

Artigo original

Eosinófilos e proteína catiônica eosinofílica em bronquiolite viral aguda.

Eosinophil counts and eosinophil cationic protein in acute viral bronchiolitis.

Helena Müller¹, Gilberto B Fischer², Rejane M Oravec³, Beatriz von Poser⁴.

RESUMO

Introdução: A bronquiolite viral aguda é uma doença freqüente na infância. Tem sido estudado o papel de marcadores imunológicos e inflamatórios como determinantes da sua gravidade. O objetivo deste estudo foi determinar a contagem de eosinófilos no sangue periférico e a concentração sérica de proteína catiônica eosinofílica em pacientes internados com bronquiolite viral aguda e comparar com diferentes graus de gravidade. **Metodologia:** A contagem de eosinófilos e a concentração da proteína catiônica eosinofílica foram determinadas em lactentes menores de 1 ano, hospitalizados com quadro clínico de bronquiolite. Foram realizadas comparações do número de eosinófilos e da concentração de proteína catiônica, de acordo com gravidade, sexo e faixa etária. Foram utilizados como critérios de gravidade a saturação em ar ambiente e a prevalência de ventilação mecânica. **Resultados:** Foram estudados 58 pacientes, com idade média de 2 meses. Dezenove pacientes foram classificados como graves, de acordo com a saturação da hemoglobina, inferior a 90%. Sete pacientes necessitaram ventilação mecânica (12%). A contagem de eosinófilos variou de 0 a 1104, com mediana de 100. O número de eosinófilos foi significativamente menor nos pacientes com saturação mais baixa ($p < 0.05$). A concentração da proteína catiônica eosinofílica variou de 2 a 114 $\mu\text{g/litro}$, com mediana em 6 $\mu\text{g/l}$. Não houve correlação com a saturação. **Conclusão:** Houve associação entre baixo número de eosinófilos e gravidade da bronquiolite medida pela satHb. Estudos adicionais são necessários para elucidar melhor o papel de eosinófilos e seus derivados na determinação da gravidade da bronquiolite.

Descritores: bronquiolite, eosinófilos, proteína catiônica eosinofílica.

ABSTRACT

Introduction: The aim of the present study is to determine peripheral blood eosinophil counts and eosinophil cationic protein (ECP) serum concentration in hospitalized patients with acute viral bronchiolitis and to compare with different degrees of severity. **Methodology:** Peripheral blood eosinophil counts and eosinophil cationic protein serum concentration was performed on infants under 12 months of age who were hospitalized presenting acute viral bronchiolitis. Associations of eosinophil counts and ECP concentration among groups of patients were performed according to severity, gender and age. Severity was defined by haemoglobin saturation in room air and prevalence of mechanical ventilation. **Results:** Fifty-eight patients were studied. The mean age was 2 months. Nineteen patients were classified as severe according to haemoglobin saturation, lower than 90%. Seven patients needed mechanical ventilation (12%). Eosinophil counts ranged from 0 to 1104 and the median value was 100. Eosinophil counts were lower in patients with lower saturation ($p < 0.05$). Patients who needed mechanical ventilation also showed lower eosinophil counts. ECP serum concentration ranged from 2 to 114 $\mu\text{g/l}$ and the median value was 6 $\mu\text{g/l}$. ECP was not associated with neither saturation nor mechanical ventilation. **Conclusion:** A correlation was found between eosinophil counts and severity measured by haemoglobin saturation. There was no correlation between ECP and severity. Additional studies are necessary to better explain the role of eosinophils and its proteins to determine the severity of bronchiolitis.

Keywords: bronchiolitis, eosinophils, eosinophil cationic protein.

1. Médica pediatra intensivista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Hospital da Criança Santo Antônio. Mestre em Pediatria pela UFRGS.

2. Professor Titular do Departamento de Pediatria da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Professor responsável pela Disciplina de Doenças Respiratórias do Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria da UFRGS. Doutor em Pneumologia.

3. Médica patologista clínica do Laboratório Weinmann de Porto Alegre. Coordenadora do setor de sorologia do Hemocentro da Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul.

4. Farmacêutica Bioquímica do Setor de Imunologia do Laboratório Weinmann de Porto Alegre. Trabalho realizado no Hospital da Criança Santo Antônio – Santa Casa de Porto Alegre.

Endereço para correspondência: Helena Muller. Rua Fernandes Vieira, 165/501, CEP: 90035-091, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: 51 30136946.

E-mail: hmuller.voy@terra.com.br.

Recebido em 03/04/2009 e aceito em 05/06/2009, após revisão.

INTRODUÇÃO

Bronquiolite viral aguda (BVA) é uma doença inflamatória de origem viral que causa obstrução de vias aéreas inferiores em crianças, especialmente no primeiro ano de vida. É uma causa freqüente de hospitalizações durante os meses de inverno.^{1,2} Entre 1 e 2 % dos lactentes são hospitalizados, no primeiro ano de vida, devido à bronquiolite.^{3,4,5} O agente etiológico mais freqüente é o vírus respiratório sincicial (VRS), isolado em 70 a 80% dos casos de bronquiolite, ocorrendo em menor freqüência outros vírus, como parainfluenza, influenza e adenovírus.^{1,6} A presença do rinovírus e do metapneumovírus humano tem sido identificada recentemente na etiologia da BVA, aparecendo como segundo e terceiro agentes etiológicos em alguns estudos.^{7,8,9} A identificação destes vírus é realizada através de reação de cadeia de polimerase (PCR), e ainda não faz parte da rotina na maioria dos serviços. A maioria dos estudos realizados em bronquiolite, tanto com relação à evolução clínica como com relação à fisiopatologia, são centrados na doença causada pelo VRS.

A maioria dos lactentes acometidos apresenta uma doença com sinais de obstrução leve das vias aéreas inferiores, sem necessidade de hospitalização, mas alguns pacientes apresentam sinais de dificuldade ventilatória grave, que pode evoluir para insuficiência respiratória e necessidade de ventilação mecânica. Os principais fatores de risco para doença grave são idade menor que 3 meses, prematuridade, presença de doenças crônicas, como cardiopatias, fibrose cística e displasia broncopulmonar, e imunodeficiências.^{1,10} É freqüente a ocorrência de episódios posteriores de sibilância, muitas vezes com necessidade de reinternação, e alguns pacientes desenvolvem quadro de asma brônquica no futuro.^{2,4,6,11}

Vários mecanismos imunológicos e de resposta inflamatória têm sido investigados na patogênese da sibilância e das seqüelas a longo prazo da bronquiolite. Os mecanismos responsáveis pela sintomatologia desta infecção viral, bem como a intensidade da resposta do hospedeiro, ainda não estão esclarecidos. Alguns estudos têm pesquisado o papel dos eosinófilos e da proteína catiônica eosinofílica (PCE), com resultados controversos. A PCE é uma proteína citotóxica liberada pelos eosinófilos ativados na presença de reação inflamatória. Os principais estudos sobre seus efeitos têm sido realizados em asma brônquica, mostrando que a PCE é capaz de destruir a mucosa brônquica e produzir hiperreatividade.^{12,13,14,15} Também foi demonstrado que a PCE está associada com gravidade na asma, com aumento de seus níveis séricos e no lavado broncoalveolar, nas exacerbações da doença.¹⁵ Garofalo e colaboradores demonstraram presença de PCE na secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite pelo vírus respiratório sincicial. Também observaram correlação da PCE com hipoxemia, na fase aguda da doença, sugerindo uma possível associação da PCE com a gravidade da bron-

quiolite.¹⁶ Os mesmos autores demonstraram, também, aumento de PCE sérica em lactentes com bronquiolite.¹⁷ Por outro lado, Smyth e colaboradores não observaram diferença nos níveis séricos de PCE entre lactentes com infecção pelo vírus respiratório sincicial e controles.¹⁸ Outro estudo demonstrou que lactentes com bronquiolite que apresentavam valores mais altos de PCE sérica também apresentavam maior risco de sibilância recorrente, num seguimento de 5 anos.¹⁹

O objetivo do presente estudo é determinar a contagem de eosinófilos no sangue periférico e a concentração sérica de proteína catiônica eosinofílica em pacientes internados com bronquiolite viral aguda e comparar com diferentes graus de gravidade.

METODOLOGIA

Foi realizado um estudo transversal com pacientes internados no Hospital da Criança Santo Antônio, com diagnóstico de bronquiolite viral aguda, durante os meses de inverno (junho a agosto), com os seguintes critérios de inclusão: idade entre 0 e 11 meses e 29 dias, quadro clínico de bronquiolite com até 5 dias de evolução, freqüência respiratória maior ou igual a 60 movimentos por minuto, ou saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina menor do que 95% em ar ambiente. O diagnóstico de bronquiolite foi embasado em critérios clínicos: lactentes, com primeiro episódio de doença respiratória caracterizado por tosse, taquipnéia, sinais de dificuldade respiratória, sibilos e/ou estertores crepitantes, após um período prodromico de 2 a 4 dias, com sinais de infecção de vias aéreas superiores. Foram excluídos pacientes com história prévia de doença respiratória de vias aéreas inferiores, pneumopatia crônica e com relato de uso de corticosteróides nas últimas 72 horas. Os pacientes eram selecionados no momento da internação no hospital. Era realizada entrevista com o familiar responsável e avaliação clínica, nas primeiras 12 horas de internação, por um dos médicos da equipe de pesquisa. A avaliação clínica constava de exame físico, com registro de sinais vitais, presença de tiragem, sibilos e estertores crepitantes à ausculta pulmonar e saturação de oxigênio da hemoglobina em ar ambiente. Era realizada colheita de sangue para realização de hemograma, conforme rotina de atendimento, e reservada uma amostra para dosagem de PCE. O material era centrifugado e o soro conservado em temperatura de -80°C, até a realização do exame, conforme instruções do fabricante do *kit* de dosagem. A dosagem da PCE foi realizada através de imunoensaio enzimático com fluorescência, com *kit* do Laboratório Pharmacia & Upjohn. Colheita de secreção nasofaríngea para pesquisa de vírus respiratórios faz parte da rotina de atendimento do Hospital e foi solicitada em todos os pacientes. A gravidade dos pacientes foi avaliada através da medida da saturação da hemoglobina em ar ambiente, no momento da admissão, e da prevalência de ventilação mecânica.

Foi solicitada autorização dos responsáveis para inclusão dos pacientes no estudo, através de um termo de consentimento informado, e houve aprovação do projeto pela Comissão Científica e Ética do hospital.

A análise estatística foi realizada através de teste de Mann-Whitney, para comparação das variáveis, e correlação de Spearman, para avaliar associações. Foi considerado α (alfa) crítico de 5%, para significância estatística.

RESULTADOS

Durante o período do estudo, internaram-se, no Hospital da Criança Santo Antônio, 70 pacientes com quadro clínico de BVA que preencheram os critérios de inclusão. Doze pacientes foram excluídos, pois não foram colhidas as amostras de sangue para o estudo no momento da colheita dos exames de rotina e, por razões éticas, não foi colhido sangue especialmente para o estudo. A amostra constituiu-se, então, de 58 pacientes. Trinta e dois pacientes (55%) eram do sexo masculino, a idade variou de 0 a 10 meses, com média de 2 meses e mediana de 1 mês. Setenta e seis por cento dos pacientes tinham até 2 meses de idade. A tabela 1 mostra os principais achados clínicos na admissão dos pacientes. Os pacientes foram divididos em 2 grupos, de acordo com a saturação: bronquiolite grave (satHb < 90%) e bronquiolite moderada (satHb ≥ 90%). Três pacientes, nos quais não foi aferida a satHb em ar ambiente porque foram imediatamente intubados na chegada à sala de Emergência, foram incluídos no grupo da bronquiolite grave. A tabela 2 mostra a distribuição dos pacientes de acordo com a gravidade. Sete pacientes necessitaram ventilação mecânica, o que resultou numa prevalência de 12%. O tempo de permanência no hospital variou de 2 a 30 dias, com mediana de 8 dias.

Tabela 1 - Frequência dos principais achados clínicos

Sinal clínico	N	%
FR>ou=60	33	57
satHb<95	46	79
tiragem subcostal	53	91
tiragem intercostal	26	45
tiragem supraclavicular	31	53
sibilos ins/expiratórios	39	67
estertores crepitantes	53	91

Tabela 2 - Gravidade dos pacientes conforme a satHb

	N	%
Bronquiolite grave	19	33
Bronquiolite moderada	39	67
Total	58	100

Foi realizada pesquisa virológica em 48 pacientes. Em 30 pacientes (62%), foi identificado o vírus respiratório sincicial; nos demais 18 pacientes, o resultado foi negativo.

A figura 1 mostra a distribuição da contagem de eosinófilos sangüíneos na amostra estudada. Houve variação de 0 a 1104 eosinófilos, com média de 170 e mediana de 100. O número de eosinófilos foi significativamente menor no grupo de pacientes com bronquiolite grave (mediana 0), em relação ao grupo com bronquiolite moderada (mediana 129), conforme ilustra a figura 2 ($p = 0,004$). Os pacientes que foram submetidos à ventilação mecânica apresentaram também menor contagem de eosinófilos, em relação aos que não necessitaram de ventilação, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,248$).

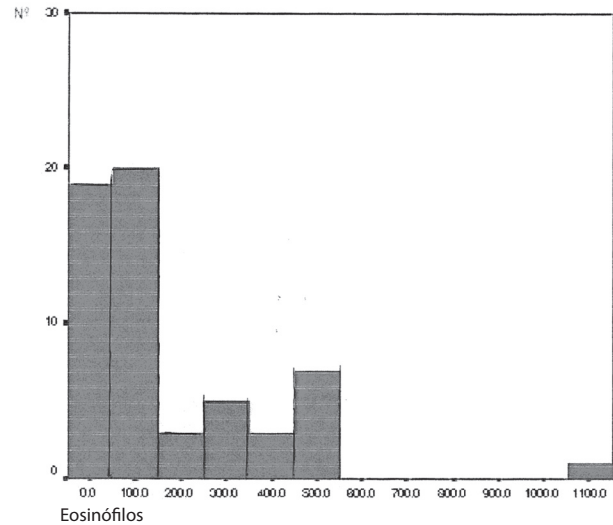
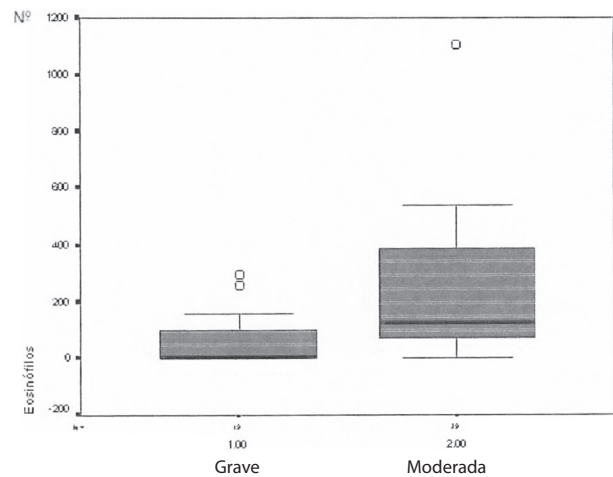


Figura 1 - Distribuição do número de eosinófilos no sangue periférico



Figuro 2 - Distribuição de eosinófilos conforme gravidade de acordo com satHb

Não houve diferença na contagem de eosinófilos entre pacientes com vírus positivo (mediana = 89) e negativo (mediana = 95).

A concentração sérica de PCE variou de 2 a 114 µg/L, com média = 13,9 e mediana = 6 µg/L. A figura 3 mostra a distribuição dos níveis de PCE. Não houve diferença nas concentrações de PCE entre os grupos grave e moderado (tabela 3), nem correlação de PCE com saturação da hemoglobina. Não foi observada

correlação entre níveis de PCE e contagem de eosinófilos (figura 4). Também não houve diferença na concentração sérica de PCE entre pacientes com vírus positivo e negativo.

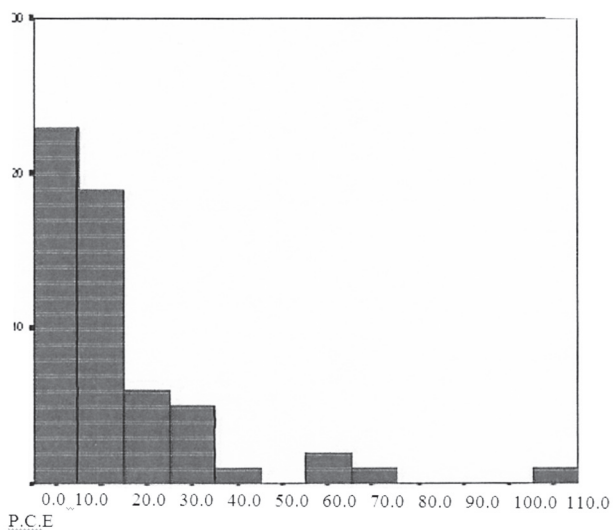


Figura 3 - Distribuição das concentrações séricas de PCE

Tabela 3 - Concentrações de PCE conforme a gravidade

	PCE (µg/l)*
Bronquiolite grave	6,6
Bronquiolite moderada	5,5

*mediana

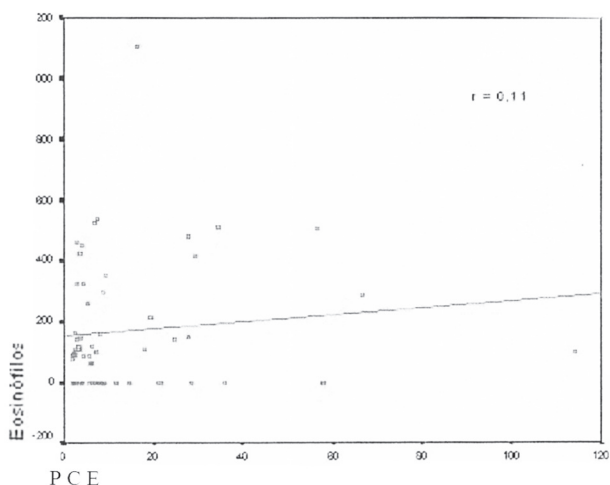


Figura 4 - Correlação entre PCE e eosinófilos

DISCUSSÃO

Este estudo foi planejado para investigar o comportamento dos eosinófilos sangüíneos e da PCE sérica em pacientes com BVA. Esta doença apresenta-se com diferentes graus de gravidade, sendo a forma leve a mais comum, sem necessidade de hospitalização. A indicação de internação hospitalar baseia-se em aspectos clínicos, tais como taquipnéia, disfunção ventilatória e, principalmente, necessidade de oxigenoterapia, avaliada através de gasometria arterial ou da medida da satHb.¹⁰ Como o estudo foi realizado em pacientes

hospitalizados, decidiu-se restringir a amostra aos que tinham indicações clínicas de internação, como taquipnéia e/ou diminuição da satHb, pois, algumas vezes, a indicação pode estar relacionada a outras causas, como fatores sociais. O critério utilizado para o diagnóstico de bronquiolite foi essencialmente clínico, e eram incluídos no estudo somente os lactentes que apresentavam quadro de primeiro episódio de doença respiratória inferior, com até cinco dias de evolução, que ocorreu após pródomos de infecção de vias aéreas superiores. Outros estudos na literatura também aceitam o diagnóstico somente clínico, com critérios bem definidos, para BVA.^{4,10,20} Uma limitação do presente estudo foi a exclusão de 12 pacientes (17% da amostra), devido ao fato de não ter sido colhida amostra de sangue para dosagem de PCE. Por razões éticas, não foi realizada coleta de sangue somente para o estudo.

A avaliação clínica dos pacientes era realizada dentro das primeiras 12 horas de internação, com objetivo de avaliar a gravidade em momento próximo à admissão dos pacientes. Foi escolhida a aferição da satHb, através da oximetria de pulso em ar ambiente, como critério para avaliação da gravidade da BVA. A hipoxemia, resultado de alterações na relação ventilação-perfusão, é a principal consequência da BVA, sendo um indicador de gravidade. Não há na literatura nenhum escore clínico totalmente aceito para avaliação de gravidade em BVA. Vários autores já utilizaram a satHb para avaliação da gravidade em pacientes com bronquiolite.^{21,22,23} Neste estudo, optou-se por dividir os pacientes em categorias, conforme De Boeck: satHb < 90%, e ≥ 90%.²³ Considerando o critério de satHb menor que 90%, 19 pacientes (33%) apresentaram bronquiolite grave. Em um estudo multicêntrico, realizado no Canadá, que avaliou fatores de risco na admissão de pacientes com bronquiolite e/ou pneumonia por VRS, foi observado que satHb menor que 90% esteve associado com maior tempo de hospitalização e maior prevalência de internação em UTI e de ventilação mecânica.²² Green e colaboradores também consideraram satHb menor que 90% como critério para hipoxemia e gravidade, sendo seus achados semelhantes aos do presente estudo, com 37% de casos graves.²¹

Observou-se, no nosso estudo, que a contagem de eosinófilos no sangue periférico mostrou-se diminuída na maioria dos pacientes, conforme ocorre geralmente em infecções agudas bacterianas e virais que suprimem o número de eosinófilos sangüíneos.^{17,24,25} Estudos prévios mostraram que um grupo de pacientes com bronquiolite não apresenta esta supressão no número de eosinófilos, e no seguimento destes pacientes foi observado maior risco de episódios futuros de sibilância.^{25,26} O questionamento deste achado é se estes lactentes já teriam alguma alteração imunológica, determinando eosinofilia e sibilância durante a infecção viral, sendo esta mesma alteração responsável pelo desenvolvimento de asma posteriormente. Nos dois

estudos relatados,^{25,26} os lactentes que apresentaram eosinopenia durante o episódio de bronquiolite não apresentaram episódios tardios de sibilância. Nenhum destes estudos relacionou número de eosinófilos com gravidade da bronquiolite. No estudo de Fischer, em lactentes com bronquiolite, em Porto Alegre, a contagem de eosinófilos no sangue periférico mostrou um expressivo número de pacientes com ausência de eosinófilos (60%). Somente 5% apresentava eosinofilia acima de 400. Contudo, não foi encontrada associação com gravidade.² No presente estudo, entretanto, houve uma diferença estatisticamente significativa no número de eosinófilos em relação à gravidade dos pacientes, avaliada através da saturação da hemoglobina. O grupo de pacientes com menor saturação apresentou menor contagem de eosinófilos. Também os pacientes que evoluíram para ventilação mecânica apresentaram menor número de eosinófilos. Um estudo recente de Lindemans e colaboradores,²⁷ realizado na Holanda, investigou a ativação dos eosinófilos no sangue periférico, através de marcadores celulares, em pacientes com infecção pelo VRS. Foi demonstrada a expressão destes marcadores celulares, confirmando a ativação dos eosinófilos nos pacientes estudados, apesar de não haver eosinofilia. Os autores concluem que deve haver um envolvimento dos eosinófilos na fisiopatologia da bronquiolite, e que o número diminuído no sangue periférico esteja relacionado à sua migração para os pulmões durante o processo inflamatório. Observaram, também, que a ativação dos eosinófilos foi menos intensa nos pacientes mais graves, o que pode estar relacionado aos nossos achados de eosinopenia mais acentuada associada à gravidade. Estes achados podem ser explicados pela maior migração dos eosinófilos para os pulmões, durante episódios mais graves de bronquiolite, mas também pode-se especular que fatores imunológicos relacionados com a eosinopenia possam estar associados com outros que determinam a gravidade.

Em relação à PCE, os resultados encontrados mostram ampla variação. Segundo a literatura, a média em adultos e crianças saudáveis é de 4 a 6 $\mu\text{g/L}$.^{28,29} A mediana encontrada no presente estudo situa-se dentro da faixa da normalidade, apesar da ampla variação. Sigurs e colaboradores dosaram PCE sérica em 19 lactentes com bronquiolite, encontrando mediana de 7.4 $\mu\text{g/l}$, achado semelhante ao deste estudo.³⁰ Os estudos de Koller e colaboradores e Villa e colaboradores encontraram associação entre níveis elevados de PCE sérica durante episódio de bronquiolite e o desenvolvimento posterior de asma.^{31,32} Os achados de Pifferi e colaboradores também confirmam esta hipótese.¹⁹ Estes autores demonstraram, num seguimento de 5 anos, um risco 9,7 vezes maior de desenvolvimento

de sibilância, nos pacientes que apresentavam PCE sérica elevada no momento do diagnóstico da bronquiolite por VRS.¹⁹ Em um estudo realizado na Grécia, os autores encontraram baixos valores de PCE sérica em pacientes com bronquiolite por VRS, e houve uma tendência a valores mais altos de PCE em pacientes com bronquiolite e história familiar de atopia.³³ Este achado pode reforçar as associações já encontradas entre PCE sérica e desenvolvimento posterior de asma em pacientes com bronquiolite. É provável que a PCE não esteja envolvida na patogênese da infecção viral, mas que sua presença esteja associada com atopia. A maioria dos autores acredita que a ativação e a degranulação dos eosinófilos ocorra mais intensamente nas vias aéreas, já que foi demonstrado aumento de PCE na secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite.¹⁶ Este estudo de Garofalo e colaboradores encontrou, inclusive, associação de níveis elevados de PCE na secreção com hipoxemia e gravidade.¹⁶ Outro estudo também demonstrou presença de PCE em secreção nasofaríngea de lactentes com bronquiolite por VRS.³⁴ Na conclusão, os autores sugerem pesquisas com agentes farmacológicos que inibem migração e degranulação de eosinófilos em bronquiolite.³⁴

Os resultados deste estudo não mostraram correlação do número de eosinófilos com PCE sérica, o que também não foi demonstrado no estudo de Priftis e colaboradores.³³ A infecção viral que ocorre na bronquiolite pode provocar a ativação dos eosinófilos, com liberação de PCE, possivelmente, a nível local. São achados controversos, já que estudos de necropsia de pacientes acometidos de bronquiolite viral não mostraram aumento de eosinófilos na mucosa das vias aéreas.^{26,34} A explicação sugerida é que o número de eosinófilos não é relevante na resposta inflamatória, mas sim a presença dos produtos da degranulação dos eosinófilos ativados.

Conclui-se que a PCE sérica não apresentou correlação com gravidade da bronquiolite, achado compatível com os últimos estudos publicados. Os achados relativos aos eosinófilos sugerem uma possível associação destas células com gravidade da bronquiolite. Estudos adicionais são necessários para melhor elucidar o papel dos eosinófilos e da PCE na secreção nasofaríngea de pacientes com bronquiolite, bem como a associação de PCE com o desenvolvimento posterior de asma.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Kátia Maria Giugno, Luciano Guerra, Ângela Bagatini, Cláudia Costa e Silva, pelo auxílio na coleta de dados, e à Dra. Lúcia Pellanda, pelo especial auxílio na análise dos resultados.

REFERÊNCIAS

- Welliver RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:56-12.
- Fischer GB. Fatores prognósticos para bronquiolite viral aguda

[tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994.

- Wang EL, Law BJ, Stephens D. *Pediatric Investigators*

- Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *J Pediatr* 1995;126:212-9.
4. Albarnaz EP, Menezes AM, Cesar JA, Victora CG, Barros FC, Halpern R. Fatores de risco associados à hospitalização por bronquiolite aguda no período pós-neonatal. *Rev. Saúde Pública* 2003;37(4):485-93.
 5. Welliver RC. Respiratory syncytial virus infection: therapy and prevention. *Paediatr Resp Rev* 2004;5:S127-33.
 6. Fischer GB, Teper A, Colom AJ. Acute viral bronchiolitis and its sequelae in developing countries. *Paediatr Resp Rev* 2002;3:298-302.
 7. Pitrez PM, Stein RT, Stuermer L, Macedo IS, Schmitt VM, Jones MH, et al. Bronquiolite aguda por rinovírus em lactentes jovens. *J Pediatr* 2005;81:417-20.
 8. Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *Journal of Clinical Virology* 2007;38: 221-6.
 9. Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Giyon-Lavi N, Saleh N, et al. Comparison of Human Metapneumovirus, Respiratory Syncytial Virus and Influenza A Virus Lower Respiratory Tract Infections in Hospitalized Young Children. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:320-4.
 10. Fitzgerald DA, Kilham HA. Bronchiolitis: assessment and evidence-based management. *MJA* 2004;180:399-404.
 11. Martinez FD. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis* 2003;22:S76-92.
 12. Dahl R, Venge P, Olsson I. Variations of blood eosinophils and eosinophil cationic protein in serum in patients with bronchial asthma. *Allergy* 1978;33:211-5.
 13. Joseph-Bowen J, de Klerk N, Holt PG, Sly PD. Relationship of asthma, atopy, and bronchial responsiveness to serum eosinophil cationic proteins in early childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1040-5.
 14. Kantor O Jr, Rosario Filho NA. Contagem de eosinófilos circulantes e níveis séricos de proteína catiônica eosinofílica em asmáticos. *J Pediatr* 1997;73:11-5.
 15. Koh YY, Kang H, Kim CK. Ratio of serum eosinophil cationic protein/blood eosinophil counts in children with asthma: comparison between acute exacerbation and clinical remission. *Allergy Asthma Proc* 2003;24:269-74.
 16. Garofalo R, Kimpen JLL, Welliver RC, Ogra PL. Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* 1992;120:28-32.
 17. Garofalo R, Dorris A, Ahlstedt S, Welliver RC. Peripheral blood eosinophil counts and eosinophil cationic protein content of respiratory secretions in bronchiolitis: relationship to severity of disease. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:111-7.
 18. Smyth RL, Fletcher JN, Thomas HM, Hart CA. Immunological responses to respiratory syncytial virus infection in infancy. *Arch Dis Child* 1997;76:210-4.
 19. Pifferi M, Ragazzo V, Caramella D, Baldini G. Eosinophil cationic protein in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis: predictive value for subsequent development of persistent wheezing. *Pediatr Pulmonol* 2001;31:419-24.
 20. McConnochie KM. Bronchitis- what's in the name. *Am J Dis Child* 1983;137:11-3.
 21. Green M, Brayer AF, Schenkman KA, Wald ER. Duration of hospitalization in previously well infants with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:601-5.
 22. Wang EL, Law BJ, Stephens D. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *J Pediatr* 1995;126:212-9.
 23. De Boeck K, van Der Aa N, van Lierde S, Corbeel L, Eeckels R. Respiratory syncytial virus: a double-blind dexamethasone efficacy study. *J Pediatr* 1997;131:919-21.
 24. Venge P. The human eosinophil in inflammation. *Agents Actions* 1990;29:122-6.
 25. Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Halonen M. Differential immune responses to acute lower respiratory illness in early life and subsequent development of persistent wheezing and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:915-20.
 26. Ehlenfeld DR, Cameron K, Welliver RC. Eosinophilia at the time of respiratory syncytial virus bronchiolitis predicts childhood reactive airway disease. *Pediatrics* 2000;105:79-83.
 27. Lindemans CA, Kimpen JLL, Luijk B, Heidema J, Kanters D, van der Ent CK, et al. Systemic eosinophil response induced by respiratory syncytial virus. *Clinical and Experimental Immunology* 2006;144:409-17.
 28. Peterson CGB, Enander I, Nystrand J, Anderson AS, Nilsson L, Venge P. Radioimmunoassay of human eosinophil cationic protein (ECP) by an improved method. Establishment of normal levels in serum and turnover in vivo. *Clin Exp Allergy* 1991;21:561-7.
 29. Sugai T, Sakiyama Y, Matumoto S. Eosinophil cationic protein in peripheral blood of pediatric patients with allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 1992;22:275-81.
 30. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F. Eosinophil cationic protein in nasal secretion and in serum and myeloperoxidase in serum in respiratory syncytial virus bronchiolitis: relation to asthma and atopy. *Acta Paediatr* 1994;83:1151-5.
 31. Koller DY, Wojnarowski C, Herkner KR, Weinländer G, Raderer M, Eichler I, Frischer T. High levels of eosinophil cationic protein in wheezing infants predict the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:752-6.
 32. Villa JR, Garcia G, Rueda S, Nogales A. Serum eosinophilic cationic protein may predict clinical course of wheezing in young children. *Arch Dis Child* 1998;78:448-52.
 33. Priftis KN, Papadopoulou A, Liatsis E, Katsikas D, Nicolaidou P, Kanariou M. Serum eosinophil cationic protein and CD23 in acute RSV bronchiolitis. *Med Sci Monit* 2005;11:CR493-7.
 34. Dimova-Yaneva D, Russel D, Main M, Brooker RJ, Helms PJ. Eosinophil activation and cysteinyl leukotriene production in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Allergy* 2004;34:555-8.