A infecção primária deste vírus gera alguma imunidade, mas

reinfecções são comuns (ALBUQUERQUE, 2009), e a incidência é maior nos meses mais frios (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

1.3.1.5 Rinovírus Humano (hRNV)

Os hRNVs foram descritos inicialmente em 1956 de pessoas com infecção no trato respiratório superior. Estes vírus são conhecidos como “vírus do resfriado comum” porque ficam localizados predominantemente no trato respiratório superior e a denominação “rinovírus” também é derivada disto (ALBUQUERQUE, 2009).

São classificados na família *Picornaviridae*, gênero *Rhinovirus*. E até o momento já foram identificados 102 tipos sorológicos de hRNVs (tipos 1A e 1B e de 2 a 100) que infectam humanos (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Este vírus não é envelopado e tem cerca de 20 a 30nm de diâmetro. O capsídeo apresenta simetria icosaédrica (figura 9). E o genoma viral é constituído de RNAs, linear, com polaridade positiva, não segmentado, com cerca de 7,2kb (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

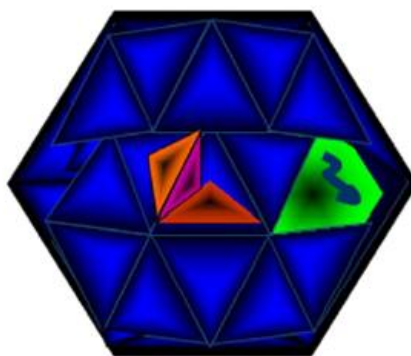


Figura 8: Representação da estrutura da partícula do hRNV.

Fonte: Figura adaptada de SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008.

Os hRNVs causam usualmente sintomas de resfriado comum, como: congestão nasal, coriza intensa, dor de garganta, tosse, rouquidão, e a febre é variável. Mal-estar, mialgia e cefaleia são sintomas menos frequentes. Mais da metade dos casos de OMA em crianças estão associados com hRNV, conforme demonstram estudos (ALBUQUERQUE, 2009). E os hRNVs podem também alcançar o trato respiratório inferior e causar sintomas graves, desencadeando

doença pulmonar obstrutiva crônica e asma em crianças, com exacerbação de quadros de bronquite crônica e fibrose cística (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A infecção por hRNV apresenta alta prevalência entre bebês e crianças pequenas, mas esta prevalência decai com o aumento da idade (ALBUQUERQUE, 2009). E em geral, as infecções por hRNV ocorrem durante a primavera e o outono (LEOTTE et al., 2017).

1.3.1.6 Adenovírus (AdV)

Os AdVs foram isolados em 1953 de adenoides humanos, como responsáveis por infecções respiratórias e inicialmente foram chamados de “agentes da degeneração da adenoide”. Apenas em 1956 foram denominados “adenovírus” (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A família *Adenoviridae* é subdividida em quatro gêneros: *Aviadenovírus*, *Mastadenovírus*, *Atadenovírus* e *Siadenovírus*. Os AdVs responsáveis por infecções em humanos pertencem ao gênero *Mastadenovírus* e possuem 51 sorotipos, divididos em seis espécies (A, B, C, D, E e F), conforme suas características físico-químicas, imunológicas e bioquímicas (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Apesar de ser um patógeno do trato respiratório, também pode estar envolvido em outras doenças do trato gastrointestinal, urinário e da conjuntiva (BROOKS et al., 2012).

Os AdVs medem aproximadamente 90nm de diâmetro, não apresentam envelope e apresentam capsídeo em forma icosaédrica (figura 10). O genoma é constituído por DNA de fita dupla (DNAfd), linear, não segmentado, com cerca de 26 a 45kb (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

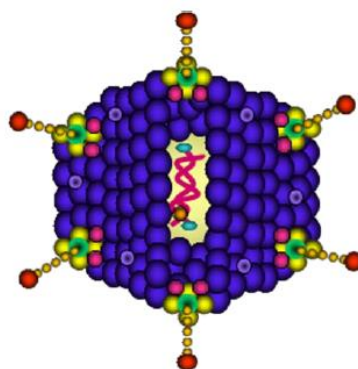


Figura 9: Representação da estrutura da partícula do AdV.

Fonte: Figura adaptada de SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008.

O período de incubação do AdV varia de cinco a dez dias. A sintomatologia pode variar de um quadro de resfriado comum, com: congestão nasal, coriza, dor de garganta, tosse e rouquidão, com febre variável, e menos comumente, mal-estar, mialgia e cefaleia até quadros mais severos, com: laringite, doença respiratória aguda, bronquite, crupe, bronquiolite e pneumonia (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Além disto, estudos têm identificado a presença de AdV em fluídos de ouvido médio de crianças com OMA, bem como na nasofaringe destas crianças (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

O AdV, diferente da maioria de outros patógenos respiratórios, induz uma imunidade ativa e duradoura contra a reinfecções. Isto ocorre, provavelmente, devido à presença de anticorpos neutralizantes circulantes, que possivelmente duram a vida toda do indivíduo. Contudo, estes anticorpos neutralizantes protegem o indivíduo das manifestações clínicas da doença, mas nem sempre podem impossibilitar a reinfecção (BROOKS et al., 2012).

Estes vírus possuem distribuição mundial e circulam durante todo o ano (BROOKS et al., 2012).

1.3.1.7 Bocavírus Humano (hBoV)

O hBoV foi identificado em 2005 em amostras respiratórias, e foi sugerido como um novo parvovírus de humanos, relacionado aos parvovírus de animais, bovino e canino. Por isto, o nome “bocavírus” é resultado da combinação “bo”, de bovino e “ca”, de canino (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Os parvovírus são uns dos menores vírus conhecidos, sendo que o nome *parvus* deriva do latim e significa pequeno. A família *Parvoviridae* se divide em duas subfamílias: *Parvovirinae*, que infecta vertebrados e *Densovirinae*, que infecta invertebrados. O hBoV está classificado na família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Bocavírus* (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

As partículas virais do hBoV possuem cerca de 18 a 26nm de diâmetro, não possuem envoltório e apresentam capsídeo de simetria icosaédrica (figura 11). O genoma viral é composto por DNA de fita simples (DNAfs), linear, com cerca de 5kb (BROOKS et al., 2012).

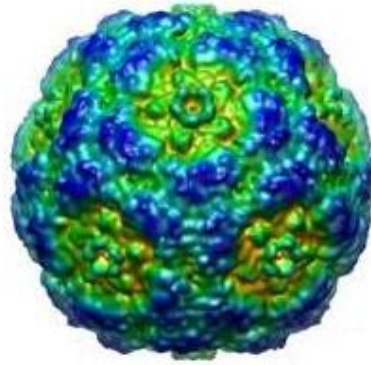


Figura 10: Representação da estrutura da partícula do hBoV.

Fonte: Figura adaptada de <https://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=bocavirus-humano&id=8855>, acesso em 25/05/2019.

Os sintomas clínicos mais comuns associados à infecção por hBoV são chiado, rinorréia e febre (PILGER, 2009). O hBoV pode causar infecções no trato respiratório superior e inferior, como bronquite e pneumonia (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). E diversos estudos têm detectado hBoV em amostras de fluido de ouvido médio de crianças com OMA ((PETTIGREW et al., 2011).

Este vírus tem distribuição mundial, e circula principalmente na primavera e inverno (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

1.3.2 Mecanismos de ação dos vírus respiratórios na otite média aguda

Os VRs podem ser considerados os responsáveis pelo início da cascata de eventos que levam ao desenvolvimento de OMA. E, além disso, apresentam um importante papel em cada estágio da patogênese desta doença (HEIKKINEN, 2016).

Em infecções virais do trato respiratório superior os VRs são capazes de causar inflamação na nasofaringe e na tuba auditiva, gerando respostas imunes e inflamatórias no hospedeiro, estimulando a produção de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios (NOKSO-KOIVISTO et al., 2016), como: histamina, bradicinina, interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10, leucotrieno C4, interferon- γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral (HEIKKINEN, 2001). As propriedades químicas e imunológicas destas substâncias secretadas alteram a propriedade da mucosa e diminuem a atividade mucociliar normal da nasofaringe e da tuba auditiva (NOKSO-KOIVISTO et al., 2016).

Além de ativar cascata inflamatória e imunológica, as infecções virais do trato respiratório superior também podem provocar alterações na flora bacteriana da nasofaringe, aumentando a colonização e a aderência de bactérias às células epiteliais (HEIKKINEN, 2001; NOKSO-KOIVISTO et al., 2016), sendo que, o processo de colonização bacteriana é considerado um requisito para o desenvolvimento da OMA (RUOHOLA et al., 2013).

Quanto à influência dos vírus na ação bacteriana, alguns vírus também são reconhecidos por induzirem disfunção dos leucócitos polimorfonucleares, o que pode ser considerado como aumento do risco de infecção bacteriana secundária. Diversos estudos têm mostrado, por exemplo, que o FluV A diminui a atividade oxidativa, quimiotática, secretora e bactericida dos neutrófilos (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

Para mais, a inflamação local induzida pelos vírus na OMA pode acarretar na diminuição da penetração de antibiótico no ouvido médio, ocasionando baixas concentrações de antibiótico no mesmo, gerando um tratamento deficiente, a troca de antibióticos e vários cursos com diferentes antibióticos, na suposição de resistência bacteriana devido à fraca resposta aos antibióticos usados (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

Além disso, infecções virais do trato respiratório superior causam congestão da mucosa nasal e nasofaríngea. Congestão na nasofaringe e ao redor dela pode ocasionar a disfunção da tuba auditiva, o que é considerado o principal fator de desenvolvimento de OMA. Como prova disto, vários estudos demonstraram comprometimento da tuba auditiva de crianças com infecções do trato respiratório superior (HEIKKINEN; CHONMAITREE, 2003).

1.3.3 Diagnóstico laboratorial dos vírus respiratórios

O diagnóstico laboratorial das infecções virais tem sido dividido em duas partes: diagnóstico clássico e diagnóstico rápido. O diagnóstico clássico dos vírus se baseia em técnicas de isolamento e identificação viral e em testes sorológicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

As técnicas de isolamento viral consistem na inoculação e propagação dos vírus em sistemas de hospedeiros vivos, como: animais de laboratório, ovos

embrionados e cultura de células. Após a inoculação, os vírus não podem ser visualizados, mas a presença deles é percebida pelas alterações fisiológicas provocadas no hospedeiro, consequentes da biossíntese viral. Dentre os sistemas de hospedeiros vivos, a cultura de células é mais utilizada, por ser uma opção mais simples e prática. Para identificação dos vírus isolados nestes sistemas são realizados testes sorológicos utilizando soros padrões contra os vírus pesquisados (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

Os testes sorológicos das infecções virais são métodos indiretos de detecção viral, pois detectam anticorpos específicos, produzidos pelo hospedeiro, em resposta a infecção viral recente. Além disto, são úteis para determinação do *status* imunológico de um indivíduo, ou seja, para verificar se o indivíduo já foi infectado previamente ou imunizado contra certo vírus, através da pesquisa de anticorpos contra esse vírus (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

Já o diagnóstico rápido dos vírus, visa à detecção direta do vírus, de antígenos ou ácidos nucleicos virais. A rapidez no diagnóstico se caracteriza pela obtenção de resultados, em um curto espaço de tempo, durante a fase aguda da doença, permitindo ao clínico uma intervenção benéfica no paciente (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Nos últimos tempos, com a necessidade de diagnósticos virais rápidos, houve o desenvolvimento de uma variedade de métodos diagnósticos para detecção de vírus, antígenos e ácidos nucleicos virais, entre eles: microscopia eletrônica; imunoeletromicroscopia; detecção de antígenos por métodos imunoenzimáticos; aglutinação; imunofluorescência; *Western*, *Southern* e *Northern blotting*; testes imunocitoquímicos; hibridização do ácido nucleico; e amplificação do genoma (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

Dentre estes testes de diagnóstico viral rápido, a técnica de imunofluorescência tem sido utilizada principalmente para detecção de VRs. Esta técnica é empregada para identificação de antígenos virais associados às células e para isto, utiliza anticorpos marcados com corantes fluorescentes (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

1.3.4 Diagnóstico molecular dos vírus respiratórios

Mais recentemente, técnicas de diagnóstico molecular também estão sendo utilizadas para detecção de VRs em diferentes contextos (FILLATRE et al., 2018). Estas técnicas se baseiam na identificação de uma sequência única do genoma viral (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

As técnicas de biologia molecular se tornaram uma ferramenta fundamental para detecção de vírus, para monitoramento de carga viral, acompanhamento de terapia antiviral e para genotipagem de vírus (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Estes novos métodos moleculares trouxeram rapidez na detecção e identificação de patógenos, principalmente nos casos de amostras clínicas com patógenos de difícil cultivo ou com pouca quantidade (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

1.3.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Na década de 1980, foi desenvolvida uma técnica de biologia molecular revolucionária, a reação em cadeia da polimerase (PCR) (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010).

A PCR é uma técnica de amplificação, *in vitro*, de um fragmento específico de DNA (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010), onde, inicialmente, o ácido nucleico (DNA ou RNA) é isolado da amostra clínica do paciente ou da cultura de células infectadas. Se o material genético for RNA, antes da amplificação, este deve ser convertido em DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT-PCR) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Na PCR, os iniciadores são os oligonucleotídeos (*primers*), que hibridizam com as fitas complementares de uma sequência-molde (alvo ou *template*) do DNA que será amplificado (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). São os *primers* que estabelecem a especificidade e tamanho do produto amplificado (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A reação é cíclica, com repetidos ciclos formados por variações de temperatura, necessárias para a desnaturação do DNA, hibridização dos *primers* ao DNA-alvo e extensão da fita de nucleotídeos a partir dos *primers* hibridados, sendo

esta última etapa realizada pela DNA polimerase (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010). O tampão, utilizado na técnica, favorece a atividade da DNA polimerase, que utiliza os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) adicionados na solução de reação (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Ao final de múltiplos ciclos, o resultado é o acúmulo exponencial de um fragmento específico de DNA (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010). E este produto amplificado é chamado de *amplicon*. O *amplicon* pode ser visualizado através de eletroforese e coloração em gel, ou detectado por hibridização com sondas específicas (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

1.3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*Real Time PCR*)

A PCR em tempo real surgiu como uma evolução da PCR convencional, e é também conhecida como PCR quantitativa (qPCR), por permitir a contagem de cópias de genoma (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010).

É considerada uma automatização da PCR convencional, utiliza equipamento específico, com uma metodologia mais eficiente, rápida e segura, que permite acompanhar visualmente a amplificação do produto da PCR. Isto é possível devido à utilização de *primers*, sondas ou marcação dos produtos amplificados com moléculas fluorescentes, que produzem a fluorescência quando se ligam ou hibridizam com o produto amplificado (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A análise da PCR em tempo real é realizada através de um gráfico que relaciona o número de ciclos com a intensidade da fluorescência, com a formação de uma curva sigmoideal quando há amplificação do alvo específico (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Nos ciclos iniciais, as amplificações não podem ser visualizadas, pois não ultrapassam o limiar do sinal de fundo (*background*). O ponto em que a fluorescência ultrapassa esse sinal de fundo é chamado limiar do ciclo ou ponto de ultrapassagem ou ainda *cycle threshold* (CT). Posteriormente, quando há uma quantidade maior de produto amplificado, a progressão exponencial do teste pode ser monitorada na fase linear. Conforme os reagentes vão sendo consumidos pela geração de *amplicons*, a reação entra numa fase de transição e logo após, numa fase de platô, onde ocorre o ponto máximo da fluorescência (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Os produtos da PCR em tempo real podem ser detectados, por três principais métodos: *SYBR Green*, *Taqman* e Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O *SYBR Green* é o método mais simples, e gera fluorescência quando se liga ao DNAfd, sendo que a intensidade da fluorescência é proporcional a quantidade de produto amplificado. Um inconveniente deste método é a inespecificidade do fluoróforo, o qual não se liga apenas ao DNAfd amplificado, mas também com dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos, gerando fluorescência indevida. O *SYBR Green* é liberado quando a temperatura de dissociação (*melting point*) da DNAfd é atingida, e então a fluorescência diminui pela abertura das fitas. Esta temperatura varia conforme a sequência e o tamanho do produto da PCR, sendo possível assim, distinguir o produto desejado do indesejado pela temperatura específica de abertura das fitas (desnaturação) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O sistema *Taqman* é baseado na interação de sondas marcadas com substâncias fluorescentes. A sonda é complementar ao segmento do produto da PCR pretendido, em uma sequência localizada entre os *primers* da reação. O FRET também é um sistema baseado no uso de duas sondas com corantes fluorescentes que interagem uma com a outra, segundo o princípio da transferência de energia de ressonância fluorescente (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O PCR em tempo real pode ser também realizado em *multiplex*, o que significa que podem ser utilizados mais do que um conjunto de *primers* e sondas, permitindo a detecção de múltiplos alvos na mesma reação, o que deixa o diagnóstico mais rápido e com menor custo (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A disponibilidade de técnicas moleculares, como a PCR em tempo real *multiplex*, aumentou consideravelmente a sensibilidade dos diagnósticos virais em comparação com os métodos convencionais (MAYER et al., 2017). Além disto, estas técnicas são superiores no tempo de execução e tempo de resposta. A rápida identificação de patógenos respiratórios tem um impacto significativo no auxílio da prevenção e tratamento dos pacientes (FILLATRE et al., 2018).

Embora o custo dos reagentes nos testes moleculares sejam maiores, tem sido demonstrado que quando corretamente prescritos, são economicamente viáveis e podem até gerar significantes economias (FILLATRE et al., 2018).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. J. et al. 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. **Archives of Virology**, v. 162, p. 1441–1446, 2017.

ALBERNAZ, P. L. M. et al. **Otorrinolaringologia para o clínico geral**. 1. ed. São Paulo, SP: Byk, 1997.

ALBUQUERQUE, M. C. M. **Infecções respiratórias virais em crianças nas cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

ALSHAMMARI, M. S. et al. The common microbial causes of otitis media with especial focus in Saudi Arabia. **Research in Otolaryngology**, v. 6, n. 5, p. 67–72, 2017.

AMORIM, D. S. et al. Prática clínica otite média aguda. **Revista Clínica e Terapêutica**, v. 30, n. 1, p. 14–18, 2004.

BORGES, L. R. et al. Achados audiológicos e comportamentais em crianças submetidas à miringoplastia bilateral - um estudo comparativo. **Revista CEFAC**, v. 18, n. 4, p. 881–888, 2016.

BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2012.

CARVALHO, C. V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. **Guia de Práticas em Biologia Molecular**. São Caetano do Sul, SP: Yendis, 2010.

CHONMAITREE, T. Acute otitis media is not a pure bacterial disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 1423–1425, 2006.

CHONMAITREE, T. et al. Acute otitis media and other complications of viral respiratory infection. **Pediatrics**, v. 137, n. 4, p. 1–10, 2016.

COSTA, S. S. et al. Como diagnosticar e tratar otite média aguda. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 68, n. 9, p. 253–263, 2011.

DEANTONIO, R. et al. Epidemiology of otitis media in children from developing countries: A systematic review. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 85, p. 65–74, 2016.

DOWELL, S. F. et al. Otitis Media—Principles of Judicious Use of Antimicrobial Agents. **Pediatrics**, v. 101, n. suppl, p. 165–171, 1998.

FIGUEIREDO, L. T. M. Pneumonias virais: aspectos epidemiológicos, clínicos, fisiopatológicos e tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 9, p. 899–906, 2009.

FILLATRE, A. et al. Epidemiology and seasonality of acute respiratory infections in hospitalized children over four consecutive years (2012–2016). **Journal of Clinical Virology**, v. 102, p. 27–31, 2018.

HEIKKINEN, T. The role of respiratory viruses in otitis media. **Vaccine**, v. 19, p. 51–55, 2001.

HEIKKINEN, T. Respiratory viruses and children. **Journal of Infection**, v. 72, p. S29–S33, 2016.

HEIKKINEN, T.; CHONMAITREE, T. Importance of respiratory viruses in acute otitis media. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 230–241, 2003.

<https://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=bocavirus-humano&id=8855>.
Representação da estrutura da partícula do hBoV. Acesso em 25/05/2019.

<https://www.niehs.nih.gov/research/atniehs/labs/iidl/pi/enviro-gen/studies/rsv/index.cfm>.
Representação da estrutura da partícula do RSV. Acesso em 25/05/2019.

KUTTER, J. S. et al. Transmission routes of respiratory viruses among humans.

Current Opinion in Virology, v. 28, p. 142–151, 2018.

LEOTTE, J. et al. Impact and seasonality of human rhinovirus infection in hospitalized patients for two consecutive years. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 3, p. 294–300, 2017.

LOURENÇÃO, L. G. et al. Infecções pelo Vírus Sincicial Respiratório em crianças. **Pulmao RJ**, v. 14, n. 17, p. 59–68, 2005.

MARTINES, F. et al. Factors influencing the development of otitis media among Sicilian children affected by upper respiratory tract infections. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82, n. 2, p. 215–222, 2016.

MAYER, L. M. et al. Impact of viral multiplex real-time PCR on management of respiratory tract infection: a retrospective cohort study. **Pneumonia**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Informe Técnico 21^a Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza**. Brasília-DF: [s.n.].

MONOBE, H. et al. Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 67, n. 7, p. 801–806, 2003.

NETO, J. F. L.; HEMB, L.; SILVA, D. B. Systematic literature review of modifiable risk factors for recurrent acute otitis media in childhood. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 2, p. 87–96, 2006.

NOKSO-KOIVISTO, J. et al. Importance of viruses in acute otitis media. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 27, n. 1, p. 110–115, 2016.

OYAMADA, L. H. et al. Otite média aguda. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 6, n. 1, p. 63–66, 2014.

PENIDO, N. O. et al. Complications of otitis media - a potentially lethal problem still

present. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82, n. 3, p. 253–262, 2016.

PEREIRA, M. B. R.; RAMOS, B. D. Otite média aguda e secretora. **Jornal de Pediatria**, v. 74, n. Supl.1, p. S21-30, 1998.

PETTIGREW, M. M. et al. Viral-bacterial interactions and risk of acute otitis media complicating upper respiratory tract infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3750–3755, 2011.

PETTIGREW, M. M. et al. Panel 6: Vaccines. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 156, n. 4S, p. S76–S87, 2017.

PILGER, D. A. **Detecção molecular de Bocavírus humano e Metapneumovírus humano associados à infecção respiratória aguda**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

PILTCHER, O. et al. **Rotinas em otorrinolaringologia**. 1. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2015.

Portal Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

RAMAKRISHNAN, K.; SPARKS, R. A.; BERRYHILL, W. E. Diagnosis and treatment of otitis media. **American Family Physician**, v. 76, n. 11, p. 1650–1658, 2007.

ROCHA, M. O. C.; PEDROSO, E. R. P. **Fundamentos em Infectologia**. 1. ed. Rio de Janeiro, RJ: Rubio, 2009.

ROVERS, M. M. et al. Otitis media. **The Lancet**, v. 363, p. 465–473, 2004.

RUOHOLA, A. et al. Microbiology of acute otitis media in children with tympanostomy tubes: prevalences of bacteria and viruses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 11, p. 1417–22, 2006.

RUOHOLA, A. et al. Bacterial and viral interactions within the nasopharynx contribute

to the risk of acute otitis media. **Journal of Infection**, v. 66, n. 3, p. 247–254, 2013.

SAFFER, M.; MOCELLIN, M. **Otorrinolaringologia Pediátrica**. 1. ed. Rio de Janeiro, RJ: Medsi, 1989.

SALIH, A. M.; AL-KHAFAJI, J. K. T.; AL-MOLA, G. A. J. Molecular detection of par influenza virus 1, 2, 3 e 4 serotypes and immunological response in otitis media patients in Babylon-Iraq. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 10, n. 9, p. 112–116, 2017.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução a Virologia Humana**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução a Virologia Humana**. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008.

SCHILDER, A. G. M. et al. Panel 7: Otitis Media: Treatment and Complications. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 156, n. 4_suppl, p. S88–S105, 2017.

SCOTTA, M. C. Influenza em pediatria. **Boletim Científico de Pediatria**, v. 2, n. 2, p. 47–52, 2013.

SHAWABKEH, M. A. et al. Acute otitis media - An update. **Journal of Otolaryngology**, v. 8, n. 4, p. 1–6, 2017.

SIH, T. **Infectologia em Otorrinopediatria – Uso Criterioso de Antibióticos em Infecções das Vias Aéreas Superiores**. 1. ed. Rio de Janeiro, RJ: Revinter, 2001.

STOCKMANN, C. et al. Seasonality of acute otitis media and the role of respiratory viral activity in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 4, p. 314–319, 2014.

THOMAS, J. P. et al. Acute otitis media—a structured approach. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 111, n. 9, p. 151–160, 2014.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2008.

WU, P. W. et al. Impact of influenza vaccine on childhood otitis media in Taiwan: A population-based study. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2018.

YATSYSHINA, S. et al. Detection of respiratory pathogens in pediatric acute otitis media by PCR and comparison of findings in the middle ear and nasopharynx. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, n. 1, p. 125–130, 2016.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Pesquisar a prevalência de vírus respiratórios em amostras de ácidos nucleicos extraídos de secreções de ouvido médio de crianças, por PCR em tempo real.

3.2 Objetivos específicos

- Revisar bibliografias sobre prevalência de vírus respiratórios como agentes etiológicos de otites médias;
- Padronizar método baseado em PCR tempo real para a detecção de vírus respiratórios em amostras de ácidos nucleicos extraídos de secreções de ouvido médio;
- Detectar os principais vírus respiratórios em amostras de ácidos nucleicos extraídos de secreções de ouvido médio através da técnica de PCR em tempo real.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 Manuscrito

Detecção de vírus respiratórios em fluídos de orelha média de crianças com otite média aguda recorrente por PCR em tempo real. Será submetido à revista *Jornal de Pediatria*, cujas normas para publicação estão no link: <http://jped.elsevier.es/pt-guia-autores>

2017 Fator de Impacto: 1,690

Detecção de vírus respiratórios em fluídos de orelha média de crianças com otite média aguda recorrente por PCR em tempo real

RESUMO

Objetivo: Pesquisar a prevalência de vírus respiratórios (VRs) em amostras de fluído de orelha média de crianças com otite média aguda recorrente (OMAR), por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real).

Método: O estudo incluiu 107 crianças, provenientes de uma clínica de otorrinolaringologia pediátrica, que apresentavam diagnóstico médico de OMAR e indicação cirúrgica. Coletas de fluídos de orelha média destas crianças foram realizadas, totalizando 204 amostras, e todas testadas para dez VRs: vírus influenza A e B (FluV A e B), vírus sincicial respiratório (RSV), vírus parainflueza 1, 2 e 3 (PIV 1, 2 e 3), rinovírus humano (hRNV), metapneumovírus humano (hMPV), adenovírus (AdV) e bocavírus humano (hBoV), por PCR em tempo real.

Resultados: Do total de crianças incluídas, 27,1% (29) tiveram suas amostras de fluído de orelha média positivas para os VRs analisados, uni ou bilateralmente. A prevalência de VRs encontrada foi de 13,1% (14) para hBoV, 7,5% (8) para AdV, 6,5% (7) para hRNV, 1,9% (2) para PIV 3 e 0,9% (1) para PIV 1. Os vírus FluV A, FluV B, RSV, hMPV e PIV 2 não foram detectados nas amostras dos participantes deste estudo.

Conclusões: Neste estudo foi possível detectar a presença de hBoV, AdV, hRNV, PIV 1 e 3 em amostras de fluído de orelha média de crianças com OMAR, sugerindo a participação destes VRs nesta patologia. Contudo, novos estudos são necessários para maior conhecimento da participação dos VRs e da epidemiologia da OMA em nosso país.

Palavras-chave: Otite média aguda (recorrente); Fluído de orelha média; Vírus respiratórios; PCR em tempo real.

Detection of respiratory viruses in middle ear fluids of children with recurrent acute otitis media by real-time PCR

ABSTRACT

Objective: To investigate the prevalence of respiratory viruses (RVs) in samples of middle ear fluid of children with recurrent acute otitis media (RAOM), by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).

Method: The study included 107 children coming from a pediatric otorhinolaryngology clinic who presented RAOM medical diagnosis and surgical indication. Fluids collections from the children's middle ears were performed, totaling 204 samples, all tested for ten RVs: influenza A and B viruses (FluV A and B), respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza viruses 1, 2 and 3 (PIV 1, 2 and 3), human rhinovirus (hRVN), human metapneumovirus (hMPV), adenovirus (AdV) and human bocavirus (hBoV), by real-time PCR.

Results: Out of the total number of children included, 27,1% (29) had samples positives of middle ear fluid for the RVs analyzed, uni or bilaterally. The prevalence of RVs found was 13,1% (14) for hBoV, 7,5% (8) for AdV, 6,5% (7) for hRVN, 1,9% (2) for PIV 3 and 0,9% (1) for PIV 1. FluV A, FluV B, RSV, hMPV and PIV 2 viruses were not detected in the samples of the participants in this study.

Conclusions: In this study it was possible to detect the presence of hBoV, AdV, hRVN, PIV 1 and 3 in the samples of middle ear fluid of children with RAOM, suggesting the participation of these RVs in this pathology. However, new studies are necessary to better understand the participation of RVs and the epidemiology of AOM in our country.

Keywords: Acute otitis media (recurrent); Middle ear fluid; Respiratory viruses; Real-time PCR.

INTRODUÇÃO

A otite média aguda (OMA) é uma das doenças infecciosas mais comuns em crianças, sendo considerada a principal causa de consultas médicas, prescrição de antibióticos e cirurgias na prática pediátrica (1). A doença caracteriza-se pela presença de secreção na orelha média, associada ao rápido desenvolvimento de sinais e sintomas inflamatórios da mesma. Na ocorrência de três episódios de OMA em seis meses ou quatro episódios em um ano, se caracteriza como OMA recorrente (OMAR) (2).

Em aproximadamente 70% dos casos, a OMA pode ser resultado de uma infecção bacteriana (3), sendo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* as principais espécies bacterianas relacionadas, seguidas por *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* em um menor número de casos (4).

Entretanto, os vírus podem ter um papel crucial no desenvolvimento da OMA (5,6), pois, na maioria das vezes, esta patologia ocorre concomitantemente ou logo após uma infecção viral do trato respiratório superior (7,8). Sendo assim, os vírus respiratórios (VRs) podem estar envolvidos no início da cascata de eventos que levam ao desenvolvimento de OMA, podendo apresentar um importante papel em cada estágio da patogênese desta doença (9).

Durante as infecções do trato respiratório superior os VRs causam inflamações na nasofaringe e na tuba auditiva, capazes de estimular respostas imunes e inflamatórias no hospedeiro, como a produção de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios, e de provocar alterações na microbiota bacteriana da nasofaringe, aumentando a colonização e a aderência bacteriana nas células epiteliais. Estas reações favorecem a diminuição da atividade mucociliar normal da nasofaringe e da tuba auditiva, ocasionando disfunção da tuba auditiva e resultando na formação de uma pressão negativa na orelha média, com sucção de secreções da nasofaringe com bactérias e VRs para a orelha média. O acúmulo destas secreções acaba por gerar aumento da pressão local na orelha média, originando o aparecimento dos sinais e sintomas da OMA (10).

A importância dos vírus na etiopatogênese da OMA tem sido elucidada ao longo dos últimos anos através do desenvolvimento de testes para o diagnóstico

viral (11), principalmente com o advento de métodos moleculares em laboratórios, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que contribuiu para um grande aumento nas taxas de detecção viral em amostras de orelha média (12). Em crianças com OMA, métodos diagnósticos convencionais e moleculares para VRs têm identificado a presença destes vírus em fluídos de orelha média em cerca de 20 à 70% dos casos (10). Todavia, em aproximadamente dois terços dos casos os VRs estão presentes juntamente com bactérias, como prováveis co-patógenos (13).

Estes dados epidemiológicos sobre a etiologia viral das OMAs provêm de estudos realizados em diferentes locais do mundo, mas o conhecimento sobre a participação de vírus é ainda incompleto. Visto isto, o presente estudo objetivou estudar a prevalência de VRs em amostras de fluído de orelha média de crianças brasileiras com diagnóstico de OMAR.

MATERIAIS E MÉTODOS

População do estudo

Foram incluídas neste estudo crianças com idades entre nove meses e dez anos, provenientes de uma clínica de otorrinolaringologia pediátrica de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil), que apresentavam diagnóstico médico de OMAR, com indicação de miringotomia e colocação de tubos de ventilação, no período de julho de 2016 a outubro de 2017.

As inclusões das crianças no estudo foram realizadas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos pais das crianças ou seus responsáveis legais. O projeto de estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), conforme parecer 2.729.306.

Crianças que apresentaram outras infecções das vias aéreas superiores, otorrêia ou tratamento antibioticoterápico vigente ou concluído há menos de sete dias da realização do procedimento cirúrgico foram excluídas do estudo.

Coleta das amostras

Amostras de fluído de orelha média das crianças foram coletadas por otorrinolaringologistas através de timpanocentese. Este procedimento cirúrgico foi

executado com o participante sob anestesia geral e com auxílio de microscopia, após a limpeza do conduto auditivo externo.

Para realização deste procedimento utilizou-se coletor Alden-Senturia, adaptado à agulha de calibre 18, a qual foi inserida no quadrante ântero-inferior da membrana timpânica. Foi coletada uma amostra por orelha afetada, portanto, em crianças com OMA unilateral, infecção em apenas uma das orelhas, apenas uma amostra foi coletada, enquanto que crianças com OMA bilateral, infecção em ambas as orelhas, duas amostras foram coletadas, para serem analisadas separadamente.

Após a timpanocentese acima descrita, realizou-se a miringotomia para aspiração do restante de secreção e a inserção dos tubos de ventilação. O material clínico coletado foi congelado e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia Molecular da UFCSPA para análise molecular viral.

Extração dos ácidos nucleicos

A extração dos ácidos nucleicos totais (DNA ou RNA) das amostras de fluido de orelha média foi realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular da UFCSPA.

Para extração, 50µL de fluido de orelha média foram diluídos em 150µL de água livre de nucleases e então submetidos ao ReliaPrep Viral Nucleic Acid Purification Kit (Promega, Madison, EUA), conforme as instruções do fabricante. Os ácidos nucleicos totais purificados foram armazenados a -80°C.

PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados por *SYBR Green* com o kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, EUA), conforme as instruções do fabricante. Dois ensaios de PCR em tempo real *multiplex* foram otimizados. O ensaio 1 foi desenvolvido para amplificação simultânea dos vírus influenza A (FluV A) e B (FluV B) e vírus sincicial respiratório (RSV), enquanto o ensaio 2 foi desenvolvido para amplificar simultaneamente os vírus parainfluenza 1 (PIV 1), parainfluenza 2 (PIV 2) e parainfluenza 3 (PIV 3). Já os vírus rinovírus humano (hRV), metapneumovírus humano (hMPV), adenovírus (AdV) e bocavírus humano (hBoV) foram detectados por ensaios de PCR em tempo real individuais. Todos os ensaios incluíram controles negativos e positivos para cada vírus pesquisado.

As reações foram realizadas com volume final de 10µL, utilizando 200nM de pares de oligonucleotídeos e 2,0µL de ácidos nucleicos extraídos. Os oligonucleotídeos utilizados foram previamente descritos por Pilger *et al.* (2011)(14).

A amplificação dos alvos específicos foi realizada no termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Para vírus RNA a ciclagem térmica consistiu em um ciclo de 50°C por 15 minutos para transcrição reversa (RT), seguido de um ciclo de 95°C por 10 minutos para inativação da RT, e 35 ciclos para PCR de 95°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com curva de dissociação com temperaturas entre 60 - 95°C. Para vírus DNA, foi realizado um ciclo inicial de 95°C por 2 minutos, seguidos dos 35 ciclos para PCR. A identificação individual dos vírus foi realizada pela análise da curva de dissociação, característica para cada VR.

As amostras positivas pelos ensaios de PCR em tempo real *multiplex* foram repetidas por PCRs em tempo real individuais, específicas para cada vírus, utilizando o mesmo protocolo desenhado para os ensaios anteriores.

Ensaio de PCRs em tempo real individuais utilizando metodologia Taqman e o kit GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, EUA), foram realizados conforme as orientações do fabricante, para confirmação de todas amostras positivas para hRNV, hMPV, AdV e hBoV. Em cada ensaio foram incluídos controles negativos e positivos.

Para estes ensaios foram realizadas reações com volume final de 10µL, com 200nM de pares de oligonucleotídeos e 2,0µL de ácidos nucleicos extraídos. Os oligonucleotídeos e sondas utilizados foram reproduzidos de Pilger *et al.* (2011)(14).

A amplificação dos alvos específicos também foi realizada no termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Para vírus RNA, as condições de amplificação consistiram em um ciclo de 50°C por 15 minutos para RT, seguido de um ciclo de 95°C por 5 minutos para inativação da RT e em 40 ciclos para PCR de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Para vírus DNA, as condições de amplificação estabelecidas foram um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos dos 40 ciclos para PCR.

RESULTADOS

Os resultados deste estudo foram provenientes de 107 crianças com OMAR. Destas, 90,7% (97) apresentavam OMA bilateral e 9,3% (10) OMA unilateral, assim, totalizando 204 amostras de fluído de orelha média obtidas e analisadas por PCR em tempo real. A média de idade das crianças foi de 26,64 meses e a mediana de 21 meses, sendo 55% (59) crianças do sexo masculino e 45% (48) do sexo feminino.

Do total de 107 crianças, 27,1% (29) tiveram amostras de fluído de orelha média positivas para detecção dos VRs analisados. Destas 29 crianças, 89,7% (26) apresentavam OMA bilateral e 10,3% (3) OMA unilateral. Das 26 crianças com OMA bilateral, 50% (13) apresentaram positividade em apenas uma das duas amostras coletadas das orelhas médias e 50% (13) tiveram as duas amostras coletadas das orelhas médias positivas para o mesmo vírus, conforme Tabela 1.

Entre as crianças com amostras de fluído de orelha média positivas, 3 delas com OMA bilateral, apresentaram amostras com detecção de mais de um agente. Uma criança apresentou apenas uma amostra positiva com co-deteção para hBoV e hRNV. Uma segunda criança apresentou as duas amostras de fluído de orelha média positivas para hBoV, com uma das amostras também positiva para AdV. Uma terceira apresentou as duas amostras positivas para hRNV e apenas uma delas também positiva para hBoV.

Sendo assim, das 27,1% (29) crianças detectadas com um ou dois VRs nos fluídos de orelha média, o HBoV foi detectado em 13,1% (14) das crianças, o AdV foi detectado em 7,5% (8), o hRNV em 6,5% (7), o PIV 3 em 1,9% (2) e o PIV 1 em 0,9% (1) das crianças. Os vírus FluV A e B, o RSV, o hMPV e o PIV 2 não foram detectados nas amostras de fluído de orelha média das crianças deste estudo.

DISCUSSÃO

Primeiramente, analisando a população do estudo podemos destacar como aspecto relevante a idade mediana de 21 meses das crianças. Consideramos a mediana para avaliação da idade da população do estudo como uma variável mais fidedigna em relação à média para avaliar a distribuição de idade das crianças. A

idade é considerada um fator de risco para OMA, pois a grande prevalência desta doença acontece na primeira infância (15), sendo que, o maior pico de incidência ocorre entre os seis e vinte e quatro meses de idade. Nesta idade, a tuba auditiva é mais curta e menos inclinada e as respostas fisiológicas e imunológicas das crianças são subdesenvolvidas em casos de infecções (16).

As análises dos resultados das PCRs em tempo real revelaram a presença de ácidos nucleicos virais em amostras de fluído de orelha média de 27,1% das crianças. Nos estudos de Ruohola *et al.* (2006), Wiertsema *et al.* (2011) e Yatsyshina *et al.* (2016), que também pesquisaram patógenos respiratórios em fluídos de orelha média de crianças com OMA através de PCR, a prevalência de VRs foi de 70%, 71,3% e 14,5%, respectivamente (11,18,19). Esses e outros estudos indicam uma ampla variação na taxa de detecção dos VRs nas amostras de fluído da orelha média. De acordo com Yatsyshina *et al.* (2016), a prevalência e a distribuição dos vírus em fluídos de orelha média não tem sido consistentes, variando conforme as diferentes configurações dos estudos e regiões geográficas, apresentando flutuações sazonais e inconsistências dependentes do método de detecção (19). Em nosso estudo, o VR mais prevalente encontrado nas amostras de fluído de orelha média das crianças com OMAR foi o hBoV, em 13,1% do total das crianças. Wiertsema *et al.* (2011) encontraram o hBoV em 8,4% das efusões de orelha média de crianças com OMAR, sendo o segundo vírus mais detectado no estudo (18). Ruohola *et al.* (2006) e Yatsyshina *et al.* (2011), identificaram a presença do hBoV em 4,0% e 1,1% das efusões de orelha média das crianças, respectivamente (11,19). O hBoV é um parvovírus descrito pela primeira vez em 2005 (20). Diversos estudos têm detectado o hBoV em amostras nasais de crianças com infecções virais do trato respiratório superior e em fluídos de orelha média de crianças com OMA. No entanto, o papel do hBoV como um patógeno respiratório tem sido debatido (21), pois estes estudos poderiam estar indicando um papel patogênico relevante ao hBoV em crianças com OMA, mas poderiam também estar refletindo apenas a presença deste agente sem relação com a patologia (22). Em concordância com a última hipótese, Martin *et al.* (2010) identificaram o hBoV em 44% de crianças assintomáticas em um estudo envolvendo infecções do trato respiratório superior de crianças pequenas frequentadoras de creches, e também observou que crianças infectadas por hBoV podem eliminar o vírus por vários meses

(23). Sendo assim, se o hBoV desempenha um papel na patogênese da OMA, as altas taxas do vírus nas crianças assintomáticas poderiam ser explicadas por episódios de infecção na orelha associados com hBoV em semanas ou meses anteriores ao estudo (22).

AdV foi o segundo VR mais encontrado em nosso estudo, em 7,5% das crianças. Do mesmo modo, Yatsyshina *et al.* (2016) também reportaram o AdV como o segundo vírus mais detectado, em 3,4% das crianças. E conforme o referido estudo, apenas AdV e hRNV tiveram uma representação apreciável nas amostras de fluído de orelha média das crianças inclusas no estudo (19).

O hRNV foi detectado em 6,5% das crianças deste estudo. No estudo de Ruohola *et al.* (2006) hRNVs foram os vírus mais detectados em fluídos de orelha média, em 20% dos participantes (11). Wiertsema *et al.* (2011) reportaram hRNVs em 46,2% dos participantes com OMAR (18), também como VR mais prevalente. Da mesma forma, Yatsyshina *et al.* (2016) encontraram hRNV em 9,5% dos participantes (19). Esses resultados demonstram uma alta taxa de infecção por hRNV em crianças e sugerem a importância deste vírus na otite média.

Estudos anteriores, que utilizavam cultura viral e métodos de detecção de antígenos, enfatizavam o RSV como o VR mais prevalente em aspirados de nasofaringe e em fluídos de orelha média de crianças com OMA, mas estudos utilizando ensaios de PCR têm indicado que os hRNVs são predominantes (18).

Conforme Yatsyshina *et al.* (2016), o RSV que era consistentemente detectado como um dos mais frequentes vírus em fluídos de orelha média, foi encontrado em apenas um participante do estudo (19). Este resultado corrobora o resultado do presente estudo, onde o RSV não foi detectado em amostra de fluído de orelha média das crianças estudadas. Do mesmo modo, o hMPV, pertencente a mesma família do RSV, não foi detectado em ambos estudos supracitados.

No presente o estudo, dentre os PIVs, o PIV 3 foi identificado em 2 (1,9%) crianças, o PIV 1 em apenas 1 (0,9%) criança e o PIV 2 não foi identificado, o que está de acordo com Wiertsema *et al.* (2011), que detectaram PIV 3 em 3 participantes, PIV 1 e PIV 2 em 1 participante cada (18), estando também em conformidade com outros estudos, onde consta que o tipo 3 é o mais prevalente, seguido pelos tipos 1 e 2 (24).

Assim como o RSV, hMPV e PIV 2, os vírus FluV A e FluV B não foram detectados no presente estudo. Todavia, o vírus influenza é o único VR associado à otite média para o qual há vacina licenciada (12). Sabe-se que a eficácia da vacina contra influenza varia a cada estação, pois depende da correspondência antigênica entre os vírus contidos na vacina e as cepas virais circulantes na população (9). Contudo, a vacina contra o vírus influenza para crianças tem sido recomendada nos últimos anos e tem se mostrado efetiva na prevenção do vírus influenza sazonal e da influenza associada à OMA. Além disso, o tratamento precoce com terapia antiviral no curso da influenza também tem reduzido as taxas de complicação com OMA (10). Não temos o conhecimento da situação vacinal das crianças deste estudo para influenza e nem dados sobre terapia antiviral, mas acredita-se que a vacina e a terapia antiviral podem ser responsáveis pela ausência de detecção deste vírus no estudo.

A população do nosso estudo incluiu apenas indivíduos com OMAR e indicação cirúrgica, talvez com maior proporção de bactérias em relação aos vírus nos fluídos de orelha média. Entretanto, não existe a possibilidade de coleta de fluído de orelha média em pessoas sem indicação de cirurgia, o que impede o acesso e comparação com este grupo de indivíduos.

Estudos epidemiológicos diversos sobre o papel de VRs em OMA têm sido realizados em diferentes países, entretanto, no Brasil tais estudos ainda são escassos ou inexistentes. Os dados referentes a esta patologia são derivados de regiões do globo com variações ambientais e sazonais diferentes da realidade brasileira. Desta forma, sugerimos que mais estudos sejam realizados, abrangendo um maior período de tempo, maior número de amostras e com uma maior gama de tipos de VRs a serem pesquisados, a fim de se conhecer melhor a epidemiologia desta doença no Brasil, e conseqüentemente, contribuir para uma melhor tomada de medidas de prevenção e tratamento, baseadas em dados com maior representatividade da nossa realidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chonmaitree T, Trujillo R, Jennings K, Alvarez-Fernandez P, Patel JA, Loeffelholz MJ, *et al.* Acute otitis media and other complications of viral

- respiratory infection. *Pediatrics*. 2016;137(4):1–10.
2. Dowell SF, Marcy M, Phillips WR, Gerber MA, Schwartz B. Otitis Media—Principles of Judicious Use of Antimicrobial Agents. *Pediatrics*. 1998;101(suppl):165–71.
 3. Dan T, Eugene L, Adi A, Lolita P, Simon R, Alberto L, *et al*. Acute otitis media in infants younger than two months of age: microbiology, clinical presentation and therapeutic approach. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21(7):669–74.
 4. Klein JO. Otitis media. *Clin Infect Dis*. 1994;19(5):823–33.
 5. Ruuskanen O, Arola M, Heikkinen T, Ziegler T. Viruses in acute otitis media: increasing evidence for clinical significance. *Pediatr Infect Dis J*. 1991;10(6):425–27.
 6. Chonmaitree T, Heikkinen T. Role of Viruses in Middle-ear Disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;830:143–57.
 7. Heikkinen T. Role of viruses in the pathogenesis of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 2000.19(suppl):S17–23.
 8. Winther B, Doyle WJ, Alper CM. A high prevalence of new onset otitis media during parent diagnosed common colds. *Internat J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006.70(10):1725–30.
 9. Heikkinen T. Respiratory viruses and children. *J Infect*. Elsevier Ltd; 2016;72:S29–33.
 10. Nokso-koivisto J, Marom T, Chonmaitree T, Surgery N, Wolfson E, Aviv T, *et al*. Importance of viruses in acute otitis media. *Curr Opin Pediatr*. 2016;27(1):110–15.
 11. Ruohola A, Meurman O, Nikkari S, Skottman T, Salmi A, Waris M, *et al*. Microbiology of acute otitis media in children with tympanostomy tubes:

- prevalences of bacteria and viruses. *Clin Infect Dis*. 2006;43(11):1417–22.
12. Heikkinen T, Chonmaitree T. Importance of respiratory viruses in acute otitis media. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(2):230–41.
 13. Chonmaitree T. Acute otitis media is not a pure bacterial disease. *Clin Infect Dis*. 2006;43:1423–25.
 14. Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, Leistner-Segal S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(1):56–60.
 15. Borges LR, Sanfins MD, Hein TAD, Paschoal JR, Colella-Santos MF. Achados audiológicos e comportamentais em crianças submetidas à miringoplastia bilateral - um estudo comparativo. *Rev CEFAC*. 2016;18(4):881–88.
 16. Ramakrishnan K, Sparks RA, Berryhill WE. Diagnosis and treatment of otitis media. *Am Fam Physician*. 2007;76(11):1650–58.
 17. Pereira MBR, Ramos BD. Otite média aguda e secretora. *J Pediatr (Rio J)*. 1998;74(Supl.1):S21-30.
 18. Wiertsema SP, Chidlow GR, KirKham L-A, Corscadden KJ, Mowe EN, Vijayasekaran S, *et al*. High detection rates of nucleic acids of a wide range of respiratory viruses in the nasopharynx and the middle ear of children with a history of recurrent acute otitis media. *J Med Virol*. 2011;83:2008–17.
 19. Yatsyshina S, Mayanskiy N, Shipulina O, Kulichenko T, Alyabieva N, Katosova L, *et al*. Detection of respiratory pathogens in pediatric acute otitis media by PCR and comparison of findings in the middle ear and nasopharynx. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Elsevier B.V.; 2016;85(1):125–30.
 20. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract

samples. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(36):12891–96.

21. Pettigrew MM, Gent JF, Pyles RB, Miller AL, Nokso-Koivisto J, Chonmaitree T. Viral-bacterial interactions and risk of acute otitis media complicating upper respiratory tract infection. J Clin Microbiol. 2011;49(11):3750–55.
22. Longtin J, Gubbay JB, Patel S, Low DE. High prevalence of asymptomatic bocavirus in daycare: Is otitis media a confounder? J Infect Dis. 2010;202(10):1617.
23. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A, *et al.* Frequent and prolonged shedding of Bocavirus in young children attending daycare. J Infect Dis. 2010;201(11):1625–32.
24. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 25th ed. Porto Alegre, RS: Artmed; 2012. 813 p.

Tabela 1: Crianças com amostras de fluido de orelha média positivas para detecção de VRs, por PCR em tempo real.

VRs	Pacientes (N = 29)		
	OMA bilateral (N = 26)		OMA unilateral (N = 3)
	Apenas uma orelha positiva (N = 13)	Ambos as orelhas positivas (N= 13)	
hBoV	4	8 ^a	0
AdV	3	4 ^b	0
hRNV	3	1	2
PIV 1	1	0	0
PIV 3	1	0	1
hBoV/ hRNV	1	0	0

Obs.: ^aUma criança apresentou hRNV em ambas orelhas, sendo que em uma houve também detecção de hBoV. ^bUma criança apresentou as amostras de ambas orelhas positivas para hBoV e apenas uma delas também positiva para AdV.

5 CONCLUSÕES

- Foram detectados vírus respiratórios em amostras de fluídos de ouvido médio, por PCR em tempo real, em 29/107 (27,1%) crianças do estudo, que apresentavam diagnóstico de otite média aguda recorrente, uni ou bilateralmente.

- Do total de 107 crianças com otite média aguda recorrente, uni ou bilateralmente, foram coletadas 204 amostras de fluído de ouvido médio, que foram analisadas por PCR em tempo real. Destas 204 amostras, 42 (20,6%) foram positivas para pelo menos um dos dez VRs testados neste estudo. O bocavírus humano foi detectado em 22 (10,8%) de todas as amostras, o adenovírus foi detectado em 12 (5,9%), o rinovírus humano em 8 (3,9%), o vírus parainfluenza 3 em 2 (1,0%) e o vírus parainfluenza 1 em 1 (0,5%) amostra. Os vírus influenza A e B, o vírus sincicial respiratório, o metapneumovírus e o vírus parainfluenza 2 não foram detectados nas amostras deste estudo.

ANEXO A – Parecer de aprovação do CEP da UFCSPA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Prevalência de vírus respiratórios em secreções de ouvido médio de crianças detectados por PCR em tempo real.

Pesquisador: Vlademir Vicente Cantarelli

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 86218918.6.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.977.370

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa sobre a prevalência de vírus respiratórios em amostras de ácidos nucleicos extraídos de secreções previamente coletadas, de ouvido médio de crianças. Os ácidos nucleicos destas secreções de ouvido foram extraídos para identificação bacteriana em outro projeto de doutorado, e o presente trabalho visa a utilização dos mesmos ácidos nucleicos para detecção de agentes virais.

Objetivo da Pesquisa:

Pesquisar a prevalência de vírus respiratórios em amostras de ácidos nucleicos extraídos de secreções de ouvido médio de crianças, por PCR em tempo real.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: mínimos. As coletas já foram realizadas e as participações dos sujeitos na pesquisa são tratadas como estritamente confidenciais. Existem riscos metodológicos de falhas na técnica utilizada e riscos de inviabilidade ou falta de recursos para realização da pesquisa. Nestes casos, a pesquisa será reformulada. Os benefícios do estudo serão contribuições científicas sobre a prevalência de vírus respiratórios envolvidos em infecções de ouvido médio de crianças, visando auxiliar em estratégias e condutas clínicas futuras.

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.977.370

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma Emenda atendendo a solicitação realizada no último Parecer.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados na PB os Pareceres, ambos Aprovados, do CEP da UFRGS datado do dia 13/10/2016 e do CEP do HVM datado no dia 17/11/2016.

Anexado na PB TCLE onde informa que a pesquisa teria duração aproximadamente de 36 meses.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aceito

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_119672_9_E1.pdf	21/09/2018 21:18:25		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Novo.docx	21/09/2018 21:11:57	Maitê Marques da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Novo.pdf	21/09/2018 21:10:34	Maitê Marques da Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	22/05/2018 19:27:33	Maitê Marques da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Inicial.pdf	22/05/2018 19:27:24	Maitê Marques da Silva	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_CEP_HMV.pdf	22/05/2018 19:26:40	Maitê Marques da Silva	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_CEP_UFRGS.pdf	22/05/2018 19:26:21	Maitê Marques da Silva	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_Resposta_as_Pendencias.pdf	22/05/2018 19:25:56	Maitê Marques da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso.pdf	09/03/2018 22:26:17	Maitê Marques da Silva	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 2.977.370

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_anuencia.pdf	09/03/2018 22:25:51	Maitê Marques da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	09/03/2018 22:14:21	Maitê Marques da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 23 de Outubro de 2018

Assinado por:
Fernanda Bordignon Nunes
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

ANEXO B – Normas da revista para submissão do artigo científico

INTRODUÇÃO

Jornal de Pediatria é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP), publicada ininterruptamente pela SBP desde 1934.

O Jornal de Pediatria está indexado nas seguintes bases de dados: MEDLINE, Web of Science, Scopus, SciELO, LILACS, EMBASE/Excerpta Medica, Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) Data Bases, Medical Research Index, e University Microfilms International. O Jornal de Pediatria publica artigos no campo da investigação clínica e, excepcionalmente, artigos de pesquisa básica também são aceitos.

Tipos de Artigo

O Jornal de Pediatria aceita submissões de artigos originais, artigos de revisão e cartas ao editor. **Artigos originais** incluem relatos de estudos controlados e randomizados, estudos de triagem e diagnóstico e outros estudos descritivos e de intervenção, bem como registros sobre pesquisas básicas realizadas com animais de laboratório (ver seção **Resultados dos ensaios clínicos** mais adiante). Os manuscritos nesta categoria não devem exceder 3.000 palavras (excluindo página de rosto, referências e tabelas), 30 referências e quatro tabelas e figuras. Acesse <http://www.equator-network.org/> para informações sobre as diretrizes a serem seguidas na pesquisa em saúde para esse tipo de artigo.

Artigos de revisão incluem meta-análises, avaliações sistemáticas e críticas da literatura sobre temas de relevância clínica, com ênfase em aspectos como causa e prevenção de doenças, diagnóstico, tratamento e prognóstico. Os artigos de revisão não devem exceder 6.000 palavras (excluindo página de rosto, referências e tabelas) e devem citar no mínimo 30 referências atualizadas. Normalmente, profissionais de reconhecida experiência são convidados a escrever artigos de revisão. As metanálises estão incluídas nesta categoria. O Jornal de Pediatria também considera artigos de revisão não solicitados. Entre em contato pelo e-mail assessoria@jped.com.br para submeter um esboço ou roteiro ao Conselho Editorial antes de submeter o manuscrito completo. Acesse <http://www.equator-network.org/> para informações sobre as diretrizes a serem seguidas na pesquisa em saúde para esse tipo de artigo.

Cartas ao editor costumam expressar uma opinião, discutir ou criticar artigos publicados anteriormente no Jornal de Pediatria. As cartas não devem exceder 1.000 palavras e seis referências. Sempre que possível, uma resposta dos autores do artigo ao qual a carta se refere será publicada junto com a carta.

Editoriais e comentários, que normalmente fazem referência a artigos selecionados, são solicitados a especialistas na área. O Conselho Editorial pode considerar a publicação de comentários não solicitados, desde que os autores apresentem um esboço ao Conselho Editorial antes de submeter o manuscrito.

Idioma

Os trabalhos podem ser enviados em português ou inglês. Os artigos são publicados em inglês na versão impressa, e em inglês e português no website (html e pdf). É utilizada a ortografia americana. Portanto, os autores são aconselhados a usar o idioma com o qual eles se sentirem mais à vontade e acreditarem que se comunicarão com mais clareza. Se determinado artigo tiver sido escrito originalmente em português os autores não devem enviar uma versão em inglês, a menos que seja uma tradução de qualidade profissional.

Check-list para submissão

Você pode usar esta lista para fazer um check-list final do seu artigo antes de enviá-lo para avaliação pela revista. Por favor, verifique a seção relevante neste Guia para Autores para obter mais detalhes.

Certifique-se de que os seguintes itens estão presentes:

Um autor foi designado como o autor para correspondência, incluindo-se seus detalhes de contato: e-mail e endereço postal completo.

Todos os arquivos necessários foram entregues:

Manuscrito

Incluir palavras-chave

Todas as figuras (incluir legendas relevantes)

Todas as tabelas (incluindo títulos, descrição, notas de rodapé)

Certifique-se de que todas citações de figuras e tabelas no texto correspondem aos arquivos enviados
Arquivos suplementares (quando necessário)

Considerações adicionais

A gramática e ortografia foram verificadas

Todas as referências mencionadas na seção Referências são citadas no texto, e vice-versa

Foi obtida permissão para uso de material protegido por direitos autorais de outras fontes (incluindo a Internet)

Foram feitas declarações de conflitos de interesse relevantes

As políticas da revista detalhadas neste guia foram revisadas.

Para mais informações, visite o nosso Centro de suporte.

ANTES DE COMEÇAR

Ética na publicação

Por favor veja nossas páginas informativas sobre Ética na publicação e Diretrizes éticas para publicação em revistas científicas.

Declaração de conflito de interesse

Todos os autores devem divulgar quaisquer relações financeiras e pessoais com outras pessoas ou organizações que possam influenciar de forma inadequada (viés) seu trabalho. Exemplos de potenciais conflitos de interesse incluem empregos, consultorias, propriedade de ações, honorários, testemunhos de peritos remunerados, pedidos de patentes/inscrições e subsídios ou outros tipos de financiamento. Caso não haja conflitos de interesse, por favor, registre isso: "Conflitos de interesse: nenhum". Mais Informações.

Declaração de envio e verificação

A submissão de um manuscrito implica que o trabalho descrito não foi publicado anteriormente (exceto sob a forma de resumo ou como parte de uma palestra ou tese acadêmica publicada, ou como pré-impressão eletrônica, consulte a seção "Publicação múltipla, redundante ou concorrente" de nossa política de ética para mais informações), que não está sendo avaliado para publicação em outro lugar, que sua publicação foi aprovada por todos os autores e tácita ou explicitamente pelas autoridades responsáveis onde o trabalho foi realizado e que, se aceito, não será publicado em outro lugar na mesma forma, em inglês ou em qualquer outro idioma, inclusive eletronicamente, sem o consentimento por escrito do detentor dos direitos autorais. Para verificar a originalidade do manuscrito, ele pode ser verificado pelo serviço de detecção de originalidade CrossCheck.

Colaboradores

Cada autor é obrigado a declarar sua contribuição individual para o artigo: todos os autores devem ter participado substancialmente da pesquisa e/ou da preparação do artigo, de modo que o papel de cada um dos autores deve ser descrito. A afirmação de que todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito deve ser verdadeira e incluída na Cover Letter aos editores.

Autoria

Todos os autores devem ter contribuído de forma substancial em todos os seguintes aspectos: (1) concepção e delineamento do estudo, ou aquisição de dados, ou análise e interpretação de dados, (2) escrita do artigo ou revisão crítica do conteúdo intelectual relevante, (3) aprovação final da versão a ser submetida.

Mudanças na autoria

Espera-se que os autores avaliem cuidadosamente a lista e a ordem dos autores **antes** de submeter seu manuscrito e que forneçam a lista definitiva de autores no momento da submissão. Qualquer adição, remoção ou rearranjo de nomes de autores na lista de autoria deve ser feita somente **antes** da aceitação do manuscrito e somente se aprovado pelo editor da revista. Para solicitar tal alteração, o editor deve receber do autor para correspondência o seguinte: (a) o motivo da mudança na lista de autores e (b) confirmação por escrito (e-mail, carta) de todos os autores concordando com a adição, remoção ou rearranjo. No caso de adição ou remoção de autores, isso inclui a confirmação do autor adicionado ou removido.

Somente em circunstâncias excepcionais, o editor aceitará a adição, supressão ou rearranjo de autores após o manuscrito ter sido aceito. Enquanto o editor estiver avaliando o pedido, a publicação do manuscrito permanecerá suspensa. Se o manuscrito já tiver sido publicado on-line, qualquer solicitação aprovada pelo editor resultará em uma retificação.

Resultados dos ensaios clínicos

Um ensaio clínico é definido como qualquer estudo de pesquisa que designe prospectivamente participantes humanos ou grupos de seres humanos a uma ou mais intervenções relacionadas à saúde, para avaliar os efeitos dos desfechos de saúde. As intervenções relacionadas à saúde incluem qualquer intervenção realizada para modificar um desfecho biomédico ou relacionado à saúde (por exemplo, fármacos, procedimentos cirúrgicos, dispositivos, tratamentos comportamentais, intervenções alimentares e mudanças nos procedimentos de cuidados). Os desfechos de saúde incluem quaisquer medidas biomédicas ou relacionadas à saúde obtidas em pacientes ou participantes, incluindo medidas farmacocinéticas e eventos adversos.

De acordo com a posição do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), a revista não aceitará os resultados publicados no mesmo registro de ensaios clínicos no qual o registro primário seja uma publicação anterior se os resultados publicados forem apresentados sob a forma de um breve resumo ou tabela estruturados (menos de 500 palavras). No entanto, a divulgação de resultados em outras circunstâncias (por exemplo, reuniões de investidores) é desencorajada e pode impedir a aceitação do manuscrito. Os autores devem divulgar em sua totalidade as publicações em registros de resultados do mesmo trabalho ou relacionados a ele.

Relatos de ensaios clínicos

Ensaio controlado randomizado devem ser apresentados de acordo com as diretrizes CONSORT. Na submissão do manuscrito, os autores devem fornecer a lista de verificação CONSORT acompanhada de um fluxograma que mostre o progresso dos pacientes ao longo do ensaio, incluindo recrutamento, inscrição, randomização, remoção e conclusão, e uma descrição detalhada do procedimento de randomização. A lista de verificação CONSORT e o modelo do fluxograma estão disponíveis no seguinte link: <http://www.consort-statement.org/>. Acesse <http://www.equator-network.org/> para informações sobre as diretrizes a serem seguidas na pesquisa em saúde para esse tipo de artigo.

Registro de ensaios clínicos

A inclusão em um registro público de ensaios clínicos é uma condição para a publicação de ensaios clínicos nesta revista, de acordo com as recomendações do *International Committee of Medical Journal Editors*. Os ensaios devem ser registrados no início ou antes da inclusão dos pacientes. O número de registro do ensaio clínico deve ser incluído no fim do resumo do artigo. Estudos puramente observacionais (aqueles em que a designação da intervenção médica não está a critério do investigador) não exigirão registro.

Direitos autorais

Após a aceitação de um artigo, os autores devem assinar o *Journal Publishing Agreement* (Acordo de Publicação de Artigo) (ver mais informações sobre esse item) de forma a atribuir à Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) os direitos autorais do manuscrito e de quaisquer tabelas, ilustrações ou outro material submetido para publicação como parte do manuscrito (o "Artigo") em todas as formas e mídias (já conhecidas ou desenvolvidas posteriormente), em todo o mundo, em todos os idiomas, por toda a duração dos direitos autorais, efetivando-se a partir do momento em que o Artigo for aceito para publicação. Um e-mail será enviado ao autor para correspondência confirmando o recebimento do manuscrito junto com o *Journal Publishing Agreement* ou um link para a versão on-line desse acordo.

Direitos do Autor

Como autor, você (ou seu empregador ou instituição) tem certos direitos de reuso do seu trabalho. Mais Informações.

A Elsevier apoia o compartilhamento responsável

Descubra como você pode compartilhar sua pesquisa publicada nas revistas da Elsevier.

Papel da Fonte de Financiamento

Deve-se identificar quem forneceu apoio financeiro para a realização da pesquisa e/ou preparação do artigo e descrever brevemente o papel do(s) patrocinador(es), se houver, no delineamento do estudo; na coleta, análise e interpretação de dados; na redação do manuscrito; e na decisão de enviar o artigo para publicação. Se a fonte (ou fontes) de financiamento não teve (ou tiveram) tal participação, isso deve ser mencionado.

Acesso aberto

Esta revista é uma revista revisada por pares, de acesso aberto subsidiado pelo qual a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) arca com a maior parte dos custos de publicação da revista.

Autores de artigos submetidos a partir de **1º de setembro de 2018**, que sejam aceitos para publicação no *Jornal de Pediatria*, deverão pagar uma taxa de publicação à SBP a fim de contribuir com os custos de publicação. Ao submeterem o manuscrito a esta revista, os autores concordam com esses termos.

Valores

Autor para correspondência brasileiro e associado quite com a SBP: R\$ 1.500,00 por manuscrito aceito

Autor para correspondência brasileiro e não associado à SBP: R\$ 2.200,00 por manuscrito aceito

Autor para correspondência estrangeiro: USD 1.000,00 por manuscrito aceito.

Quando o manuscrito for aceito para publicação, o autor para correspondência receberá instruções sobre a taxa de publicação. Após o pagamento, o autor para correspondência receberá um comprovante de pagamento. Para mais informações, por favor, entre em contato com assessoria@jped.com.br.

Direitos do usuário

A permissão de reuso é definida pela seguinte licença de usuário final:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

Para fins não comerciais, permite que outros distribuam e copiem o artigo, e o incluam em um trabalho coletivo (como uma antologia), desde que se dê crédito ao(s) autor(es) e desde que não se altere ou modifique o artigo.

Elsevier Publishing Campus

O Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) é uma plataforma on-line que oferece palestras gratuitas, treinamento interativo e conselhos profissionais para apoiá-lo na publicação de sua pesquisa. A seção College of Skills oferece módulos sobre como preparar, escrever e estruturar seu artigo e explica como os editores analisarão o seu artigo quando ele for submetido para publicação. Use esses recursos para garantir que sua publicação seja a melhor possível.

Idioma (uso e serviços de edição)

Por favor, escreva o seu texto em inglês de boa qualidade (o inglês americano é usado nesta revista). Os autores que sentirem necessidade de edição do manuscrito na língua inglesa, para eliminar possíveis erros gramaticais ou ortográficos de forma a atender à demanda do correto uso do inglês científico, podem contratar o Serviço de Edição da Língua Inglesa disponível no *WebShop* da Elsevier.

Consentimento Informado e detalhes do paciente

Estudos envolvendo pacientes ou voluntários requerem a aprovação do comitê de ética e o consentimento informado, que devem ser documentados no artigo. Consentimentos, permissões e desobrigações pertinentes devem ser obtidos sempre que um autor desejar incluir detalhes de casos ou outras informações pessoais ou imagens de pacientes e de quaisquer outros indivíduos em uma publicação da Elsevier. Os consentimentos por escrito devem ser mantidos pelo autor e cópias dos consentimentos ou provas de que tais consentimentos foram obtidos devem ser fornecidos à Elsevier mediante solicitação. Para mais informações, reveja a Política da Elsevier sobre o Uso de Imagens ou Informações Pessoais de Pacientes ou Outros Indivíduos. A menos que você tenha permissão por escrito do paciente (ou, se for o caso, dos parentes mais próximos ou tutores), os detalhes pessoais de qualquer paciente incluído em qualquer parte do artigo e em qualquer material complementar (incluindo todas as ilustrações e vídeos) devem ser removidos antes da submissão.

Submissão

Nosso sistema de submissão on-line é um guia passo-a-passo dos procedimentos para inserção dos detalhes do seu manuscrito e para o upload de seus arquivos. O sistema converte os arquivos de seu artigo em um único arquivo PDF usado no processo de revisão por pares (peer-review). Arquivos editáveis (por exemplo, Word, LaTeX) são necessários para compor seu manuscrito para publicação final. Toda a correspondência, incluindo a notificação da decisão do Editor e os pedidos de revisão, são enviados por e-mail.

Submeta seu manuscrito

Por favor envie o seu manuscrito por meio do site www.evise.com/evise/jrnl/JPED.

PREPARAÇÃO

Revisão duplo-cega

Esta revista usa revisão duplo-cega, o que significa que as identidades dos autores não são conhecidas pelos revisores e vice-versa. Mais informações estão disponíveis em nosso site. Para facilitar o processo, deve-se incluir separadamente o seguinte:

Página de abertura (com detalhes do autor): deve incluir o título, os nomes dos autores, as afiliações, os agradecimentos e qualquer Declaração de Interesse, e o endereço completo do autor para correspondência, incluindo um endereço de e-mail.

Manuscrito cego (sem detalhes do autor): O corpo principal do artigo (incluindo referências, figuras, tabelas e quaisquer agradecimentos) não deve incluir nenhuma identificação, como os nomes ou afiliações dos autores.

Uso de Processador de Texto

É importante que o arquivo seja salvo no formato original do processador de texto utilizado. O texto deve estar em formato de coluna única. Mantenha o layout do texto o mais simples possível. A maioria dos códigos de formatação será removida e substituída no processamento do artigo. Em particular, não use as opções do processador de texto para justificar texto ou hifenizar palavras. Destaques como negrito, itálico, subscrito, sobrescrito, etc. podem ser usados. Ao preparar tabelas, se você estiver usando uma grade na criação das tabelas, use apenas uma grade para cada tabela individualmente, e não uma grade para cada linha. Se nenhuma grade for utilizada, use a tabulação, e não espaços, para alinhar as colunas. O texto eletrônico deve ser preparado de forma muito semelhante ao dos manuscritos convencionais (veja também o *Guia para Publicar com a Elsevier*). Observe que os arquivos de origem das figuras, das tabelas e dos gráficos serão necessários, independentemente se você irá embuti-los ou não no texto. Veja também a seção sobre imagens eletrônicas. Para evitar erros desnecessários, é aconselhável usar as funções "verificação ortográfica" e "verificação gramatical" do seu processador de texto.

Estrutura do Artigo

Subdivisão – Seções não numeradas

O texto principal nos **artigos originais** deve conter as seguintes seções, indicadas por uma legenda: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. As seções nos **artigos de revisão** podem variar dependendo do tópico tratado. Sugerimos que os autores incluam uma breve introdução, na qual eles expliquem (da perspectiva da literatura médica) a importância daquela revisão para a prática da pediatria. Não é necessário descrever como os dados foram selecionados e coletados. A seção de conclusões deve correlacionar as ideias principais da revisão para possíveis aplicações clínicas, mantendo generalizações dentro do escopo do assunto sob revisão.

Introdução

Indique os objetivos do trabalho e forneça um background adequado, evitando uma avaliação detalhada da literatura ou um resumo dos resultados. Faça uma introdução breve, incluindo apenas referências estritamente relevantes para sublinhar a importância do tópico e para justificar o estudo. No fim da introdução, os objetivos do estudo devem estar claramente definidos.

Materiais e Métodos

Forneça detalhes suficientes para viabilizar a reprodução do trabalho. Métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: apenas as modificações relevantes devem ser descritas. Esta seção deve descrever a população estudada, a amostra a ser analisada e os critérios de seleção; também deve definir claramente as variáveis em estudo e descrever detalhadamente os métodos estatísticos empregados (incluindo referências apropriadas sobre métodos estatísticos e software). Procedimentos, produtos e equipamentos devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a reprodução do estudo. Deve ser incluída uma declaração relativa à aprovação pelo comitê de ética de pesquisa (ou equivalente) da instituição em que o trabalho foi realizado.

Resultados

Os resultados do estudo devem ser apresentados de forma clara e objetiva, seguindo uma sequência lógica. As informações contidas em tabelas ou figuras não devem ser repetidas no texto. Use figuras no lugar de tabelas para apresentar dados extensos.

Discussão

Os resultados devem ser interpretados e comparados com dados publicados anteriormente, destacando os aspectos novos e importantes do presente estudo. Devem-se discutir as implicações dos resultados e as limitações do estudo, bem como a necessidade de pesquisas adicionais. As conclusões devem ser apresentadas ao fim da seção Discussão, levando em consideração a finalidade do trabalho. Relacione as conclusões com os objetivos iniciais do estudo, evitando declarações não embasadas pelos achados e dando a mesma ênfase aos achados positivos e negativos que tenham importância científica similar. Se relevante, inclua recomendações para novas pesquisas.

Informações essenciais sobre a página de abertura

A página de abertura deve conter as seguintes informações: a) título conciso e informativo. Evite termos e abreviaturas desnecessários; evite também referências ao local e/ou cidade onde o trabalho foi realizado; b) título curto com não mais de 50 caracteres, incluindo espaços, mostrado nos cabeçalhos; c) nomes dos autores (primeiro e último nome e iniciais do meio); d) grau acadêmico mais elevado dos autores; e) endereço de e-mail de todos os autores; f) se disponível, URL para o curriculum vitae eletrônico ("Currículo Lattes" para autores brasileiros, ORCID etc.) g) contribuição específica de cada autor para o estudo; h) declaração de conflitos de interesse (escreva nada a declarar ou divulgue explicitamente quaisquer interesses financeiros ou outros que possam causar constrangimento caso sejam revelados após a publicação do artigo); i) instituição ou serviço com o/a qual o trabalho está associado para indexação no Index Medicus/MEDLINE; j) nome, endereço, número de telefone, número de fax e e-mail do autor para correspondência; k) nome, endereço, número de telefone, número de fax e e-mail do autor encarregado do contato pré-publicação; l) fontes de financiamento, ou nome de instituições ou empresas fornecedoras de equipamentos e materiais, se aplicável; m) contagem de palavras do texto principal, sem incluir resumo, agradecimentos, referências, tabelas e legendas para figuras; n) contagem de palavras do resumo; o) número de tabelas e figuras.

Resumo

É necessário um resumo conciso e factual. O resumo deve indicar de forma breve o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as conclusões mais importantes. Um resumo é frequentemente apresentado separadamente do artigo, por isso deve ser capaz de ser compreendido sozinho. Por esse motivo, as referências devem ser evitadas, mas, se necessário, cite o(s) autor(es) e ano(s). Além disso, abreviações não padrão ou incomuns devem ser evitadas, mas, se forem essenciais, devem ser definidas em sua primeira menção no próprio resumo. O resumo não deve ter mais de 250 palavras ou 1.400 caracteres. Não inclua palavras que possam identificar a instituição ou cidade onde o estudo foi realizado, para facilitar a revisão cega. Todas as informações no resumo devem refletir com precisão o conteúdo do artigo. O resumo deve ser estruturado conforme descrito a seguir:

Resumo para artigos originais

Objetivo: Declarar por que o estudo foi iniciado e as hipóteses iniciais. Defina com precisão o objetivo principal do estudo; apenas os objetivos secundários mais relevantes devem ser listados. *Método:* Descrever o desenho do estudo (se apropriado, indique se o estudo é randomizado, cego, prospectivo, etc.), local (se apropriado, descreva o nível de atendimento, isto é, se primário, secundário ou terciário, clínica privada ou instituição pública, etc.), pacientes ou participantes (critérios de seleção, número de casos no início e no final do estudo etc.), intervenções (incluem informações essenciais, como métodos e duração do estudo) e critérios utilizados para medir os resultados. *Resultados:* Descrever os achados mais importantes, os intervalos de confiança e a significância estatística dos achados. *Conclusões:* Descrever apenas conclusões que refletem o objetivo do estudo e fundamentadas por suas descobertas. Discutir possíveis aplicações das descobertas, com igual ênfase em resultados positivos e negativos de mérito científico similar.

Resumo para artigos de revisão

Objetivo: Explicar por que a revisão foi realizada, indicando se a mesma se concentra em um fator especial, tal como etiologia, prevenção, diagnóstico, tratamento ou prognóstico da doença. *Fontes:* Descrever todas as fontes de informação, definindo bancos de dados e anos pesquisados. Indicar brevemente os critérios de seleção dos artigos para a revisão e avaliar a qualidade da informação. *Resumo dos achados:* Indique os principais achados quantitativos ou qualitativos. *Conclusões:* Indique suas conclusões e sua aplicação clínica, mantendo generalizações dentro do escopo do assunto sob revisão.

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, forneça um máximo de 6 palavras-chave, utilizando a ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e múltiplos conceitos (evite, por exemplo, 'e', 'de'). Use poucas abreviações: apenas aquelas firmemente estabelecidas no campo de pesquisa podem ser escolhidas. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação. Por favor, utilize os termos listados no *Medical Subject Headings* (MeSH), disponíveis em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>. Quando descritores adequados não estiverem disponíveis, novos termos podem ser utilizados.

Abreviações

Seja moderado no uso de abreviações. Todas as abreviações devem ser explicadas em sua primeira menção no texto. As abreviações não padrão no campo da pediatria devem ser definidas em uma nota de rodapé a ser colocada na primeira página do artigo. Evite o uso de abreviações no resumo; aquelas que são inevitáveis no resumo devem ser definidas em sua primeira menção, bem como na nota de rodapé. Assegure-se da consistência das abreviações em todo o artigo.

Agradecimentos

Agrupe os agradecimentos em uma seção separada ao fim do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de abertura, como uma nota de rodapé para o título ou de outra forma. Liste aqui os indivíduos que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda linguística, assistência escrita ou prova de leitura do artigo, etc.). Somente indivíduos ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas não são qualificados para autoria, devem ser mencionados. Os indivíduos citados nesta seção devem concordar por escrito com a inclusão de seus nomes, uma vez que os leitores podem inferir o endosso das conclusões do estudo.

Formatando as fontes de financiamento

Listar as fontes de financiamento usando a forma padrão para facilitar o cumprimento dos requisitos do financiador:

Financiamento: Esse trabalho recebeu financiamento do National Institutes of Health [números dos financiamentos xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [número do financiamento zzzz]; e dos United States Institutes of Peace [número do financiamento aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de financiamento e prêmios. Quando a verba recebida é parte de um financiamento maior ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, cite o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento foi fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu nenhum financiamento específico de agências de financiamento dos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Unidades

Siga as regras e convenções internacionalmente aceitas: use o sistema internacional (SI) de unidades. Se outras unidades forem mencionadas, forneça seu equivalente em SI.

Fórmulas matemáticas

Por favor, cite equações matemáticas como texto editável e não como imagens. Apresente fórmulas simples de acordo com o texto normal sempre que possível e use a barra oblíqua (/) em vez de uma linha horizontal para pequenos termos fracionários, por exemplo, X/Y. Em princípio, as variáveis devem ser apresentadas em itálico. Potências de e são frequentemente mais convenientemente indicadas pela exponencial. Numere consecutivamente quaisquer equações a serem exibidas separadamente do texto (se referidas explicitamente no texto).

Notas de rodapé

Notas de rodapé não devem ser usadas. Em vez disso, incorpore as informações relevantes no texto principal.

Imagens

Manipulação de imagem

Embora seja aceito que os autores às vezes precisem manipular imagens para obter maior clareza, a manipulação para fins de dolo ou fraude será vista como abuso ético científico e será tratada de

acordo. Para imagens gráficas, esta revista aplica a seguinte política: nenhum recurso específico pode ser aprimorado, obscurecido, movido, removido ou introduzido em uma imagem. Os ajustes de brilho, contraste ou equilíbrio de cores são aceitáveis se, e enquanto não obscurecerem ou eliminarem qualquer informação presente no original. Os ajustes não lineares (por exemplo, alterações nas configurações de gama) devem ser divulgados na legenda da figura.

Imagens eletrônicas

Pontos Gerais

- Certifique-se de usar letras uniformes e dimensionamento de suas imagens originais.
- Incorpore as fontes usadas se o aplicativo fornecer essa opção.
- Prefira usar as seguintes fontes em suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol ou use fontes similares.
- Numere as ilustrações de acordo com sua sequência no texto.
- Use uma convenção de nomeação lógica para seus arquivos de imagens.
- Forneça legendas para ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações próximas às dimensões desejadas da versão publicada.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.

Um guia detalhado sobre imagens eletrônicas está disponível.

Você é convidado a visitar este site; alguns trechos das informações detalhadas são fornecidos aqui.

Formatos

Se as suas imagens eletrônicas forem criadas em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), forneça "como está" no formato de documento original.

Independentemente do aplicativo utilizado que não seja o Microsoft Office, quando sua imagem eletrônica for finalizada, utilize "Salvar como" ou converta as imagens para um dos seguintes formatos (observe os requisitos de resolução para desenhos em linha contínua, meio-tom e combinações de desenho/meio-tom descritos a seguir).

EPS (ou PDF): Desenhos vetoriais, incorporar todas as fontes utilizadas.

TIFF (ou JPEG): Fotografias em cores ou em tons de cinza (meios-tons), mantenha um mínimo de 300 dpi.

TIFF (ou JPEG): Desenho de linha de bitmap (pixels pretos e brancos puros), mantenha um mínimo de 1000 dpi.

TIFF (ou JPEG): Combinações de linha de bitmap/meio-tom (colorido ou escala de cinza), mantenha um mínimo de 500 dpi.

Por favor não:

- Forneça arquivos otimizados para o uso da tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); esses formatos tipicamente têm um baixo número de pixels e um conjunto limitado de cores;
- Forneça arquivos com resolução muito baixa;
- Envie gráficos desproporcionalmente grandes para o conteúdo.

Imagens Coloridas

Por favor certifique-se de que os arquivos de imagens estão em um formato aceitável (TIFF [ou JPEG], EPS [ou PDF] ou arquivos do MS Office) e com a resolução correta. Se, juntamente com o seu artigo aceite, você enviar figuras de cor utilizáveis, a Elsevier assegurará, sem custo adicional, que essas figuras aparecerão em cores on-line (por exemplo, ScienceDirect e outros sites) independentemente dessas ilustrações serem ou não reproduzidas na versão impressa.

Serviços de ilustração

O Elsevier's WebShop oferece serviços de ilustração aos autores que estão se preparando para enviar um manuscrito, mas estão preocupados com a qualidade das imagens que acompanham o artigo. Os experientes ilustradores da Elsevier podem produzir imagens científicas, técnicas e de estilo médico, bem como uma gama completa de quadros, tabelas e gráficos. O "polimento" da imagem também está disponível; nossos ilustradores trabalham suas imagens e as aprimoram para um padrão profissional. Visite o site para saber mais a respeito disso.

Legendas de figuras

Certifique-se de que cada figura tenha uma legenda. Forneça as legendas separadamente, não anexadas às figuras. Uma legenda deve incluir um breve título (**não** na figura em si) e uma descrição

da ilustração. Mantenha o texto curto nas ilustrações propriamente ditas, mas explique todos os símbolos e abreviações utilizados.

Tabelas

Por favor, envie as tabelas como texto editável e não como imagem. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo, ou em páginas separadas no fim. Numere as tabelas de forma consecutiva de acordo com sua ordem no texto e coloque as notas de tabela abaixo do corpo da mesma. Seja moderado no uso das tabelas, e assegure-se de que os dados apresentados nas mesmas não duplicam os resultados descritos em outro lugar no artigo. Evite usar grades verticais e sombreamento nas células da tabela.

Referências

Citação no texto

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estão presentes na lista de referências (e vice-versa). Qualquer referência citada no resumo deve ser fornecida na íntegra. Não recomendamos o uso de resultados não publicados e comunicações pessoais na lista de referências, mas eles podem ser mencionados no texto. Se essas referências estiverem incluídas na lista de referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão da revista e devem incluir uma substituição da data de publicação por "Resultados não publicados" ou "Comunicação pessoal". A citação de uma referência como in press implica que o item foi aceito para publicação.

Links de referência

Maior exposição da pesquisa e revisão por pares de alta qualidade são asseguradas por links on-line às fontes citadas. Para permitir-nos criar *links* para serviços de resumos e indexação, como Scopus, CrossRef e PubMed, assegure-se de que os dados fornecidos nas referências estão corretos. Lembre-se que sobrenomes, títulos de revistas/livros, ano de publicação e paginação incorretos podem impedir a criação de *links*. Ao copiar referências, por favor tenha cuidado, porque as mesmas já podem conter erros. O uso do DOI — identificador de objeto digital (Digital Object Identifier) é encorajado.

Um DOI pode ser usado para citar e criar um *link* para artigos eletrônicos em que um artigo está *in-press* e detalhes de citação completa ainda não são conhecidos, mas o artigo está disponível on-line. O DOI nunca muda, então você pode usá-lo como um *link* permanente para qualquer artigo eletrônico.

Um exemplo de uma citação usando um DOI para um artigo que ainda não foi publicado é: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Por favor, observe que o formato dessas citações deve seguir o mesmo estilo das demais referências no manuscrito.

Referências da Web

A URL completa deve ser fornecida e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecida (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação-fonte etc.), também deve ser fornecida. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) sob um título diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referência.

Referências de dados

Esta revista sugere que você cite conjuntos de dados subjacentes ou relevantes em seu manuscrito citando-os em seu texto e incluindo uma referência de dados em sua lista de referências. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome(s) do(s) autor(es), título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador persistente. Adicione [conjunto de dados] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-la corretamente como uma referência de dados. O identificador [conjunto de dados] não aparecerá no seu artigo publicado. Os usuários do Mendeley Desktop podem facilmente instalar o estilo de referência para esta revista clicando no seguinte link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/jornal-de-pediatria>. Ao preparar seu manuscrito, você poderá selecionar esse estilo utilizando os plug-ins do Mendeley para o Microsoft Word ou o LibreOffice.

Estilo de Referências

As referências devem seguir o estilo Vancouver, também conhecido como o estilo de Requisitos Uniformes, fundamentado, em grande parte, em um estilo do American National Standards Institute, adaptado pela National Library of Medicine dos EUA (NLM) para suas bases de dados. Os autores devem consultar o *Citing Medicine, o Guia de estilo da NLM para autores, editores e editoras*, para obter informações sobre os formatos recomendados para uma variedade de tipos de referência. Os autores também podem consultar exemplos de referências (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html), em uma lista de exemplos extraídos ou baseados no *Citing Medicine* para fácil uso geral; esses exemplos de referências são mantidos pela NLM. As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto, identificadas por números em sobrescrito. Não use numeração automática, notas de rodapé ou de pé de página para referências. Artigos não publicados aceitos para publicação podem ser incluídos como referências se o nome da revista estiver incluído, seguido de "in press". Observações e comunicações pessoais não publicadas não devem ser citadas como referências; se for essencial para a compreensão do artigo, essa informação pode ser citada no texto, seguida pelas observações entre parênteses, observação não publicada ou comunicação pessoal. Para mais informações, consulte os "Requisitos Uniformes para Manuscritos Submetidos a Revistas Biomédicas", disponíveis em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142758/>. Na sequência, apresentamos alguns exemplos do modelo adotado pelo *Jornal de Pediatria*.

Estilo de Referências

Artigos em revistas

1. Até seis autores: Araújo LA, Silva LR, Mendes FA. Digestive tract neural control and gastrointestinal disorders in cerebral palsy. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88:455-64.
2. Mais de seis autores: Ribeiro MA, Silva MT, Ribeiro JD, Moreira MM, Almeida CC, Almeida-Junior AA, et al. Volumetric capnography as a tool to detect early peripheral lung obstruction in cystic fibrosis patients. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88:509-17.
3. Organização como autor: Mercier CE, Dunn MS, Ferrelli KR, Howard DB, Soll RF; Vermont Oxford Network ELBW Infant Follow-Up Study Group. Neurodevelopmental outcome of extremely low birth weight infants from the Vermont Oxford network: 1998-2003. *Neonatology*. 2010;97:329-38.
4. Nenhum autor fornecido: Informed consent, parental permission, and assent in pediatric practice. Committee on Bioethics, American Academy of Pediatrics. Committee on Bioethics, American Academy of Pediatrics. *Pediatrics*. 1995;95:314-7.
5. Artigo publicado eletronicamente antes da versão impressa: Carvalho CG, Ribeiro MR, Bonilha MM, Fernandes Jr M, Procianny RS, Silveira RC. Use of off-label and unlicensed drugs in the neonatal intensive care unit and its association with severity scores. *J Pediatr (Rio J)*. 2012 Oct 30. [Epub ahead of print]

Livros

Blumer JL, Reed MD. Principles of neonatal pharmacology. In: Yaffe SJ, Aranda JV, eds. *Neonatal and Pediatric Pharmacology*. 3rd ed. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins; 2005. p. 146-58.

Estudos Acadêmicos

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertação]. Mount Pleasant, MI: Central Michigan University; 2002.

CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB. Andersons electronic atlas of hematology [CD-ROM]. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002.

Homepage/website

R Development Core Team [Internet]. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2003 [cited 2011 Oct 21]. Available from: <http://www.R-project.org>

Paper presentation

Bugni VM, Okamoto KY, Ozaki LS, Teles FM, Molina J, Bueno VC, et al. Development of a questionnaire for early detection of factors associated to the adherence to treatment of children and adolescents with chronic rheumatic diseases - "the Pediatric Rheumatology Adherence Questionnaire (PRAQ)". Paper presented at the ACR/ARHP Annual Meeting; November 5-9, 2011; Chicago, IL.

Fonte de abreviações da Revista

Os nomes das Revistas devem ser abreviados de acordo com a Lista de Abreviações de Palavras do Título.

Vídeo

A Elsevier aceita material de vídeo e sequências de animação para apoiar e aprimorar suas pesquisas científicas. Os autores que têm arquivos de vídeo ou animação que desejam enviar com seu artigo são fortemente encorajados a incluir links para estes dentro do corpo do artigo. Isso pode ser feito da mesma maneira que uma figura ou tabela, referindo-se ao conteúdo de vídeo ou animação e mostrando no corpo do texto onde ele deve ser colocado. Todos os arquivos enviados devem ser devidamente identificados de modo que se relacionem diretamente com o conteúdo do arquivo de vídeo. Para garantir que seu vídeo ou material de animação esteja apropriado para uso, por favor forneça os arquivos em um dos nossos formatos de arquivo recomendados com um tamanho máximo total de 150 MB. Qualquer arquivo único não deve exceder 50 MB. Os arquivos de vídeo e animação fornecidos serão publicados on-line na versão eletrônica do seu artigo nos produtos de web da Elsevier, incluindo o ScienceDirect. Por favor forneça imagens estáticas com seus arquivos: você pode escolher qualquer quadro do vídeo ou animação ou fazer uma imagem separada. Essa imagem estática será usada em vez de ícones padrão, para personalizar o link para seus dados de vídeo. Para obter instruções mais detalhadas, visite nossas páginas de instruções de vídeo.

Nota: uma vez que o vídeo e a animação não podem ser incorporados à versão impressa da revista, por favor forneça o texto para ambas as versões eletrônica e impressa para as partes do artigo que se referem a esse conteúdo.

Material suplementar

Materiais suplementares, como tabelas, imagens e clipes de som, podem ser publicados com seu artigo para aprimorá-lo. Os itens suplementares enviados são publicados exatamente como são recebidos (arquivos do Excel ou PowerPoint aparecerão dessa forma on-line). Por favor, envie seu material junto com o artigo e forneça uma legenda concisa e descritiva para cada arquivo suplementar. Se você deseja fazer alterações no material suplementar durante qualquer etapa do processo, certifique-se de fornecer um arquivo atualizado. Não anote quaisquer correções em uma versão anterior. Por favor, desabilite a opção "Controlar alterações" nos arquivos do Microsoft Office, pois estas aparecerão na versão publicada.

DADOS DA PESQUISA

Esta revista incentiva e permite que você compartilhe dados que suportem a publicação de sua pesquisa onde for apropriado, e permite que você interligue os dados com seus artigos publicados. Dados de pesquisa referem-se aos resultados de observações ou experimentação que validam os achados da pesquisa. Para facilitar a reprodutibilidade e o reuso dos dados, esta revista também o incentiva a compartilhar seu software, código, modelos, algoritmos, protocolos, métodos e outros materiais úteis relacionados com o projeto.

A seguir são mostradas várias maneiras pelas quais você pode associar dados ao seu artigo ou fazer uma declaração sobre a disponibilidade de seus dados ao enviar seu manuscrito. Se estiver compartilhando dados de uma dessas maneiras, você é encorajado a citar os dados em seu manuscrito e na lista de referências. Consulte a seção "Referências" para obter mais informações sobre a citação de dados. Para obter mais informações sobre o depósito, compartilhamento e uso de dados de pesquisa e outros materiais de pesquisa relevantes, visite a página de Dados de Pesquisa.

Vinculação de dados

Se você disponibilizou seus dados de pesquisa em um repositório de dados, é possível vincular seu artigo diretamente ao conjunto de dados. A Elsevier colabora com uma série de repositórios para vincular artigos no ScienceDirect a repositórios relevantes, dando aos leitores acesso a dados subjacentes que lhes dará uma melhor compreensão da pesquisa descrita.

Existem diferentes maneiras de vincular seus conjuntos de dados ao seu artigo. Quando disponível, você pode vincular diretamente seu conjunto de dados ao seu artigo, fornecendo as informações relevantes no sistema de submissão. Para mais informações, visite a página de vinculação de bancos de dados.

Para os repositórios de dados suportados, um banner do repositório aparecerá automaticamente ao lado do seu artigo publicado no ScienceDirect.

Além disso, você pode vincular a dados ou entidades relevantes através de identificadores dentro do texto de seu manuscrito, utilizando o seguinte formato: Banco de Dados: xxxx (por ex., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

Esta revista é compatível com o Mendeley Data, permitindo que você deposite quaisquer dados de pesquisa (incluindo dados brutos ou processados, vídeos, códigos, software, algoritmos, protocolos

e métodos) associados ao seu manuscrito em um repositório de acesso aberto e gratuito. Durante o processo de submissão, depois de fazer o upload de seu manuscrito, você terá a oportunidade de fazer o upload de seus conjuntos de dados relevantes diretamente para o Mendeley Data. Os conjuntos de dados serão listados e estarão acessíveis diretamente aos leitores ao lado do seu artigo publicado on-line.

Para mais informações, visite a página Mendeley Data para Revistas.

Declaração de dados

Para promover a transparência, encorajamos os autores a declarar a disponibilidade de seus dados ao submeter o artigo. Isso pode ser um requisito da instituição de fomento. Caso seus dados não estejam disponíveis para acesso ou não forem adequados para publicação, você terá a oportunidade de descrever o motivo durante o processo de submissão, afirmando, por exemplo, que os dados da pesquisa são confidenciais. A declaração aparecerá com seu artigo publicado no ScienceDirect. Para obter mais informações, visite a página sobre declaração de dados.

APÓS A ACEITAÇÃO

Disponibilidade do artigo aceito

Esta revista disponibiliza os artigos on-line o mais rapidamente possível após a aceitação. Um identificador de objeto digital (DOI — Digital Object Identifier) é assignado a seu artigo, tornando-o totalmente citável e pesquisável por título, nome(s) do(s) autor(es) e o texto completo.

Provas

Um conjunto de provas (em arquivos PDF) será enviado por e-mail para o autor correspondente ou um link será fornecido no e-mail para que os autores possam baixar os próprios arquivos. A Elsevier agora fornece aos autores provas em PDF que podem receber anotações; para isso, você precisará fazer o download do programa Adobe Reader, versão 9 (ou posterior). As instruções sobre como fazer anotações nos arquivos PDF acompanharão as provas (também fornecidas on-line). Os requisitos exatos do sistema são fornecidos no site da Adobe.

Se não desejar usar a função de anotações em PDF, você pode listar as correções (incluindo as respostas ao Formulário de Consulta) e devolvê-las por e-mail. Por favor, liste suas correções citando o número da linha. Se, por qualquer motivo, isso não for possível, marque as correções e quaisquer outros comentários (incluindo as respostas ao Formulário de consulta) em uma impressão de sua prova, escaneie as páginas e devolva-as por e-mail. Por favor, use esta prova apenas para verificar a composição, edição, integridade e exatidão do texto, tabelas e figuras. Alterações significativas no artigo aceito para publicação só serão consideradas nesta etapa com permissão do editor-chefe da revista. Faremos todo o possível para que seu artigo seja publicado com rapidez e precisão. É importante garantir que todas as correções sejam enviadas de volta para nós em uma única comunicação: por favor, verifique atentamente antes de responder, pois a inclusão de quaisquer correções subsequentes não será garantida. A revisão é responsabilidade exclusiva do autor.

PERGUNTAS DOS AUTORES

Visite o Centro de Apoio da Elsevier para encontrar as respostas de que você precisa. Aqui você encontrará tudo, desde Perguntas Frequentes até maneiras de entrar em contato.

Você também pode verificar o status do seu artigo enviado ou verificar quando seu artigo aceito será publicado.