

MARIA CAROLINA MACIEL DE ALBUQUERQUE

**INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS VIRAIS EM
CRIANÇAS NAS CIDADES DO RIO DE
JANEIRO E TERESÓPOLIS**



**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS VIRAIS EM CRIANÇAS NAS CIDADES DO RIO DE JANEIRO E DE TERESÓPOLIS

Maria Carolina Maciel de Albuquerque

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), do Instituto de Microbiologia *Prof. Paulo de Góes*, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientadora: Norma Suely de Oliveira Santos



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
ABRIL 2009**

Infecções Respiratórias Virais em Crianças nas Cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis

Autora: Maria Carolina Maciel de Albuquerque

Orientadora: Dra. Norma Suely de Oliveira Santos

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia *Prof. Paulo de Góes*, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Aprovada por:

Profa. Norma Suely de Oliveira Santos (Presidente)

Profa. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Prof. José Nelson dos Santos Silva Couceiro

Dr. Christian Maurice Gabriel Niel

Profa. Luciana Jesus da Costa

Rio de Janeiro

Abril/2009

Albuquerque, Maria Carolina Maciel

Infecções Respiratórias Virais em Crianças nas Cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis/ Maria Carolina Maciel de Albuquerque – Rio de Janeiro, 2009.

xxii, 142f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Norma Suely de Oliveira Santos

Tese (doutorado) – UFRJ/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/ Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), 2009.

Referências bibliográficas: f. 96 - 133

1. Infecção Respiratória 2. Diagnóstico Viroológico 3. Epidemiologia. I. Santos, Norma Suely de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia). III - Título

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Viroses Respiratórias, Entéricas e Oculares do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Profa. Norma Suely de Oliveira Santos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em quem sempre confiei com a certeza de que tudo acontece a sua vontade.

A Professora Norma Suely de Oliveira Santos, orientadora deste trabalho, agradeço principalmente pela confiança de que eu seria capaz de realizar este projeto, pelo conhecimento transmitido ao longo não só dessa tese, mas durante os 10 anos em que vivi no mundo da virologia.

Aos amigos de laboratório, Fabrício, Adriana, Tatiana, Danielle e Gabriella, pelos dias de descontração, pelas boas risadas e pelo companheirismo de todos os dias (e por tantas vezes terem “tirado meu PCR da máquina”). Tenho certeza que a amizade continuará pela vida.

A amiga Giselle Pena por toda ajuda com o processamento das amostras e principalmente pelo carinho que sempre teve comigo.

Ao amigo e colaborador, Rafael Varella, por ter tido o carinho e a presteza de ajudar na coleta das amostras clínicas, sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.

A Soluza dos Santos Gonçalves pelo apoio técnico durante a realização do trabalho, pelo carinho e pelos deliciosos cafezinhos.

Aos professores do Departamento de Virologia, pelas aulas dentro e fora de sala, em especial a Professora Maria Teresa Vilella Romanos, pela convivência enriquecedora.

A grande amiga, Caroline Cordeiro Soares, por seus conselhos, sempre tão equilibrados, pela companhia nos congressos de virologia (que sempre dividíamos o quarto), pela ajuda dentro do laboratório e fora dele e pelo prazer da convivência de tantos anos de amizade.

Ao amigo Eduardo de Mello Volotão, pelo otimismo sempre tão marcante e consolador, por ser sempre tão entusiasmado com a virologia, isso sempre me ajudou a seguir em frente.

Ao meu marido, Rodrigo Bissoli, por ter confiado, por ser paciente, por acreditar, por sempre estar ao meu lado, por me amar, gostar de tudo que eu faço (até da virologia).

A Andrea Albuquerque, pelo apoio, pelos almoços em família, cena de infindáveis discussões (sempre tão proveitosas).

A Maria do Carmo, por ser meu “anjo que caiu do céu”, pelo carinho desde os meus 3 anos, pela convivência harmoniosa e por sempre acreditar em nós.

Aos meus irmãos, Carlo Fabiano e Maria Angélica, por serem companheiros e amigos, por me ouvirem chorar e rir, pela paciência e pela confiança, por

perguntarem sempre sobre “mas como assim? Vírus não é vivo?”. Sem vocês não sou nada.

Aos meus pais, José Gabriel e Elizabeth, por terem se sacrificado pra que eu chegasse até aqui, por terem me educado, por me fazerem ser quem sou por falarem com tanto orgulho de mim (mesmo sem entender o que faço) e acima de tudo, pelo amor incondicional que me ensinaram a sentir.

A Equipe da Emergência do Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira, por permitir a coleta de amostras clínicas dos pacientes atendidos naquela unidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Microbiologia *Prof. Paulo de Góes* e ao Departamento de Virologia, representados pela Professora Thaís Souto-Padron, Coordenadora de Pós-Graduação, Professora Agnes Marie de Sá Figueiredo, Diretora do IMPPG e Professor Davis Fernandes Ferreira, Chefe do Departamento de Virologia.

*Na vida, não vale tanto o que temos
Nem tanto importa o que somos.*

*Vale o que realizamos
Com aquilo que possuímos
E, acima de tudo
Importa o que fazemos de nós.
(Francisco Cândido Xavier)*

Aos meus pais, Elizabeth e José Gabriel, pela formação que me proporcionaram, não só a intelectual, mas a de caráter e personalidade, por terem me ensinado que todo esforço é recompensado e que nada vem sem ele. Ao meu irmão, Carlo Fabiano, que sempre foi e sempre será meu exemplo, minha base. A minha irmã, Maria Angélica, que apesar da distância sempre me teve amor.

Ao meu marido pelo apoio desde a monografia. Por ter me feito seguir em frente quando pensava em desistir. Por ter valorizado, o que eu mesma, por tantas vezes, desvalorizei. Pela calma, quando ela me faltava. Por ter acreditado.

Infecções Respiratórias Virais em Crianças nas Cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis

Autora: Maria Carolina Maciel de Albuquerque

Orientadora: Norma Suely de Oliveira Santos

Resumo da tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia *Prof. Paulo de Góes*, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

RESUMO

As infecções virais são uma das principais causas de doença respiratórias em crianças. A maioria destas infecções é causada pelo vírus sincicial respiratório (RSV), vírus influenza A e B (FluV), vírus parainfluenza humano (HPIV), rinovírus humano (HRV), e adenovírus humano (HAdV). Alguns vírus descritos recentemente, tais como o metapneumovírus humano (HMPV), o bocavírus humano (HBoV), e os coronavírus humanos (HCoVs) NL63 e HKU1, têm sido identificados como potenciais patógenos respiratórios. Além disso, dois novos poliomavírus humanos (HPyV), KIPyV e WUPyV, têm sido detectados em pacientes com infecções respiratórias. O objetivo deste estudo foi identificar a presença e a frequência de patógenos virais causando infecção em crianças nas cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis. *Swabs* nasais de 205 crianças (média de idade 3,3 anos; faixa etária 1 mês a 15 anos) com infecção aguda do trato respiratório foram coletados entre março de 2006 e outubro de 2007 e testados para a presença de patógenos virais. Os espécimes foram coletados de pacientes hospitalizados, atendidos no serviço de emergência ou no ambulatório de dois hospitais universitários nas cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis. Informações clínicas relevantes, incluindo o *status* de hospitalização, idade, sexo, e sintomas clínicos, foram coletadas durante a primeira visita médica através de questionário padrão. Os espécimes foram testados para a presença de FluV A e B, HPIV 1-4, HAdV, RSV, HMPV, HBoV, WUPyV, e KIPyV por PCR convencional. Um

protocolo de PCR em tempo real foi usado para a detecção dos HCoVs (229E, OC43, NL63 e HKU1). Das 205 amostras testadas, 64 (31,2%) foram positivas para pelo menos um dos patógenos virais especificados acima. Dentre os vírus de RNA, 33 amostras foram positivas para HRV (51,6%), 5 amostras foram positivas para FluV A (7,8%), 5 amostras foram positivas para HMPV (7,8%), 4 amostras foram positivas para HCoV (6,3%) e 3 amostras foram positivas para RSV (4,6%). Para os vírus de DNA foram detectadas 5 amostras positivas para HBoV (7,8%) e 1 amostra positiva para HAdV (1,6%). Foram identificados 8 casos de co-infecção (12,5%; - HCoV-NL63 + HMPV, HCoV-NL63 + RV, HMPV + RV + HCoV-OC43 + AdV, HMPV + KIPyV, HBoV + RV, HBoV + WUPyV, FluV A + RV, RSV + HCoV-OC43), incluindo duas amostras positivas para KIPyV e WUPyV. Não foi detectado amostra positiva para HPIV nem FluV B. Os sintomas clínicos mais freqüentes foram febre, rinorréia, tosse, dor de garganta, chiado, bronquiolite e pneumonia. Poucos estudos demonstraram a circulação de HMPV e HBoV, entre crianças brasileiras, e até onde sabemos, nenhum descreveu a circulação dos novos HCoVs ou HPyV como patógenos respiratórios no Brasil. O fato de HMPV, HBoV, HCoV-HKU1 ou HCoV-NL63, ou os recém descritos KIPyV ou WUPyV estar presente em 9,2% das amostras testadas sugere que estes vírus podem ser patógenos respiratórios importantes no país. Contudo, mais estudos são necessários, incluindo grupos controles apropriados, para demonstrar que esses novos vírus atuam como agentes etiológicos de doença respiratória no Brasil.

Palavras-chave: 1. Infecções Respiratórias, 2. Diagnóstico Viroológico, 3. Epidemiologia.

Rio de Janeiro
Abril de 2009

Viral Respiratory Infections among Children in the Cities of Rio de Janeiro and Teresópolis

Autora: Maria Carolina Maciel de Albuquerque

Orientador: Norma Suely de Oliveira Santos

Resumo da tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia *Prof. Paulo de Góes*, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

ABSTRACT

Viral infections are one of the leading causes of respiratory disease in children. Most of these infections are caused by respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus A and B (FluV), human parainfluenza virus (HPIV), human rhinovirus (HRV), and human adenovirus (HAdV). Several recently discovered viruses, such as human metapneumovirus (HMPV), human bocavirus (HBoV), and the human coronaviruses (HCoVs) NL63 and HKU1, have been identified as potential respiratory pathogens. In addition, two new human polyomaviruses (HPyVs), KIPyV and WUPyV, have been detected in patients with respiratory infections. The goal of this study was to identify the presence and frequency of viral pathogens causing respiratory infections in children in the cities of Rio de Janeiro and Teresópolis. Nasal swabs from 205 children (median age 3.3 years; range 1 month to 15 years) with acute upper or lower respiratory illnesses were collected from March 2006 through October 2007 and tested for viral pathogens. The specimens were collected from hospitalized patients, emergency departments, and walk-in clinics at 2 university hospitals in the cities of Rio de Janeiro and Teresópolis. Relevant clinical information, including patients' hospitalization status, age, sex, and clinical symptoms, was collected during the first medical visit by means of a standard questionnaire. Specimens were tested for presence of FluV A and B,

HPIV 1- 4, HAdV, RSV, HRV, HMPV, HBoV, WUPyV, and KIPyV by conventional PCR assays. A real-time PCR protocol was used for detection of HCoVs (229E, OC43, NL63, and HKU1). Of the 205 samples tested, 64 (31.2%) were positive for at least 1 of the viral pathogens specified above. Among the RNA viruses, 33 (51.6%) samples tested positive for HRV, 5 (7.8%) for FluV A, 5 (7.8%) for HMPV, 4 (6.3%) for HCoV and, 3 (4.6%) for RSV. For the DNA viruses, 5 (7.8%) samples were positive for HBoV and 1 (1.6%) for HAdV. Co-infections was detected in 8 samples (12.5% - - HCoV-NL63 + HMPV, HCoV-NL63 + RV, HMPV + RV + HCoV-OC43 + AdV, HMPV + KIPyV, HBoV + RV, HBoV + WUPyV, FluV A + RV, RSV + HCoV-OC43), including two samples positive for KIPyV e WUPyV. The most frequent clinical symptoms were fever, rhinorrhea, cough, sore throat, wheezing, bronchiolitis, and pneumonia. Few studies have demonstrated the circulation of HMPV and HBoV, among Brazilian children, and to our knowledge, none have described the circulation of the new HCoVs or HPyVs as respiratory pathogens in Brazil. Our finding that HMPV, HBoV, HCoV-HKU1 or HCoV-NL63, or the newly described KIPyV or WUPyV was present in 9.2% of the tested samples suggests that these viruses could be important respiratory pathogens in the country. However, further investigative studies that include appropriately matched control groups will be necessary to demonstrate that these novel viruses act as etiologic agents of respiratory disease in Brazil.

Keywords: Respiratory Infections, Viral Diagnostic, Epidemiology.

Rio de Janeiro

April, 2009

SUMÁRIO

Introdução	1
1. Infecções Respiratórias.....	1
2. Vírus Influenza (FluV).....	11
2.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento.....	13
3. Vírus Sincicial Respiratório (RSV).....	17
3.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento.....	19
4. Metapneumovírus Humano (HMPV).....	21
4.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento.....	22
5. Vírus Parainfluenza Humano (HPIV).....	26
5.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento	27
6. Rinovírus Humano (HRV)	28
6.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento.....	30
7. Coronavírus Humano (HCoV).....	32
7.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento.....	34
8. Adenovírus Humano (HAdV).....	36
8.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento.....	37
9. Bocavírus Humano (HBoV).....	39
9.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento.....	40
10. Poliomavírus Humanos (HPyV).....	41
10.1. Epidemiologia	44
11. Diagnóstico Laboratorial das Infecções Respiratórias Virais.....	45
Objetivos	47
Objetivo Principal.....	47
Objetivos Específicos.....	47
Material e Métodos	48
1. População e Amostra.....	48
2. Critérios de Inclusão e Exclusão.....	48
2.1. Critérios de inclusão.....	48
2.2. Critérios de exclusão.....	49
3. Definição de Infecção Respiratória Aguda.....	49

4. Procedimento de Coleta de amostras.....	49
5. Criação do Banco de Dados.....	49
6. Questões Éticas	50
7. Meio de Transporte de Vírus (MTV)	50
8. Vírus Padrão	50
9. Detecção de Vírus com Genoma de RNA	51
9.1. Extração do RNA Viral.....	51
9.2. Detecção de RNA viral através de RT-PCR.....	51
10. Detecção de Vírus com Genoma de DNA	53
10.1. Extração de DNA viral.....	53
10.2. Detecção de DNA viral através de PCR.....	54
11. Detecção de HCoV por <i>real-time</i> RT-PCR.....	55
12. Seqüenciamento dos produtos amplificados para confirmação dos vírus detectados.....	56
12.1. Purificação do produto obtido na PCR.....	56
12.2. Quantificação do produto da PCR purificado	56
12.3. Reação de seqüenciamento (<i>Cycle Sequencing</i>).....	57
12.4. Análise das seqüências.....	57
Resultados	63
Discussão	81
Conclusões	94
Referências Bibliográficas	96
Anexo I – Ficha para coleta de informações clínicas	134
Anexo II – Manuscrito 1	135
Anexo III – Manuscrito 2	139

Índice de Tabelas e Quadros

Quadro 1.	Síndromes respiratórias causadas por patógenos virais.....	4
Quadro 2.	Sumário da distribuição e associação clínica dos vírus emergentes associados com infecção do trato respiratório em humanos.....	7
Quadro 3.	Relação dos oligonucleotídeos utilizados para cada um vírus pesquisado.....	58
Quadro 4.	Ciclos da PCR e <i>Nested-PCR</i> aplicado à cada vírus pesquisado.	61
Quadro 5.	Oligonucleotídeos e sondas utilizadas no <i>real-time</i> PCR para detecção de HCoV.....	62
Tabela 1.	Positividade das amostras analisadas para os diferentes vírus pesquisados.....	68
Tabela 2.	Freqüência dos principais sintomas clínicos observados entre os pacientes apresentando infecção por um único vírus.....	75
Tabela 3.	Características clínicas dos pacientes apresentando infecções do trato respiratório causadas por vírus.....	78

Índice de Figuras e Gráficos

Figura 1.	Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do FluV A.....	13
Figura 2.	Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do RSV.....	18
Figura 3.	Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do HMPV.....	23
Figura 4.	Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do HPIV.....	27
Figura 5.	Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do HRV.....	29
Figura 6.	Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do HCoV.....	33
Figura 7.	Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do HAdV.....	37
Figura 8.	Estrutura da partícula e micrografia eletrônica dos Parvovírus.....	40
Figura 9.	Estrutura da partícula e micrografia eletrônica dos Poliomavírus.....	44
Gráfico 1.	Distribuição etária dos pacientes participantes do estudo.....	64
Gráfico 2.	Distribuição dos pacientes participantes do estudo, com relação ao <i>status</i> de hospitalização.....	64
Gráfico 3.	Principais sintomas clínicos apresentados pelos pacientes participantes do estudo.....	65
Gráfico 4.	Percentual de amostras positivas encontradas neste estudo	66
Gráfico 5.	Distribuição das amostras positivas em relação ao local de coleta.....	67
Gráfico 6.	Representação gráfica dos resultados das amostras positivas quanto à detecção de vírus.....	69
Gráfico 7.	Representação gráfica da sazonalidade das amostras positivas.....	70
Gráfico 8.	<i>Status</i> dos pacientes positivos para patógenos virais.....	71
Gráfico 9.	Distribuição etária dos pacientes apresentando infecção por um único vírus.....	74
Figura 10.	Representação gráfica dos principais sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com infecção simples por HCoV-HKU1 e NL63, HMPV, HBoV, HRV, FluV A e RSV	76

Gráfico 10 *Status* de hospitalização dos pacientes apresentando infecções infecção simples com relação ao vírus detectado.. 77

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
- ARTIs - Infecções agudas do trato respiratório (*Acute Respiratory Tract Infections*)
- cDNA - Ácido desoxiribonucléico complementar
- CPE – Efeito citopatogênico
- dATP - desoxiAdenosina trifosfatada
- dCTP - desoxiCitidina trifosfatada
- dGTP - desoxiGuanosina trifosfatada
- DMSO - dimetil sulfóxido
- DNA – Ácido desoxiribonucléico
- DNase – Desoxiribonuclease
- dTTP - desoxiTimidina trifosfatada
- FluV – Vírus influenza
- HA - Hemaglutinina
- HAdV - Adenovírus
- HBoV - Bocavírus humano
- HCoV – Coronavírus humano
- HMPV - Metapneumovírus humano
- HPIV – Vírus parainfluenza humano
- HPyV – Poliomavírus humano
- HRV – Rinovírus humano
- ICTV - Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (*International Committee on the Taxonomy of Virus*)
- KIPyV – Poliomavírus humano KI (*Karolinska Institutet*)
- LRIs - Infecções do trato respiratório inferior (*Lower Respiratory Infections*)
- MTV - Meio de Transporte de Vírus
- NA – Neuraminidase
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- pH – Potencial hidrogeniônico

PML - Leucoencefalopatia multifocal progressiva (*Progressive Multifocal Leukoencephalopathy*)

RNA – Ácido ribonucléico

RNAse – Ribonuclease

RSV – Vírus sincicial respiratório

RT-PCR – Reação de transcrição reversa associada a reação em cadeia da polimerase

SARS - Síndrome respiratória aguda grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome*)

Tris-HCl: Tris[hidroximetil]aminometano – ácido clorídrico]

UV – Ultra violeta

WUPyV - Poliomavírus humano WU (*Washington University*)

Introdução

1. Infecções Respiratórias

Infecções agudas do trato respiratório (*Acute Respiratory Tract Infections* – ARTIs) representam a causa mais comum de doença em humanos e uma das principais causas de mortalidade no mundo inteiro atingindo principalmente crianças, as quais podem sofrer múltiplos episódios de ARTIs por ano, até os 10 anos de idade [Monto, 2002, Arnold *et al.*, 2006; Khan, 2007; Sloots *et al.*, 2008]. Embora haja variações consideráveis na mortalidade infantil, particularmente na África onde – diferente de outras regiões – malária e AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) aparecem entre as dez principais causas de morte na infância, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou as infecções do trato respiratório inferior (*Lower Respiratory Infections* - LRIs) como a segunda principal causa de morte entre crianças abaixo de cinco anos de idade [Murray *et al.*, 2001]. Nos Estados Unidos, as ARTIs são a sexta causa de morte, responsáveis por mais de meio milhão de hospitalizações, além de levar oito a dez milhões de pacientes a buscarem tratamento médico anualmente [Schappert, 1997; Barlett, *et al.*, 2000]. Em países em desenvolvimento, o risco de mortalidade pode ser até trinta vezes maior do que em países desenvolvidos [OPAS, 1995].

As infecções respiratórias causadas por vírus possuem um papel importante na saúde pública. Doenças respiratórias agudas virais estão entre as

doenças mais comuns acometendo adultos e crianças [Couceiro & Albuquerque, 2008; Treanor, 2009]. O trato respiratório está sujeito a infecções causadas por vírus de genoma composto tanto por DNA quanto por RNA, os quais produzem síndromes clínicas variando em gravidade, desde quadros clinicamente sem importância até doenças fatais (Quadro 1). Cada um desses vírus pode ser responsável por diferentes síndromes clínicas dependendo da idade e estado imunológico do hospedeiro. Por outro lado, cada uma das síndromes respiratórias associadas a infecções virais pode ser causada por uma variedade de patógenos virais [Couceiro & Albuquerque, 2008; Treanor, 2009]. A mortalidade devido à infecção respiratória viral aguda, em indivíduos imunocompetentes é baixa, em países desenvolvidos, com exceção de epidemias causadas pelo vírus influenza e, possivelmente, infecções pelo vírus sincicial respiratório. Contudo, infecção respiratória aguda é uma das principais causas de mortalidade infantil em países em desenvolvimento, responsável por cerca de 4,5 milhões de mortes anuais entre crianças menores de cinco anos de idade [Berman, 1991]. Agentes virais são identificados em cerca de 3% a 40% dos casos de doença respiratória em países em desenvolvimento e contribuem para cerca de 6% a 21% das mortes [Berman, 1991].

Os vírus sincicial respiratório (RSV), parainfluenza humano (HPIV), influenza (FluV), alguns adenovírus humanos (HAdV), coronavírus humano (HCoV), e rinovírus humano (HRV) são reconhecidamente associados a doenças respiratórias no homem. Dentre eles, o FluV é o responsável pelo maior número de mortes, principalmente em pacientes de risco como idosos e imunodeficientes.

Essas infecções também representam grandes perdas econômicas, já que geram faltas à escola e/ou ao trabalho e gastos hospitalares [Mufson, 2000].

Infecções do trato respiratório superior como doença influenza-*like* (*flu-like*), resfriados e bronquites, são extremamente freqüentes entre pacientes não hospitalizados. Os rinovírus são os agentes mais freqüentemente associados a essas infecções, embora outros vírus também possam causar tais quadros (Quadro 1). Todos os chamados “vírus respiratórios” podem causar pneumonia em crianças e adultos, embora o rinovírus raramente o faça, ou quando isso ocorre acomete, em geral, pessoas com graves problemas pulmonares. O RSV e o HPIV são a principal causa de bronquiolite em crianças. Durante epidemias de FluV e RSV, muitos dos casos de pneumonia entre adultos são resultado de infecções bacterianas secundárias. [Mufson, 2000; Treanor, 2009].

Quadro 1. Síndromes respiratórias causadas por patógenos virais [adaptado de Couceiro & Albuquerque, 2008].

Vírus	Frequência ^a da síndrome										
	Gripe/Flu- like	Resfriado	Faringite	Traqueobronquite	Crupe	Bronquiolite	Otite Média	Pneumonia			
								Crianças ^b	Adultos	Imunocomprometidos	
Vírus de RNA											
FluV A	++++	+	++	+++	++	+	-	++	++++	+	
FluV B	++++	+	++	++	+	+	-	+	++	+	
HPIV-1	+	+	++	+	++++	+	-	-	-	-	
HPIV-2	+	+	++	+	++	+	-	-	-	-	
HPIV-3	+	+	++	+	+++	++	+	+++	+	+	
RSV	+	++	+		++	++++	++	++++	+	++	
HMPV	+	+	+		++	++++	++	++++	+	++	
HRV	+	+++	++	+	+	+	+	+	-	-	
HCoV	+	++	+	-	+	+	+	+	-	-	
SARS-CoV	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	
HCoV-NL63	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	
HCoV-HKU1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
Vírus de DNA											
HAdV	++	++	++	+	++	++	-	++	++	++	
HBoV	-	++	-	-	-	+++	-	+++	++	++	
KIPyV e WUPyV	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	

^a (+) casos reportados ocasionalmente; (++) causa 1 – 5% dos casos; (+++) 15 – 25% dos casos; (++++) mais de 25% dos casos reportados; (-) não descrito ^b indivíduos menores de cinco anos de idade. FluV A = vírus influenza A; FluV B = vírus influenza B; HPIV = vírus parainfluenza humano; RSV = vírus sincicial respiratório; HMPV = metapneumovírus humano, HCoV = coronavírus humano; SARS-CoV = Coronavírus associado a Síndrome Respiratória Aguda Grave; HAdV = adenovírus humano; HBoV = bocavírus humano; KIPyV e WUPyV = poliomavírus humano KI e WU.

Os vírus que acometem o trato respiratório são transmitidos por contato direto e aerossóis. Muitos fatores contribuem para gravidade da doença, incluindo características virais, quantidade do inóculo e fatores do hospedeiro, como idade, estado de saúde, estado imunológico, fatores socioeconômicos e nutricionais [Mufson, 2000; Treanor, 2009].

Enquanto as características clínicas das ARTIs são facilmente reconhecidas, o agente etiológico responsável pela doença freqüentemente não é detectado. Muitos casos de infecção respiratória aguda não eram relacionados a agentes etiológicos conhecidos, talvez por falta de métodos diagnósticos que identificassem esses agentes. O progresso recente da vigilância epidemiológica e da biologia molecular tem permitido a identificação rápida de diversos agentes respiratórios emergentes. Entretanto, mesmo com a utilização das mais avançadas e sensíveis metodologias, apenas 40-60% das infecções têm sido associadas a um agente etiológico [Kuiken *et al.*, 2003; Kahn, 2007; Arnold *et al.*, 2008; Canducci *et al.*, 2008; Sloots *et al.*, 2008], sugerindo a existência de outros patógenos ainda não identificados. De fato, na última década foram descritas novas variantes do vírus influenza A aviário como a H5N1 [Chan, 2002], H9N2 [Peiris *et al.*, 1999] e H7N7 [CDC, 2003a]. Além disso, desde 2001 sete vírus anteriormente desconhecidos foram identificados após análise de espécimes clínicos do trato respiratório de humanos (Quadro 2) [para revisão ver Kahn 2007; Sloots *et al.*, 2008]. Estes vírus recentemente descritos incluem: o metapneumovírus humano (HMPV) descrito em 2001 [van den Hoogen *et al.*, 2001], três novos coronavírus humanos (HCoVs) - o coronavírus associado a síndrome respiratória aguda grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome* –

SARS, SARS-CoV) descrito em 2003 [Ksiazek *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003], coronavírus NL63 (HCoV-NL63) descrito em 2004 [van der Hoek *et al.*, 2004; Fouchier *et al.*, 2004] e coronavírus HKU1 (HCoV-HKU1) descrito em 2005 [Woo *et al.*, 2005a]; o bocavírus humano (HBoV) descrito em 2005 [Allander *et al.*, 2005] e recentemente dois poliomavírus humanos descritos em 2007 - KIPyV (*Karolinska Institutet Polimoavirus*) [Allander *et al.*, 2007a] e o WUPyV (*Washington University Polyomavirus*) [Gaynor *et al.*, 2007].

Em 1997, foi descrito em Hong Kong um surto de gripe ocorrido em consequência da transmissão direta de um vírus influenza A (H5N1) altamente patogênico, de galinhas para seres humanos [Chan, 2002]. Neste surto, foram registrados 18 casos da doença dos quais seis foram fatais. Embora o surto tenha sido controlado pela destruição de milhões de aves, casos esporádicos foram descritos em humanos [Yuen & Wong, 2005]. Entre janeiro de 2004 e junho de 2005, 108 casos de infecção pelo FluV A H5N1 em humanos foram descritos em outras regiões da Ásia: Vietnã (87 casos e 38 mortes), Tailândia (17 casos e 12 mortes) e Camboja (4 casos e 4 mortes) [CDC, 2005].

Em 1999, novamente em Hong Kong, outro FluV A aviário (H9N2) foi isolado a partir de aspirado de nasofaringe de duas crianças hospitalizadas apresentando infecção do trato respiratório superior [Peiris *et al.*, 1999]. Mais um caso de infecção humana por esse vírus foi descrito em 2003 [Yuen & Wong, 2005].

Quadro 2. Sumário da distribuição e associação clínica dos vírus emergentes associados com infecção do trato respiratório em humanos.

Vírus	Grupo etário	Deteção	Quadro Clínico	Referência
HMPV	Crianças e idosos	3 – 25%	Bronquiolite, bronquite, pneumonia, rinorréia, tosse, dor de garganta	van den Hoogen <i>et al.</i> , 2001
SARS-HCoV	Todas as idades	esporádico	Pneumonia	Ksiazek <i>et al.</i> , 2003; Rota <i>et al.</i> , 2003
HCoV-NL63 e HCoV-HUK1	Crianças e idosos	1 – 10%	Bronquiolite, pneumonia, rinorréia, febre, tosse, chiado	van der Hoek <i>et al.</i> , 2004; Fouchier <i>et al.</i> , 2004; Woo <i>et al.</i> , 2005a
HBoV	Crianças	1 – 11%	Bronquiolite, pneumonia, otite media, asma ¹	Allander <i>et al.</i> , 2005
KIPyV e WUPyV	Crianças	1 – 7%	Bronquiolite, pneumonia, tosse ¹	Allander <i>et al.</i> , 2007a; Gaynor <i>et al.</i> , 2007

Adaptado de Sloots *et al.*, 2008. ¹até o momento não existe comprovação de que HBoV, KIPyV e WUPyV são agentes etiológicos de doença respiratória em humanos.

O exemplo mais recente de transmissão direta do FluV de aves para humanos ocorreu durante uma epidemia do influenza aviário H7N7 na Holanda em 2003 e causou uma morbidade considerável em humanos com pelo menos um caso fatal. A infecção por esse vírus foi confirmada em 83 pessoas que trabalhavam em aviários, e em três casos a infecção foi subsequente transmitida entre humanos. Embora a maioria das pessoas infectadas tenha apresentado apenas conjuntivite ou sintomas brandos de doença *flu-like*, uma pessoa morreu de pneumonia [CDC, 2003a].

O metapneumovírus humano (HMPV) é um excelente exemplo de patógeno importante que teve sua detecção possibilitada pela melhora dos testes diagnósticos. Esse vírus foi descrito inicialmente por van der Hoogen e colaboradores, na Holanda em 2001, em aspirado de nasofaringe de 28 crianças, sofrendo de ARTI, coletados ao longo de 20 anos [van den Hoogen *et al.*, 2001]. Apesar do quadro clínico típico de infecção viral, muito semelhante à doença causada por RSV, nenhum patógeno havia sido isolado desses espécimes. Os pesquisadores inocularam esse material em cinco diferentes linhagens celulares: Vero (rim de macaco verde), tMK (células terciárias de rim de macaco), A549 (carcinoma de pulmão humano), MDBK (rim de bovino) e CEF (fibroblasto de embrião de galinha). A replicação viral foi muito lenta nas células tMK, muito pobre em Vero e A549, e ausente em MDBK e CEF. Somente na célula tMK, observou-se uma replicação lenta e dependente de tripsina. O efeito citopatógeno (CPE) obtido foi semelhante ao observado em células infectadas com RSV, com formação de sincícios e destruição celular. A observação do isolado através de microscopia eletrônica revelou partículas pleomórficas e

semelhantes à paramixovírus. Após a inoculação do isolado viral em aves (perus e galinhas) e macacos *cynomologus*, os pesquisadores obtiveram replicação viral e sintomas clínicos somente em macacos. Desta forma eliminaram a possibilidade de que poderia se tratar do pneumovírus aviário [van den Hoogen *et al.*, 2001]. Posteriormente, o HMPV foi descrito associado a doenças respiratórias em diversas partes do mundo [para revisão ver: Kuiken *et al.*, 2003; Alto, 2004; Crowe Jr., 2004; Jennings *et al.*, 2004; Mejías, Chávez-Bueno & Ramilo, 2004; Deffrasnes, Hamelin & Boivin, 2007].

Talvez a SARS seja a doença emergente que mais tenha atraído a atenção dos pesquisadores nos últimos anos. Foi inicialmente reportada no outono de 2002 no sudeste da China como uma pneumonia contagiosa, grave e atípica acometendo humanos. A síndrome tornou-se um problema de saúde global em dois meses e em consequência a OMS emitiu um alerta global pela primeira vez em mais de duas décadas [WHO, 2003a]. A maioria dos casos ocorreu na China, Hong Kong, Taiwan, Canadá, Cingapura, Vietnã, Estados Unidos e Filipinas. Ao final da epidemia, em julho de 2003, 8098 casos de SARS foram registrados, dos quais 774 foram fatais [CDC, 2003b; WHO, 2003b]. A identificação e a caracterização do agente etiológico foram agilizadas devido à cooperação entre uma rede internacional de laboratórios da OMS que utilizou uma ampla variedade de técnicas de diagnóstico laboratorial. Como resultado, um novo coronavírus humano (SARS-CoV) foi identificado como o provável agente etiológico da SARS [Ksiazek *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003].

Devido à atenção dada aos coronavírus em função da SARS, a partir de 2003 as pesquisas sobre esses vírus foram intensificadas e, como consequência, dois outros coronavírus humanos foram descritos desde então. Em março de 2004, van der Hoek e colaboradores, na Holanda, isolaram o HCoV-NL63 a partir de aspirado de nasofaringe de uma criança de sete meses de idade hospitalizada com bronquiolite, conjuntivite e febre [van der Hoek *et al.*, 2004]. Um mês depois, também na Holanda, Fouchier e colaboradores, caracterizaram o mesmo vírus isolado de *swab* nasal coletado no ano de 1998 de uma criança de oito anos de idade com pneumonia [Fouchier *et al.*, 2004]. Foram realizados estudos retrospectivos com amostras coletadas entre novembro de 2000 e agosto de 2003, os quais demonstraram a circulação do vírus em humanos [Fouchier *et al.*, 2004; van der Hoek *et al.*, 2004]. Logo em seguida, o HCoV-NL63 também foi descrito na França e Japão, causando doença respiratória, cujos principais sintomas são febre, rinite, bronquiolite, otite, faringite e conjuntivite [Suzuki *et al.*, 2005a; Vabret *et al.*, 2005]. Em janeiro de 2005, Woo e colaboradores, na China, descreveram o isolamento de um novo coronavírus, HCoV-HKU1 a partir de aspirado de nasofaringe de dois pacientes com pneumonia (um homem de 71 anos de idade e uma mulher de 35 anos de idade) [Woo *et al.*, 2005a].

Em 2005, foi descrito na Suécia o bocavírus humano (HBoV), detectado em um *pool* de aspirados de nasofaringe de crianças com infecção do trato respiratório. Foi o primeiro vírus identificado pela metodologia de triagem molecular de vírus, um procedimento baseado no tratamento das amostras clínicas com DNase, amplificação randômica e clonagem, seguido de

seqüenciamento e análise bioinformática [Allander *et al.*, 2005]. No mesmo estudo, foi realizada uma triagem de 540 aspirados de nasofaringe coletados entre 2003 e 2004, para avaliar a freqüência deste agente. Foi observada uma positividade de 3,1% das amostras demonstrando a circulação do HBoV na população infantil da Suécia [Allander *et al.*, 2005].

Mais recentemente, foram publicadas evidências da existência de dois novos poliomavírus infectando o trato respiratório de humanos. O KIPyV, isolado de fezes e aspirados de nasofaringe na Suécia, durante um estudo randômico para detectar vírus desconhecidos de amostras previamente coletadas no ano de 2004 [Allander *et al.*, 2007a] e WUPyV, isolado de amostras respiratórias na Austrália em um paciente de três anos de idade com o quadro de pneumonia [Gaynor *et al.*, 2007]. Por terem sido isolados de material respiratório, estes agentes estão sendo associados à doença do trato respiratório.

2. Vírus Influenza (FluV)

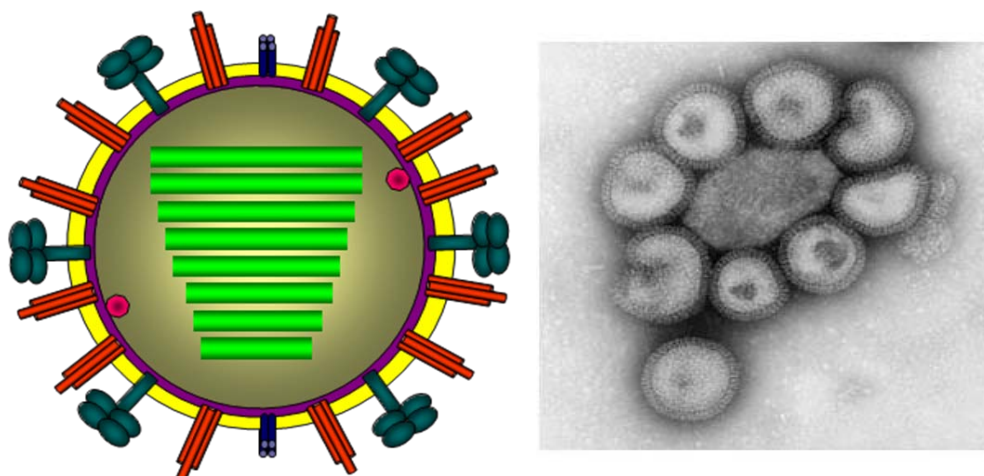
Os FluVs fazem parte da família *Orthomyxoviridae*, são envelopados, possuem capsídeo de simetria helicoidal (Figura 1) e genoma constituído de RNA de fita simples, polaridade negativa, apresentando de seis a oito segmentos. Essa família é composta por cinco gêneros: *A*, *B*, *C*, *Thogotovirus* e *Isavirus* (influenza *A*, *B* e *Isa* - oito segmentos de RNA; influenza *C* – sete segmentos e *Thogoto* – seis segmentos). Os FluVs pertencentes ao gênero *B* e *C* são isolados quase exclusivamente de humanos, embora o FluV *B* já tenha sido encontrado em focas e o FluV *C*, em porcos e cachorros. Já o FluV *A*,

infecta uma grande variedade de animais, incluindo, pássaros, porcos, cavalos, humanos e outros mamíferos. Os vírus *Thogoto* e *Dhori* (ambos pertencentes ao gênero *Thogotovirus*) foram isolados de carrapatos na África, e são agentes infecciosos eventualmente responsáveis por quadros de meningite e meningoencefalite em seres humanos, enquanto o vírus *Isa* está relacionado a quadros clínicos de anemia infecciosa em salmões [Wright, Neumann & Kawaoka, 2007; Couceiro & Albuquerque, 2008].

Os FluV A são divididos em subtipos baseados em duas proteínas de superfície: a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA). Existem 16 subtipos diferentes de hemaglutinina e nove subtipos de neuraminidase [Wright, Neumann & Kawaoka, 2007; Couceiro & Albuquerque, 2008].

A primeira amostra de vírus influenza foi isolada de suínos em 1930, mas o isolamento do vírus responsável por esses quadros, em seres humanos, ocorreu somente em 1933. Tais amostras foram classificadas no gênero A, tendo sido detectado, em 1940, outro tipo de vírus influenza, que foi classificado no gênero B. Nove anos mais tarde, foi identificado outro vírus influenza, classificado, então, no gênero C. Em 1960 e 1961, respectivamente, foram isolados os vírus influenza *Thogoto*, *Dhori* e *Isa* [revisado por Wright, Neumann & Kawaoka, 2007 e Couceiro & Albuquerque].

Figura 1. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do FluV A.



Fontes: Couceiro e Albuquerque, 2008 e

<http://www.allamericanpatriots.com/files/images/influenza-virus.jpg>, acesso em 05/03/2009.

2.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento

Os FluVs, conhecidos como vírus da gripe, são responsáveis por infecções respiratórias agudas. A primeira pandemia conhecida ocorreu no período entre 1889 e 1892, teve início na Rússia e foi a mais grave de todas, tendo levado à morte 40 a 50 milhões de pessoas. A pandemia de 1918, ou gripe espanhola, percorreu o mundo em três ondas, assolando por mais de uma vez o mesmo país com o saldo final de 50 milhões de mortos e foi causada pela amostras de influenza A H1N1 [revisado por Taubenberger & Morens, 2008]. No século XX, quatro outras pandemias ocorreram: a gripe Asiática (1957) causada pela introdução da variante H2N2, Hong Kong (1968) causada pela variante H3N2, Russa (1977) causada pela reintrodução da variante H1N1 e Aviária

(1997) causada pela introdução da variante H5N1, todas elas originadas em episódios de infecção entre aves na Ásia [para revisão ver de Jong *et al.*, 2000].

É estimado que nos Estados Unidos ocorram anualmente 25 - 50 milhões de casos de gripe, levando a 150.000 hospitalizações e 30.000 – 40.000 mortes [revisado por Girard *et al.*, 2005]. Se estes números forem extrapolados para o resto do mundo, a média global do impacto das infecções inter-pandêmicas pelo FluV A pode ser na ordem de aproximadamente um bilhão de casos incluindo cerca de 3 – 5 milhões de casos de doença grave e 300.000 – 500.000 mortes anuais [Girard *et al.*, 2005].

Epidemias e surtos de influenza ocorrem em diferentes padrões sazonais dependendo da região. Em áreas de clima temperado (hemisfério norte) a “temporada de gripe” se inicia no final do outono e atinge o pico entre o meio e o final do inverno. Em áreas tropicais, a sazonalidade é menos pronunciada, ocorrendo o isolamento do vírus ao longo do ano [Girard *et al.*, 2005; Elliot & Fleming, 2008]. Em países industrializados, as epidemias anuais de influenza atingem cerca de 5% a 15% da população, e causam doença febril que varia em gravidade, de branda até debilitante, podendo levar em alguns casos a hospitalizações e mesmo ao óbito. A morte ocorre principalmente como consequência de uma pneumonia fulminante, causada pela infecção primária pelo FluV ou em decorrência de uma infecção bacteriana secundária, facilitada por uma patologia pulmonar ou cardíaca de base. O risco de desenvolver complicações é agravado nos pacientes muito jovens e idosos [Girard *et al.*, 2005; Elliot & Fleming, 2008].

Clinicamente a gripe surge após um período de incubação de 24 a 72 horas, podendo chegar a atingir quatro a cinco dias, dependendo da infecciosidade e quantidade de inóculo viral e do estado imunológico do hospedeiro. Após o desaparecimento da febre, que surge no segundo ou terceiro dia após a infecção, o acometimento do trato respiratório inferior se intensifica, surgindo sintomas como tosse com catarro e fraqueza que podem durar até duas semanas. A obstrução nasal e a faringite são comuns, também podendo ocorrer conjuntivite. Após seis a 24 horas do início dos sintomas, uma pneumonia grave pode surgir abruptamente, com taquipnéia, taquicardia, cianose, febre alta e hipotensão, levando à hipóxia e morte dentro de um a quatro dias. Nestes casos, pode existir uma infecção viral combinada especialmente com *Streptococcus epidermidis*, *Haemophilus influenzae* ou *Staphylococcus aureus*. O paciente pode apresentar uma pneumonia bacteriana ou sinusite secundárias, pela perda da camada mucociliar do epitélio do trato respiratório [Couceiro & Albuquerque, 2008].

Diferentemente do que ocorre com os FluVs dos gêneros *A* e *B*, o FluV do gênero *C* leva, geralmente, a uma infecção mais branda, semelhante ao resfriado comum, denominação dada às infecções virais do trato respiratório superior não relacionadas à infecção pelos FluVs. As complicações por infecção pelos FluVs podem surgir na forma de bronquite, bronquiolite, laringotraqueobronquite (crupe viral), pneumonia, sinusite, conjuntivite, enterite, exantema e miocardite, sendo maior o risco de sua ocorrência em pacientes imunocomprometidos e idosos, especialmente aqueles com doença cardíco-pulmonar. Em gestantes, a maior

incidência de complicações pode surgir durante o segundo e terceiro trimestres de gravidez, sem conduzir, contudo, a malformações congênitas. Foi observada uma associação entre a infecção por FluV e a exacerbação de quadros de asma [revisado por Couceiro & Albuquerque, 2008].

Vacinas contra os FluV *A* e *B* produzidas com vírus inativado estão licenciadas para uso em humanos [Girard *et al.*, 2005; Elliot & Fleming, 2008]. As variantes virais incluídas na formulação das vacinas são determinadas anualmente pela OMS e pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos [CDC, 2005; Wrigth, Neumann & Kawaoka, 2007]. O uso das vacinas licenciadas produzidas com a partícula viral completa ou antígenos particulados restringe-se principalmente aos idosos com mais de 65 anos e crianças acima de seis meses de idade, neste caso sendo recomendadas duas doses em crianças até oito anos de idade, e uma dose única a partir dos nove anos de idade. A vacina também é recomendada para pacientes de qualquer idade com doenças cardíacas, pulmonares e renais crônicas e indivíduos imunocomprometidos [Couceiro & Albuquerque, 2008].

Como drogas profiláticas, podem ser usadas o cloridrato de amantadina e rimantadina que têm sua ação baseada na inibição do processo de fusão da partícula viral à célula alvo, e o oseltamivir e o zanamivir que são inibidores da neuraminidase viral [Wigg, 2008].

3. Vírus Sincicial Respiratório (RSV)

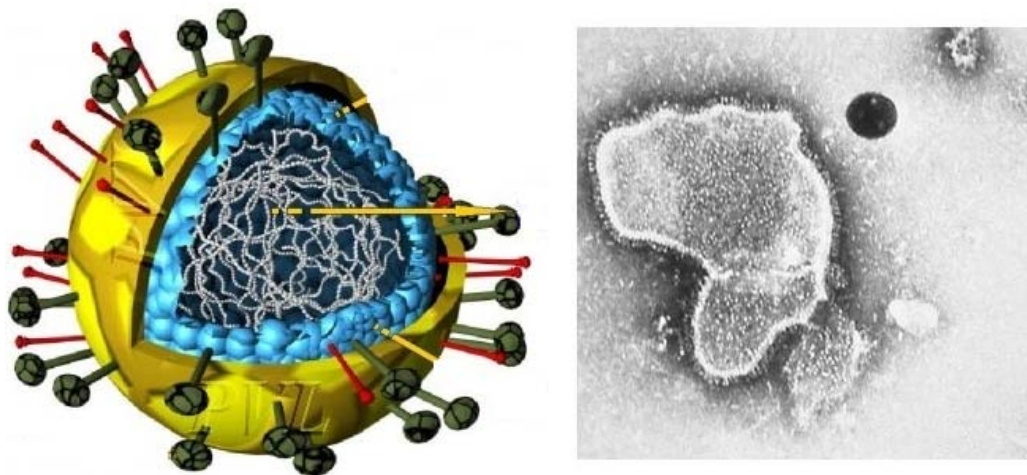
O RSV é um membro da ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Pneumovirus*, espécie *Sincicial Respiratorio Humano* [Collins & Crowe, 2007]. A partícula viral apresenta um diâmetro de cerca de 100 a 350 nm, possui envelope lipoprotéico com espículas virais ou glicoproteínas, projetadas para fora de sua estrutura, envolvendo um capsídeo de simetria helicoidal (Figura 2) contendo o genoma de RNA de fita simples, linear, não-segmentado, de polaridade negativa, de aproximadamente 15 Kb [Collins & Crowe, 2007].

O RSV possui diversidade antigênica pequena. Apesar de apenas um sorotipo ter sido descrito até o momento, dois subgrupos antigênicos, A e B, já foram identificados [Collins & Crowe, 2007]. Amostras do subgrupo A são freqüentemente associadas com doença mais grave, contudo em alguns estudos, amostras do subgrupo B foram consideradas como sendo mais virulentas. A existência de heterogeneidade antigênica pode ser um fator determinante da habilidade dos RSV causarem reinfecções [Collins & Crowe, 2007].

O RSV foi descrito pela primeira vez em 1956, quando um grupo de chimpanzés em uma colônia nos arredores de Washington, DC (Estados Unidos), apresentaram um quadro clínico semelhante ao resfriado comum. Blount e colaboradores isolaram um agente citopático de um desses animais, que tinha doença no trato respiratório superior com coriza, e mal-estar [Blount, Morris & Savage, 1956]. Posteriormente, a variante Long, comumente usada em estudos

laboratoriais, foi isolada de lavado broncopulmonar de uma criança com broncopneumonia e a variante Schneider foi isolada de um paciente com crupe [Chanock & Finberg, 1957; Chanock, Roizman & Myers, 1957]. Com base no efeito citopático do agente em cultura de células, com formação de sincícios, e a similaridade entre os vírus isolados de macaco e das amostras Long e Schneider isolados de humanos, Chanock e colaboradores criaram o termo “Vírus Sincicial Respiratório” para classificar todos os isolados e descreveram a doença em crianças [Chanock & Finberg, 1957; Chanock, Roizman & Myers, 1957]. Posteriormente, Beem e colaboradores descreveram em detalhes a epidemiologia da infecção por RSV durante surtos comunitários [Beem, Egerer & Anderson, 1964].

Figura 2. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do RSV.



Fontes:

<http://template.bio.warwick.ac.uk/staff/easton/IMAGES/Diagrams/3dvirus.jpg> e

<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/rsv06.jpg>, acesso em 05/03/2009.

3.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento

O RSV é a causa mais freqüente de infecção viral do trato respiratório inferior na infância, infectando virtualmente todas as crianças até os três anos de idade [Girard *et al.*, 2005; Leidy *et al.*, 2005; Elliot & Fleing, 2008]. A incidência de infecção primária por RSV é reduzida com o aumento da idade. A imunidade induzida pela infecção primária tem efeito limitado na doença associada à primeira reinfecção. A gravidade da doença geralmente é reduzida a partir da terceira infecção. A freqüência das reinfecções indica que a proteção induzida após a infecção pelo RSV é incompleta [Mufson, 2000; Williams, Piedra & Englund, 2009]. Os fatores de risco associados ao estabelecimento da infecção por RSV incluem baixas condições socioeconômicas, agrupamentos superpopulosos, exposição passiva a cigarro, presença de crianças mais velhas na residência, e permanência em creches [Leidy *et al.*, 2005]. Bebês prematuros com ou sem displasia broncopulmonar ou doença pulmonar crônica, infantes menores de seis meses de idade e infantes com doença cardíaca congênita ou imunocomprometidos são grupos de risco para contrair a infecção e desenvolver complicações ou doença fatal [Leidy *et al.*, 2005].

As epidemias de RSV, em áreas temperadas geralmente ocorrem no final do outono, inverno ou primavera [Collins & Crowe, 2007]. Embora os dois subgrupos possam circular simultaneamente na mesma área geográfica, geralmente existe uma predominância do subgrupo A. Contudo, algumas vezes as infecções pelo subgrupo B são prevalentes e, em certas áreas, pode ocorrer

uma alternância entre os subgrupos A e B [Mufson, 2000, Williams, Piedra & Englund, 2999]. O ciclo de sazonalidade das infecções por RSV é comum. Em um ano o pico ocorre no inverno, no ano seguinte, no final do inverno e início da primavera [Monto, 2004].

O RSV pode causar diversos quadros de doença das vias aéreas, desde resfriado comum até pneumonia. Os aspectos clínicos da infecção por RSV variam de acordo com a idade. A infecção primária, entre seis semanas e dois anos de idade, é normalmente sintomática e envolve o trato respiratório inferior. Infecções assintomáticas por RSV em crianças são raras. Reinfecções em crianças mais velhas são, em geral, menos graves. As infecções do trato respiratório são freqüentemente associadas com chiado, pneumonia e otite média aguda. As infecções por RSV em neonatos diferem daquelas em crianças mais velhas. Os neonatos exibem chiado com menor freqüência, e a apnéia pode ser o único sintoma da infecção. A mortalidade em crianças imunocompetentes é baixa, mas infecções fatais são comuns em pacientes imunocomprometidos e pacientes com anormalidades cardíacas. A pneumonia é um dos sintomas mais comuns em idosos. Os sintomas do trato respiratório inferior, em crianças, como taquipnéia e chiado, normalmente aparecem de um a três dias após o surgimento da rinorréia, representando o espalhamento do vírus para os brônquios e bronquíolos. A recuperação clínica da bronquiolite por RSV pode ocorrer na presença de excreção do vírus no trato respiratório superior. Infecções do trato respiratório superior associadas ao RSV já foram descritas em crianças mais velhas e adultos, na reexposição. Os sintomas mais comuns são rinorréia, congestão nasal, faringite a tosse [Couceiro & Albuquerque, 2008].

A imunoprofilaxia passiva, caracterizada pela infusão parenteral de anticorpos anti-RSV, tem sido utilizada em infantes de alto risco devido à prematuridade, doença pulmonar crônica ou doença cardíaca congênita, além de pacientes imunocomprometidos. Até o momento não existem vacinas contra a infecção por RSV [Collins & Crowe, 2007].

O único antiviral licenciado para o tratamento de infecções por RSV é a ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxiamida; Virazole), um análogo de nucleosídeo, aprovado em 1986. É administrado via aerossol utilizando-se máscaras ou ventilação mecânica. Embora possua atividade *in vitro* contra RSV, a ribavirina raramente é usada devido à falta de evidências convincentes de sua eficácia em crianças imunocompetentes e dificuldade de administração [Williams, 2005; Collins & Crowe, 2007].

4. Metapneumovírus Humano (HMPV)

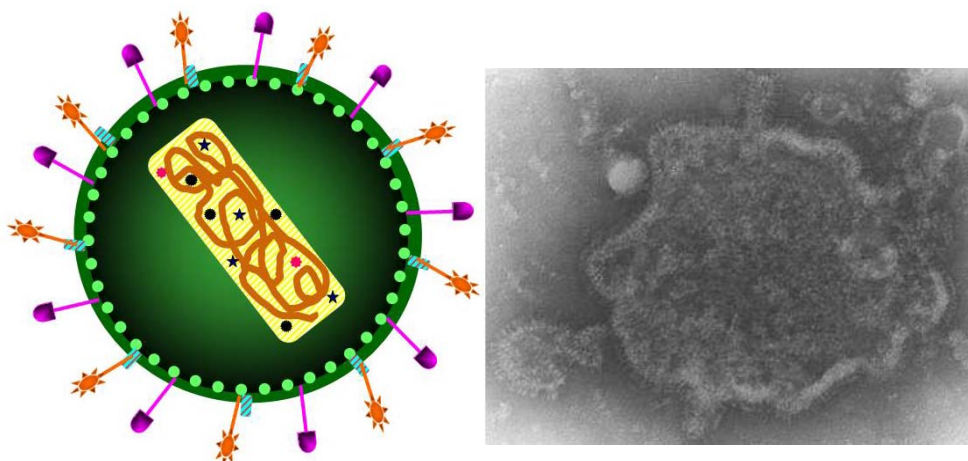
O HMPV é um patógeno classificado na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Metapneumovirus*, espécie *Metapneumovirus Humano* [Collins & Crowe, 2007]. A partícula viral apresenta um diâmetro de cerca de 100 a 600 nm, possui envelope lipoprotéico com espículas virais ou glicoproteínas, projetadas para fora de sua estrutura, envolvendo um capsídeo de simetria helicoidal (Figura 3) contendo o genoma de RNA de fita simples, linear, não-segmentado, de polaridade negativa, de aproximadamente 13 Kb [Collins & Crowe, 2007].

O HMPV foi descrito pela primeira vez em junho de 2001, quando pesquisadores holandeses analisaram 28 aspirados de nasofaringe de crianças com infecção no trato respiratório, coletadas ao longo de 20 anos [van den Hoogen *et al.*, 2001]. Apesar do quadro clínico típico de infecção viral, muito semelhante à doença causada por RSV, nenhum patógeno havia sido isolado desses espécimes. Análises filogenéticas acabaram por revelar um novo vírus, denominado metapneumovírus humano (HMPV), [van den Hoogen *et al.*, 2001; van den Hoogen *et al.*, 2002]. É descrito apenas um sorotipo do HMPV sendo este dividido em dois subgrupos genéticos A e B [Collins & Crowe, 2007].

4.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento

Virtualmente todas as crianças possuem evidências sorológicas de infecção por HMPV após os cinco anos de idade [van den Hoogen *et al.*, 2001]; contudo infecções em adultos são comuns. Entretanto, é provável que a infecção induza proteção parcial contra a doença grave, uma vez que os quadros mais sérios de doença do trato respiratório inferior ocorrem nos primeiros cinco anos de vida [revisado por Deffrasnes, Hameilin & Boivin, 2007].

Figura 3. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do HMPV.



Fontes: Couceiro & Albuquerque, 2008 e

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/vsd13_c.jpg, acesso em 05/03/2009.

O perfil epidemiológico das infecções pelo HMPV é similar ao observado para o RSV. As infecções por HMPV têm sido reportadas em todas as faixas etárias, ocorrendo doença mais grave em crianças menores de dois anos de idade, indivíduos imunocomprometidos e idosos. A incidência do HMPV varia entre 5% a 10% entre crianças hospitalizadas com infecção ARTI e de 12% a 20% em pacientes não hospitalizados. As reinfecções são comuns ao longo da vida, geralmente resultando em doença branda [Deffrasnes, Hameilin & Boivin, 2007].

Os surtos de HMPV ocorrem durante o final do inverno e início da primavera em regiões de clima temperado, com freqüência sobrepondo parcial ou totalmente as epidemias de RSV [Collins & Crowe, 2007]. Contudo, a incidência de HMPV pode variar de acordo com o ano e o local, sugerindo períodos epidêmicos [revisado por: Crowe Jr., 2004; van den Hoogen, Osterhaus & Fouchier, 2004; Williams, 2005].

O período de incubação tem sido estimado em quatro a seis dias. Os sintomas clínicos associados à infecção pelo HMPV em crianças são virtualmente indistinguíveis daqueles causados pelo RSV. As manifestações variam de resfriado comum e infecção branda do trato respiratório superior a infecções mais graves do trato respiratório inferior, tais como bronquiolites e pneumonias, podendo esta última requerer, em alguns casos, hospitalização e ventilação mecânica. Sintomas como tosse, chiado, coriza, febre, diarreia, vômito e dispnéia são freqüentemente vistos em infecções pediátricas por HMPV. A presença de otite média também já foi descrita em associação com este vírus em cerca de um terço dos casos. Assim como outros vírus respiratórios, o HMPV pode induzir a exacerbação de asma em crianças. Em adultos jovens, o HMPV tem sido associado com doença flu-like e resfriado. O vírus também foi associado à doença cardíaca congestiva e doença pulmonar obstrutiva. Pneumonias graves causadas por HMPV têm sido descritas em adultos receptores de órgãos sólidos e medula óssea [para revisão ver: Boivin *et al.*, 2002; Freymuth *et al.*, 2003; Alto, 2004; Esper *et al.*, 2004; Hamelin, Abed & Boivin, 2004; van den Hoogen, Osterhaus & Fouchier, 2004; Suzuki *et al.*, 2005b; Williams, 2005; Deffrenes, Hamelin & Boivin, 2008].

Embora o vírus tenha sido identificado recentemente, vacinas com vírus atenuados já estão sendo desenvolvidas. A maioria das vacinas em desenvolvimento é baseada no sistema de genética reversa, o qual permite a manipulação do genoma viral. Vacinas produzidas com vírus mutantes contendo deleções dos genes SH, M2-2, ou G foram testadas com sucesso em hamsters e macacos verdes africanos, tendo sido demonstradas alta imunogenicidade e proteção contra o vírus selvagem [Biacchesi *et al.*, 2004 e 2005; Buchholz *et al.*, 2005]. Outra estratégia testada foi a construção de um recombinante de HPIV contendo a proteína F do HMPV [Tang *et al.*, 2005] e uma quimera de PIV-3 bovino/humano também expressando a proteína F do HMPV [Tang *et al.*, 2003]; ambos induziram a produção de anticorpos neutralizantes contra HMPV que protegeram hamsters e macacos verdes africanos contra cepas selvagens de HMPV e HPIV-3. Uma quimera de HMPV contendo o gene P do metapneumovírus aviário induziu a produção de anticorpos neutralizantes e conferiu proteção contra a infecção por HMPV em macacos verdes africanos [Pham *et al.*, 2005]. Outra estratégia consiste na utilização de peptídeos das proteínas N ou SH do HMPV como vacinas [Herd *et al.*, 2006]. Todas estas candidatas a vacina mostraram-se promissoras, contudo ainda são necessários testes clínicos para avaliação da eficácia e segurança.

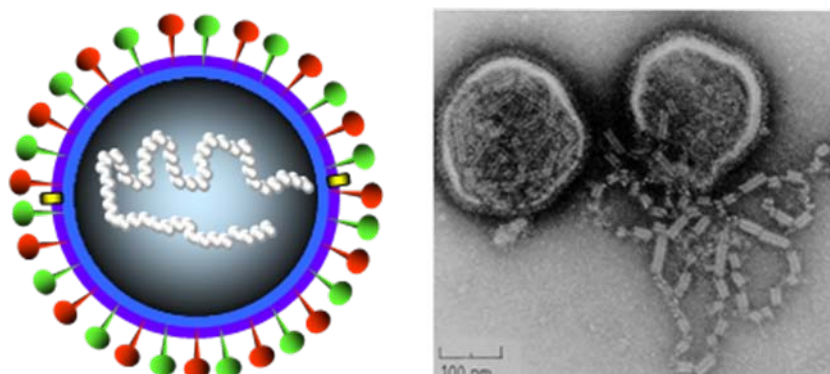
Um estudo demonstrou que a ribavirina e imunoglobulina humana possuem atividade *in vitro* contra HMPV equivalente a sua atividade contra RSV, contudo sua eficácia *in vivo* ainda precisa ser demonstrada [Wyde *et al.*, 2003].

5. Vírus Parainfluenza Humano (HPIV)

Os vírus parainfluenza que infectam humanos (HPIVs) estão classificados na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gêneros *Respirovirus* (tipos 1 e 3) e *Rubulavirus* (tipos 2, 4a e 4b), espécie *Virus Parainfluenza Humano* [Karron & Collins, 2007]. A partícula viral apresenta um diâmetro de cerca de 150 a 200 nm, possui envelope lipoprotéico com espículas virais ou glicoproteínas, projetadas para fora de sua estrutura, envolvendo um capsídeo de simetria helicoidal (Figura 4) contendo o genoma de RNA de fita simples, linear de polaridade negativa, não-segmentado de aproximadamente 15 a 19 Kb [Karron & Collins, 2007].

Os primeiros isolados de HPIV foram descritos entre 1956 e 1960. Os HPIV-1, 2 e 3 foram isolados de crianças com doença do trato respiratório inferior e o HPIV-4 foi isolado de crianças e adultos jovens com doença branda do trato respiratório superior. Pouco tempo após sua descoberta, estes vírus foram considerados os principais agentes causadores de crupe (HPIV-1, 2 e 3), pneumonia e bronquiolite (HPIV-3). Os HPIVs 1, 2 e 3 são a segunda principal causa de doença grave do trato respiratório em crianças, enquanto que a doença causada por HPIV-4 ocorre com menor frequência e é menos grave [revisado por Karron & Collins, 2007]. Até hoje, cinco subtipos antigênicos foram isolados do homem (tipos 1, 2, 3, 4a e 4b).

Figura 4. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do HPIV.



Fontes: Couceiro e Albuquerque, 2008 e

http://gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig59_1.JPG, acesso em 05/03/2009.

5.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento

Os vírus parainfluenza tipos 1, 2 e 3 ocorrem no mundo todo e entre pessoas de todas as idades. Os tipos 4a e 4b são menos prevalentes. Os HPIVs são muito freqüentes durante a infância. A infecção primária com o vírus parainfluenza gera alguma imunidade, mas reinfecções são comuns durante toda a vida. Dados sorológicos demonstram que de 90% a 100% das crianças de cinco anos ou mais têm anticorpos para HPIV-3 e cerca de 75% para HPIV-1 e HPIV-2. Os HPIV-1 e 2 causam surtos bienais que ocorrem no outono. O pico de infecção pelo HPIV-3 ocorre no final do inverno ou início da primavera, mas o vírus pode ser isolado durante o ano todo. O HPIV-4 parece ser mais freqüente durante o outono e o inverno [Williams, Piedra & Englund, 2009].

As infecções por HPIV normalmente se manifestam por doença do trato respiratório superior, como tosse e dor de garganta. Também podem causar doença no trato respiratório inferior (pneumonia e bronquite), principalmente entre idosos e pacientes imunocomprometidos. Cada um dos tipos é mais associado a determinado quadro clínico. Assim, os tipos 1 e 2 estão associados ao crupe, acometendo crianças nos primeiros cinco anos de vida. O tipo 1 é a principal causa de crupe em crianças, enquanto o tipo 2 é menos detectado. Tanto o tipo 1 quanto o tipo 2 podem causar outros tipos de infecção respiratória no trato superior e também no inferior. O tipo 3 está mais freqüentemente associado a bronquiolite e pneumonia. Enquanto os tipos 4a e 4b estão relacionados com infecções brandas do trato respiratório superior [CDC, 2006].

Vacinas contra os vírus parainfluenza ainda estão sendo desenvolvidas. Os anticorpos maternos têm um papel de proteção contra os tipos 1 e 2 nos primeiros meses de vida. Ribavirina intravenosa pode ser administrada nos casos de infecções graves por HPIV [Mufson, 2000; Karron & Collins, 2007].

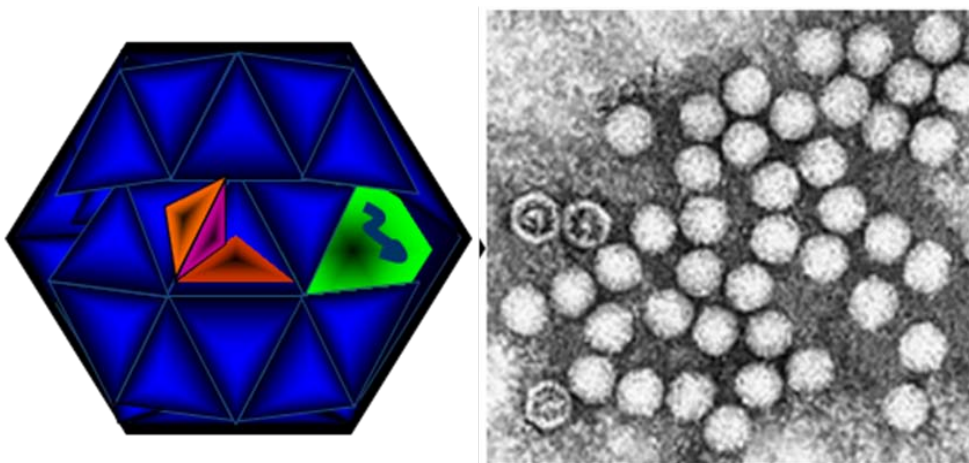
6. Rinovírus Humano (HRV)

Os HRVs estão agrupados taxonomicamente dentro de duas espécies *Rinovirus Humano A* (HRV A) e *Rinovirus Humano B* (HRV B), da família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*, ordem *Picornavirales* [ICTV, 2008; Le Gall *et al.*, 2008]. Recentemente, foi sugerida a criação de uma nova espécie de HRV

denominada, *Rinovirus Humano C* (HRV C) [Lau *et al.*, 2007a; McErlean *et al.*, 2008]. São descritos pelo menos 100 sorotipos distintos de HRV [Turner & Couche, 2007; Turner & Lee, 2009]. A partícula viral apresenta um diâmetro de 20 a 30 nm (Figura 5), capsídeo de simetria icosaédrica, e não possui envelope. O genoma é constituído de RNA de fita simples, não-segmentado, polaridade positiva, de aproximadamente 7,4 Kb [Turner & Couch, 2007; Couceiro & Albuquerque, 2008]. Análises filogenéticas indicam a existência de 75 sorotipos da espécie A e 25 da espécie B [Briese *et al* 2008; Mackay *et al.*, 2008].

Os HRVs foram isolados pela primeira vez em 1956 de pessoas com infecção no trato respiratório superior. São conhecidos como “vírus do resfriado comum” porque eles são responsáveis por cerca de 50% das infecções no trato respiratório superior [Turner & Couch, 2007]. A denominação rinovírus deriva do fato destes vírus replicarem eficientemente nas vias aéreas [Turner & Lee, 2009].

Figura 5. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do HRV.



Fontes: Couceiro & Albuquerque, 2008 e

<http://www.worsleyschool.net/science/files/virus/enterovirus.jpg>, acesso em 05/03/2009.

6.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento

Os HRVs são a causa mais comum de infecção respiratória aguda no trato respiratório superior [revisado por Mackay, 2008; Turner & Lee, 2009]. A infecção e a doença associadas aos HRV apresentam alta prevalência entre infantes e crianças jovens, mas esta prevalência decai com o aumento da idade [Turner & Lee, 2009]. A doença é mais freqüente, grave e apresenta duração maior em crianças, imunocomprometidos e idosos. A presença de infantes e crianças jovens no domicílio aumenta a chance de infecção dos adultos [Mackay, 2008].

O resfriado é o principal resultado atribuído a infecção por HRV. Mais de 80% dos quadros de resfriados comuns são associados aos picornavírus dos quais a maioria corresponde aos HRV. Os sintomas, que se desenvolvem em poucos dias, incluem espirros, rinorréia, congestão/obstrução nasal, dor ou irritação da garganta, dor de cabeça, tosse e sensação de febre ou calafrios e mal estar. Rouquidão, redução do paladar e olfato, dores no corpo, sensação de queimor nos olhos e sensação de pressão nos ouvidos ou sinus devido à obstrução e/ou inchaço da mucosa também pode ocorrer. Anorexia, diarréia e neutrofilia têm sido descritas entre voluntários adultos infectados experimentalmente [revisado por Mackay, 2008].

Estudos demonstram que o HRV é associado a mais da metade dos casos de otite média aguda em crianças. O HRV também é replicado no trato respiratório inferior e causa pneumonia em pacientes transplantados [Deffernez *et al.*, 2004; Kaiser *et al.*, 2006; Mackay, 2008].

Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado a ligação entre HRV com a exacerbação da asma e doença pulmonar obstrutiva crônica [Johnston *et al.*, 1995; Rakes *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2003; Wedzicha, 2004; Khetsuriani *et al.*, 2007; 2008; Turner, 2007]. O HRV é o principal vírus envolvido na exacerbação da asma em crianças jovens e adultos e está associado com 60% a 70% dos quadros de exacerbação de asma em crianças na idade escolar [Johnston *et al.*, 1995; Rakes *et al.*, 1999]. O HRV é particularmente importante na precipitação de episódios de asma em crianças acima de dois anos de idade, nas quais a infecção é freqüentemente associada com alérgenos IgE-específicos [Duff *et al.*, 1993].

O grande número de sorotipos epidemiologicamente importantes representa um problema significativo para o desenvolvimento de vacinas. Vacinas monovalentes e multivalentes preparadas com vírus inativados já foram testadas. Algumas destas vacinas induziram títulos de anticorpos comparáveis àqueles observados após a infecção natural, e a utilização destas vacinas resultou na redução da excreção de vírus e da gravidade da doença, embora nem a infecção nem a doença tenham sido prevenidas [Turner & Couch, 2007].

Já foram testados diversos antivirais para prevenção ou tratamento de infecções por rinovírus. Apesar de todo o esforço, ainda não existe até o momento nenhum antiviral liberado para o tratamento dessas infecções [Turner & Couch, 2007; Couceiro & Albuquerque, 2008; Turner & Lee, 2009].

7. Coronavírus Humano (HCoV)

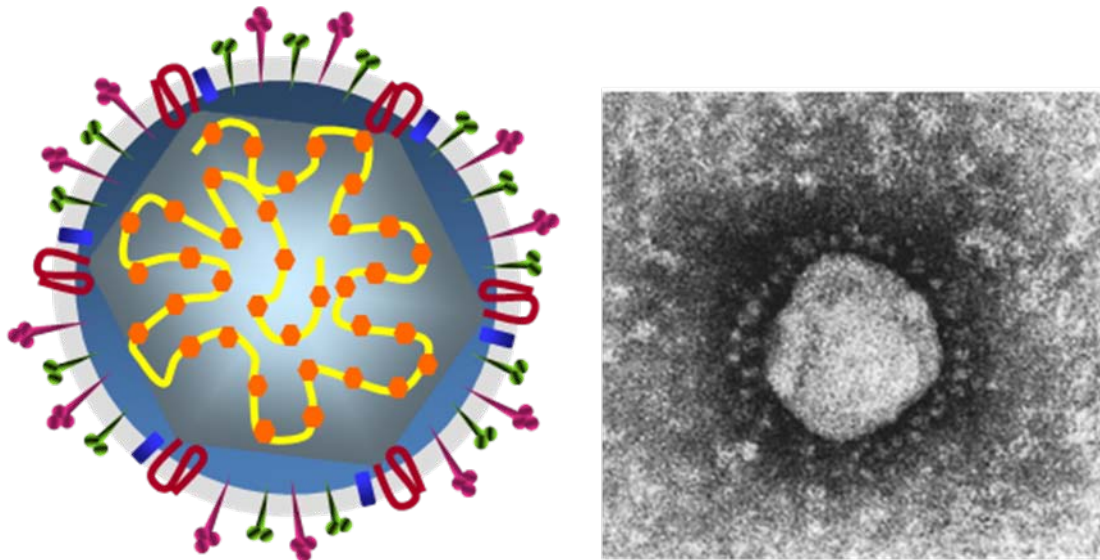
Os HCoV associados à infecções respiratórias em humanos são classificados na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*, espécie *Coronavirus Humano*. Os vírions são partículas esféricas, com diâmetro de 100 a 160 nm (Figura 6). O genoma viral é constituído de RNA de fita simples, não-segmentado, de polaridade positiva, de 27 a 32 Kb de tamanho [Lai, Perlman & Anderson, 2007, Couceiro & Albuquerque, 2008] (Figura 6). Os coronavírus são classificados em três sorogrupos distintos (1, 2 e 3) com base na sua relação antigênica e na homologia genética. O grupo 1 contém o HCoV-229E e o HCoV-NL63; o grupo 2 contém o HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 e SARS-CoV; e o grupo 3 contém isolados de aves [Lai, Perlman & Anderson, 2007; Couceiro & Albuquerque, 2008; McIntosh & Peiris, 2009].

O primeiro coronavirus humano (B814) foi descrito em 1965 por Tyrrell e Bynoe que isolaram o vírus de lavado nasal de uma criança com quadro de resfriado [Tyrrell & Bynoe, 1965], tendo sido este isolado denominado coronavirus 229E, considerado a amostra protótipo dos HCoV. Na mesma época Hamre e Procknow isolaram cinco amostras virais semelhantes ao 229E de

material clínico de estudantes de medicina que apresentavam resfriado [Hamre & Procknow, 1966]. Posteriormente uma nova amostra protótipo foi isolada a partir de lavado de nasofaringe (HCoV-OC43) [McIntosh *et al.*, 1967].

O interesse pelos coronavírus humanos ressurgiu com o surgimento da SARS em 2002. Em consequência, as pesquisas sobre esses vírus foram intensificadas, e dois outros coronavírus humanos foram descritos. Em 2004 pesquisadores holandeses, isolaram o HCoV-NL63 [van der Hoek *et al.*, 2004; Fouchier *et al.*, 2004] e em 2005 pesquisadores chineses isolaram o HCoV-HKU1 [Woo *et al.*, 2005a].

Figura 6. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do HCoV.



Fontes: Couceiro & Albuquerque, 2008 e

<http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/Corona.jpg>, acesso em 05/03/2009.

7.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento

Cinco variantes de HCoV são conhecidas por infectar o trato respiratório: HCoV-OC43, HCoV-229E, SARS-CoV, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1. As características clínicas e epidemiológicas das infecções por coronavírus em humanos seguem dois padrões distintos: um para coronavírus 229E, NL63, OC43, HKU1, e um para SARS-CoV. Entre os coronavírus humanos, o HCoV-229E e HCoV-OC43 são relativamente bem estudados. Os sintomas clínicos da infecção por esses vírus incluem febre, dor de cabeça, mal-estar, calafrios, rinorréia, inflamação de garganta e tosse. A infecção natural tanto em adultos como em crianças é geralmente associada com um resfriado comum, semelhante aos rinovírus. A infecção natural é provavelmente adquirida de forma similar a muitos outros vírus respiratórios (por exemplo, infecção da mucosa do trato respiratório superior através de secreções de pessoas infectadas, ou por contato com fômites) [Couceiro & Albuquerque, 2008].

O HCoV-229E tem se destacado como um potencial agente de infecção respiratória viral com gravidade para crianças e neonatos [Gagneur *et al.*, 2008]. O HCoV-NL63 está associado a quadros de infecção do trato respiratório superior causando febre, rinite, faringite, além de outros sintomas e, inferior podendo causar bronquite, bronquiolite e pneumonia [Pyrç, Berkhout & van der Hoek, 2007]. Logo após sua descoberta, o HCoV-NL63 foi isolado em diversas partes do mundo, entre elas: EUA [Esper *et al.*, 2005a; van der Hoek & Berkhout, 2006], Austrália [Arden *et al.*, 2005] Japão [Ebihara *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005a], Bélgica [Moës *et al.*, 2005], França [Vabret *et al.*, 2005], Suíça [Kaiser *et*

al., 2005] e Itália [Minosse *et al.*, 2008]. Esse vírus foi associado a crupe [Choi *et al.*, 2006; van der Hoek *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2007a] e a doença de Kawasaki [Esper *et al.*, 2005b]. O HCoV-HKU1 está associado a infecção do trato respiratório inferior. Os sintomas mais comuns da infecção pelo HCoV-HKU1 são rinorréia, febre, tosse, chiado e complicações como bronquiolite e pneumonia [Sloots *et al.*, 2008]. Esta variante tem sido descrita em diversos países incluindo Estados Unidos [Esper *et al.*, 2006], França [Vabret *et al.*, 2005 e 2006], China [Lau *et al.*, 2006], Itália [Canducci *et al.*, 2008], Tailândia [Dare *et al.*, 2007], Austrália [Sloots *et al.*, 2006] e Alemanha [Kupfer *et al.*, 2007].

Através de análises filogenéticas, o HCoV-NL63 é classificado em dois genótipos. Por sua vez, o seqüenciamento dos isolados de HCoV-HKU1 tem revelado a presença de dois genótipos, A e B, e a possibilidade de um terceiro, o tipo C, resultado da recombinação dos dois primeiros [revisor por Sloots *et al.*, 2008].

Nenhuma vacina está disponível para impedir infecção por HCoV, talvez porque a infecção natural não impeça nem a reinfeção nem a doença. Além disso, a variabilidade genética e antigênica em coronavírus e sua habilidade para recombinar são dois desafios para vacinação eficaz [Lai, Perlman & Anderson, 2007; Couceiro & Albuquerque, 2008].

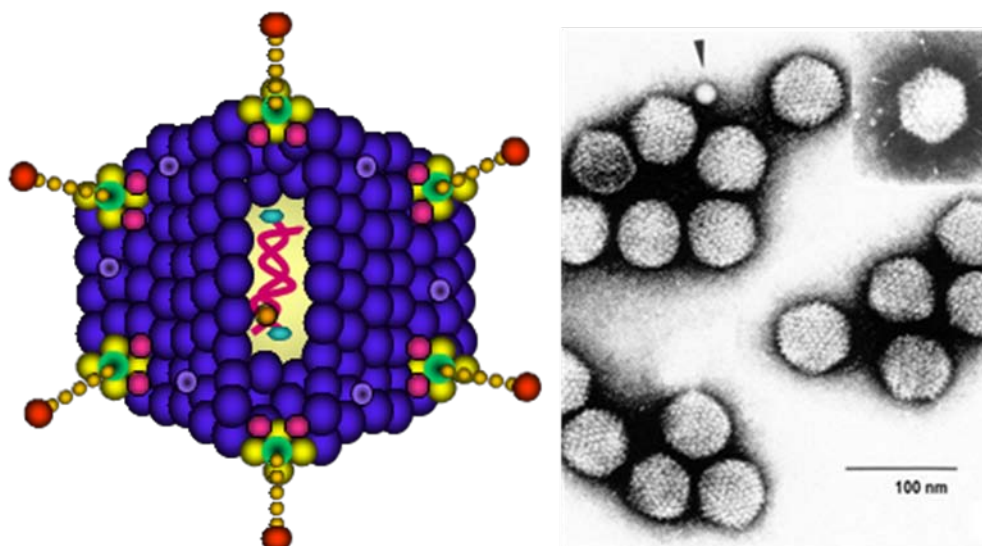
Não há nenhuma droga antiviral para tratamento das infecções por coronavírus humano [Lai, Perlman & Anderson, 2007; Couceiro & Albuquerque, 2008].

8. Adenovírus Humano (HAdV)

Os adenovírus que infectam humanos (HAdV) são classificados na família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus* que contém 51 sorotipos, divididos em seis espécies designadas de *A* a *F* de acordo com suas propriedades físico-químicas, imunológicas e bioquímicas. As partículas virais são icosaédricas e o material genético é constituído de DNA de fita dupla, linear e não segmentado (Figura 8) [Santos & Soares, 2008].

Os adenovírus foram primeiro isolados e caracterizados como agentes virais, por dois grupos que estudavam a etiologia das infecções respiratórias agudas. Em 1953, Rowe e colaboradores observaram a degeneração de células humanas derivadas de adenóides, resultante da replicação de um vírus não identificado presente naquele tecido [Rowe *et al.*, 1953]. Em 1954, Hilleman e Werner ao estudar uma epidemia de doenças respiratórias em recrutas, isolaram um patógeno das secreções respiratórias que induzia efeito citopático em culturas de células humanas [Hilleman & Werner, 1954]. Em 1956, este agente foi denominado adenovírus, devido ao tecido no qual foram descobertos [Enders *et al.*, 1956].

Figura 7. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica do AdV.



Fontes: Couceiro & Albuquerque, 2008 e

http://dsfoster.googlepages.com/em_adeno.gif/em_adeno-large.gif, acesso
05/03/2009.

8.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento

As infecções por HAdV ocorrem no mundo todo de forma endêmica, epidêmica ou de infecções esporádicas [revisado por Ruuskanen *et al.*, 2009]. Os HAdV são causa muito comum de infecção respiratória aguda. Entretanto, dependendo do sorotipo eles podem causar diversos quadros clínicos tais como gastroenterite, conjuntivite, cistite, e doença exantemática. Dentre os sorotipos de HAdV associados com infecção respiratória, os tipos 1, 2, 5 e 6 são geralmente endêmicos, enquanto que os tipos 4, 7, 14 e 21 causam epidemias. Os surtos, em geral, ocorrem em comunidades fechadas tais como, internatos, creches e instalações militares. Contudo, grandes epidemias comunitárias

também ocorrem [Wold & Horwitz, 2007; Ruuskanen *et al.*, 2009]. As infecções por HAdV são mais comuns na faixa etária de seis meses a cinco anos mas continuam acontecendo ao longo da vida. Grupos de risco para infecções graves compreendem indivíduos imunossuprimidos e neonatos [Ruuskanen *et al.*, 2009]. A transmissão se dá através de contato direto com secreções infecciosas ou aerossóis. O padrão de sazonalidade varia com o sorotipo viral, o grupo populacional, e o tipo de exposição. Os surtos de infecção respiratória são mais freqüentes no inverno e na primavera [Ruuskanen *et al.*, 2009].

Os sintomas variam de um resfriado comum a pneumonia, crupe e bronquiolite. Com maior freqüência, a infecção respiratória causada pelos HAdVs se manifesta na forma de uma doença febril do trato respiratório superior, que se caracteriza por um quadro de resfriado com congestão nasal, coriza, dor de garganta, tosse e rouquidão, apresentando febre variável e, menos freqüentemente, mal-estar, mialgia e cefaléia. O período de incubação varia de cinco a 10 dias [Couceiro & Albuquerque, 2008].

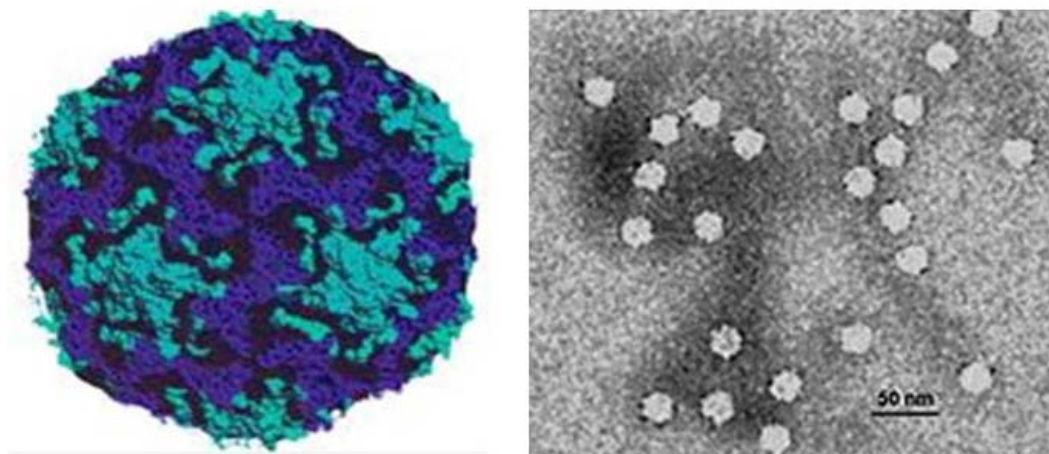
A vacina produzida com vírus atenuado preparada com os sorotipos 4 e 7 de adenovírus é eficaz na prevenção das doenças provocadas por esses sorotipos, mas seu uso é restrito a militares, nos Estados Unidos. Antivirais como cidofovir, ribavirina e ganciclovir têm sido utilizados experimentalmente no tratamento de infecções por adenovírus, contudo nenhum deles apresentou resultados que conduzissem à liberação para uso em humanos [Couceiro & Albuquerque, 2008].

9. Bocavírus Humano (HBoV)

O HBoV foi provisoriamente classificado como um membro da família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Bocavirus*, espécie *Bocavirus Humano* [Allander *et al.*, 2005]. Esta classificação ainda aguarda confirmação pelo Grupo de Estudos da Família *Parvoviridae* do Subcomitê para vírus de Vertebrados do Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus [ICTV, *International Committee on the Taxonomy of Virus*]. A partícula viral mede em torno de 18 a 26 nm e possui capsídeo de simetria icosaédrica (Figura 8). O genoma é constituído de DNA de fita simples de aproximadamente 5 Kb, que codifica para, pelo menos, duas proteínas estruturais (VP1 e VP2) e uma não estrutural (NS1). O genoma do HBoV codifica, ainda, uma proteína denominada NP, cuja função ainda é desconhecida [Allander *et al.*, 2005].

O HBoV foi descrito pela primeira vez em 2005 por Allander e colaboradores em associação com quadro de infecção respiratória [Allander *et al.*, 2005]. O nome bocavírus é derivado da combinação “bo” (de bovino) e “ca” (de canino), ambos membros do gênero bocavírus juntamente com o bocavírus humano. O bocavírus de bovinos (parvovírus de bovinos) causa diarreia primariamente. Já o bocavírus de caninos é implicado como causa de doença respiratória neonatal e embriopatia [McIntosh, 2006].

Figura 8. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica dos Parvovírus.



Fontes: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/em_parvo_2.jpg, e http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/9/9d/Canine_parvovirus_Samp_k8797o.jpg/180px-Canine_parvovirus_Samp_k8797o.jpg, acesso em 05/03/2009.

9.1. Epidemiologia, Manifestações Clínicas, Prevenção e Tratamento

Pelo fato de ter sido detectado inicialmente em espécimes respiratórios, o HBoV tem sido considerado como um agente etiológico de doença respiratória. De fato, o vírus tem sido identificado em secreções respiratórias, principalmente de crianças, com doença do trato respiratório superior e inferior, em diversos países, com índices de prevalência que variam de 1,5% a 19% [para revisão ver Allander, 2008]. Este vírus também já foi detectado no sangue de pacientes com doença respiratória [Allander *et al.*, 2007b; Fry *et al.*, 2007]. Contudo, alguns estudos têm reportado sintomas de diarreia em crianças apresentando infecção

respiratória pelo HBoV [Arnold *et al.*, 2006; Kesebir *et al.*, 2006] assim como a detecção do vírus nas fezes de crianças com infecção respiratória [Neske *et al.*, 2007]. Além disso, estudos recentes demonstraram a presença de HBoV nas fezes de crianças com diarreia aguda sugerindo que este vírus poderia ser um patógeno respiratório e entérico, semelhante a outros membros do gênero *Bocavirus* [Albuquerque *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2007b; Lee *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2007].

10. Poliomavírus Humanos (HPyV)

Até recentemente, os poliomavírus eram classificados como um gênero da família *Papovaviridae* juntamente com os papilomavírus. Em 2000, o ICTV, separou esses dois gêneros em duas famílias distintas: *Polyomaviridae* e *Papillomaviridae* [van Regenmortel *et al.*, 2000]. Os poliomavírus que infectam humanos (HPyV) são classificados no gênero *Poliomavirus* da família *Poliomaviridae* [ICTV, 2009]. Os HPyV associados a infecção do trato respiratório estão temporariamente classificados em duas novas espécies (*KI* e *WU*) do gênero *Polyomavirus* [Allander *et al.*, 2007a; Gaynor *et al.*, 2007].

As partículas virais não possuem envelope, medem cerca de 40 a 45 nm de diâmetro (Figura 9) e apresentam capsídeo com simetria icosaédrica. O genoma é constituído de DNA fita dupla circular de aproximadamente 5 Kb, complexado com histonas celulares (H2A, H2B, H3 e H4) formando um minicromossoma viral super-enovelado, o qual apresenta a mesma estrutura da cromatina celular exceto pela ausência de histona H1, que somente está

associada ao genoma viral, na célula infectada [Straus & Straus, 2002; Imperiale & Major, 2007].

A demonstração de que os poliomavírus poderiam infectar humanos ocorreu quando Silverman & Rubinstein, e Zu Rhein, independentemente, detectaram estruturas semelhantes aos poliomavírus em material cerebral de pacientes com uma doença desmielinizante fatal, a leucoencefalopatia multifocal progressiva (*Progressive Multifocal Leukoencephalopathy* - PML) [Silverman & Rubinstein, 1965; Zu Rhein, 1967]. Embora a presença de estruturas semelhantes aos poliomavírus no cérebro de pacientes com PML tenha sido repetidamente confirmada por outros investigadores, nenhum agente foi isolado de material de pacientes apresentando PML até 1971, quando Padgett e colaboradores isolaram um poliomavírus de humanos, o JC vírus (*John Cunningham virus*, JCV), por inoculação de material cerebral de um paciente (*John Cunningham*) portador de PML em cultura de células gliais fetais [Padgett *et al.*, 1971]. No mesmo ano Gardner e colaboradores isolaram um segundo poliomavírus de humanos, BK vírus (iniciais do paciente, BKV), da urina de um paciente transplantado atendido no *Mary's Hospital* em Londres, Inglaterra, com quadro de infecção uretérica [Gardner *et al.*, 1971]. Subseqüentemente, foram descritos diversos isolados de poliomavírus infectando outras espécies de mamíferos e aves [revisado por Imperiale & Major, 2007 e zur Hausen 2008].

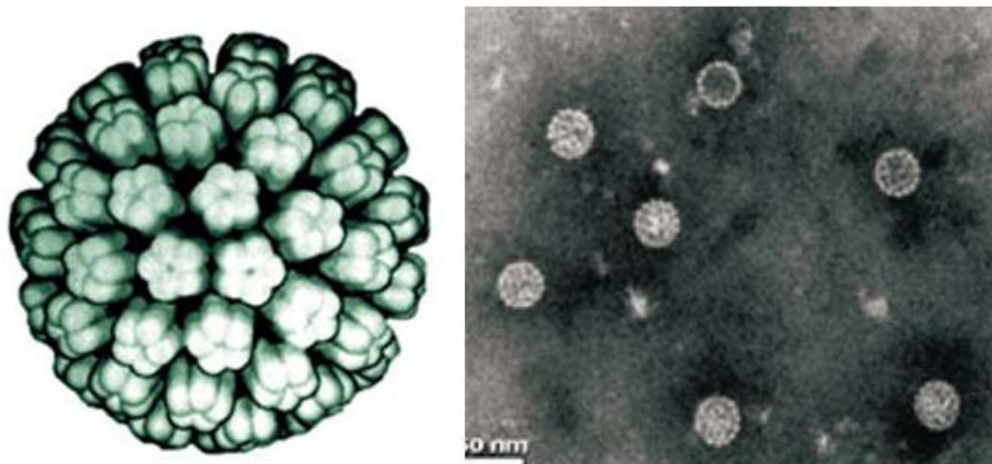
Recentemente, três novos poliomavírus foram descritos causando infecções em humanos. No primeiro relato Allander e colaboradores detectaram, em aspirados de nasofaringe, um DNA que apresentava uma baixa identidade com a

região VP1 do poliomavírus símio SV-40. O genoma foi clonado e a sua seqüência demonstrou um elevado grau de similaridade com as proteínas não estruturais dos outros poliomavírus de primatas, contudo o grau de similaridade das proteínas estruturais era muito baixo. Posteriormente este DNA foi detectado em seis (1%) de 637 aspirados de nasofaringe e em uma das 192 (0,5%) de amostras fecais. Esse vírus foi denominado KI poliomavírus (KIPyV ou KIV) em alusão ao nome do instituto onde o vírus foi descrito (*Karolinska Institutet*, Estocolmo - Suécia) [Allander *et al.*, 2007a].

Logo em seguida, Gaynor e colaboradores detectaram a presença de um DNA apresentando 35%, 50% e 34% de identidade com os poliomavírus JCV, BKV e SV-40, respectivamente, e 58% - 84% de identidade com as proteínas VP1 e VP2 do KIPyV. O vírus foi detectado em 43 (2%) de 2.135 aspirados de nasofaringe. Este novo poliomavírus foi denominado WU poliomavírus (WUPyV ou WUV) em alusão ao centro onde foi inicialmente descrito (*Washington University*, Missouri, Estados Unidos) [Gaynor *et al.*, 2007].

Em 2008, Feng e sua equipe de colaboradores do Centro de Câncer da Universidade de Pittsburgh, nos Estados Unidos, estudando células de carcinoma de Merkel (MCC), um tipo raro e agressivo de câncer de pele, descreveram um novo poliomavírus de humanos o qual foi denominado de MC poliomavírus (*Merkel cell*, MCPyV ou MCV). O MCV foi detectado em oito de 10 MCCs (80%) e cinco de 59 (8%) amostras de tecidos controles de diversas partes do corpo e quatro de 25 (16%) amostras de tecidos controles de pele [Feng *et al.*, 2008].

Figura 9. Estrutura da partícula e micrografia eletrônica dos Poliomavírus.



Fontes: http://www.faperj.br/img/repositorio/virusImp_peq.jpg e
<http://www.scielosp.org/img/revistas/resp/v79n2/42.jpg>, acesso em 05/03/2009.

10.1. Epidemiologia

Das cinco espécies de HPyV descritas até o momento, apenas duas (KIPyV e WUPyV) estão associadas a quadros de infecção respiratória. Desde que foram descritos, KIPyV e WUPyV têm sido detectados em várias partes do mundo, sugerindo sua presença global. Estudos demonstram que estes estão presentes na Austrália, Coreia, Canadá, EUA, Alemanha, Tailândia e Japão [Han *et al.*, 2007b; Abed, Wang & Boivin, 2007; Le *et al.*, 2007; Bialasiewicz *et al.*, 2008; Neske *et al.*, 2008; Payungporn *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008]

A co-infecção com outros patógenos foi observada em 74% dos casos para KIPyV e de 68% a 79% para WUPyV. Do mesmo modo, foi observada uma taxa de 10% de co-infecção de KIPyV com WUPyV e ausência de outros vírus respiratórios [revisado por Sloots *et al.*, 2008]. Portanto, o papel desses vírus como potenciais patógenos do trato respiratório ainda precisa ser investigado.

11. Diagnóstico Laboratorial das Infecções Respiratórias Virais

O diagnóstico clínico das infecções respiratórias virais é complicado devido à sobreposição dos sintomas clínicos nas infecções causadas por diferentes patógenos. Desta forma, faz-se necessária a utilização de técnicas de diagnóstico laboratorial para a elucidação da etiologia das infecções respiratórias virais. No momento, os testes mais utilizados para a detecção de vírus respiratórios são baseados na detecção de antígenos tais como imunofluorescência e ensaio imunoenzimático. Estas técnicas são rápidas e de baixo custo, mas apresentam limitações, em termos capacidade de detecção e sensibilidade. O isolamento viral é freqüentemente associado com testes de detecção de antígeno com a finalidade de aumentar a eficiência do diagnóstico. Contudo, a escolha das linhagens celulares utilizadas é crítica uma vez que, células que são permissivas para um determinado tipo de vírus, não são necessariamente permissivas para outros vírus.

O avanço da biologia molecular permitiu o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico molecular, tais como PCR e RT-PCR, e PCR em tempo real, para o diagnóstico de vírus respiratórios, aumentando assim a possibilidade de

detecção desses patógenos como, por exemplo, os protocolos descritos por Stockton *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2000; Mackay *et al.*, 2003; Myatt *et al.*, 2003; Freymuth *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Sloots *et al.*, 2006; Allander *et al.*, 2007a; Dare *et al.*, 2007; Neske *et al.*, 2009; e Raymond *et al.*, 2009.

Essas técnicas, se aplicadas ao diagnóstico, podem ser extremamente valiosas para auxiliar o tratamento, melhorando assim o prognóstico dos pacientes, particularmente aqueles de grupo de risco para doença grave, além de permitir avaliar o papel dessas infecções na população. Infelizmente, poucos laboratórios estão aptos a realizar o diagnóstico rotineiro de infecção respiratória viral, com base em testes moleculares, seja devido ao elevado custo desses ensaios [agravado pelo grande número de patógenos que poderiam estar causando a doença], seja devido à ausência de pessoal qualificado para a execução destas técnicas.

A utilização de metodologias *multiplex* [Echevarría *et al.*, 1998; Stockton *et al.*, 1998; Bellau-Pujol *et al.*, 2005; Freymuth *et al.*, 2006], onde diversos patógenos são pesquisados simultaneamente, aliado a automatização dos testes, poderia ser uma opção para a redução dos custos, viabilizando assim a aplicação rotineira do diagnóstico molecular de vírus respiratórios.

Objetivos

Objetivo Principal

Detectar a presença e avaliar a importância dos seguintes vírus como agentes de infecções respiratórias em pacientes atendidos no Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira (IPPMG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro e no Hospital das Clínicas de Teresópolis Constantino Ottaviano (HCTCO) da Fundação Educacional Serra dos Órgãos: Vírus Influenza, Vírus Parainfluenza 1-4, Vírus Sincicial Respiratório, Metapneumovírus Humano, Rinovírus Humano, Coronavírus Humano (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1), Adenovírus Humano, Bocavírus Humano e os Poliomavírus Humanos KIPyV e WUPyV.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o papel de cada um desses vírus na infecção respiratória aguda em pacientes pediátricos nos hospitais envolvidos no estudo.
2. Avaliar se os patógenos respiratórios virais recentemente descobertos estão circulando entre a população estudada.

Material e Métodos

1. População e Amostra

Foram analisados 205 *swabs* nasais de indivíduos com quadro de infecção respiratória aguda, coletados durante o período de março de 2006 a outubro de 2007. Essas amostras foram coletadas de pacientes hospitalizados e de pacientes atendidos no serviço de emergência e no ambulatório do Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira (IPPMG) da UFRJ, e no Hospital das Clínicas de Teresópolis Constantino Ottaviano (HTCO) da Fundação Educacional Serra dos Órgãos. A amostra foi de conveniência; os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão nos dias e horários em que houve coleta de dados foram convidados a participar do estudo. Todos os espécimes foram colhidos utilizando-se *swabs* esterilizados que foram exauridos em tubos contendo 2,5mL de meio de transporte de vírus (MTV) acrescido de antibióticos e fungicida. Os espécimes foram transportados imediatamente para o laboratório em isopor com gelo ou mantidos em geladeira (4°C) até o momento do transporte. No laboratório, as amostras permaneceram estocadas a -20°C até o momento do exame.

2. Critérios de Inclusão e Exclusão

2.1. Critérios de inclusão

- indivíduos com quadros de infecção respiratória aguda que tenham procurado atendimento no IPPMG ou no HCTCO cujos pais tenham consentido em participar da pesquisa.

2.2. Critérios de exclusão

- indivíduos atendidos no IPPMG ou no HCTCO que não apresentavam quadro de infecção respiratória aguda, ou que os pais não consentiram em participar da pesquisa.

3. Definição de Infecção Respiratória Aguda

Presença de rinorréia, tosse, dificuldade respiratória ou dor de garganta, associado ou não a febre, com tempo máximo de sete dias do surgimento dos sintomas.

4. Procedimento de Coleta de Amostras

Todos os espécimes foram coletados pela equipe do Laboratório de Vírus Respiratórios, Entéricas e Oculares (LAVIREO) do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, ou dos colaboradores dos centros participantes do estudo de acordo com calendário e horários estabelecidos por estes. O responsável pela colheita explicou para o paciente o procedimento de colheita, os objetivos do estudo e solicitou ao mesmo seu consentimento através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5. Criação do Banco de Dados

- a fim de facilitar a análise dos resultados foi criado um banco de dados utilizando-se o *software Microsoft Office Excell 2007* (Microsoft, Redmond, WA, EUA) a partir de informações obtidas por meio de questionário padrão (anexo 1),

durante a primeira visita médica dos pacientes, tais como *status* de hospitalização, idade, sexo e sintomas clínicos.

6. Questões Éticas

O presente protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e pela Fundação Educacional Serra dos Órgãos e está em consonância com a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde. Foi solicitado aos pacientes elegíveis autorização para participar do estudo, utilizando-se para tal um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, nos moldes da Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde. Os possíveis incômodos aos pacientes foram mínimos uma vez que além do atendimento usual somente foi realizada coleta de material para análise. Tais incômodos, se ocorreram, foram relacionados ao desconforto mínimo ocasionado pela coleta de secreções respiratórias. O benefício direto aos pacientes foi a identificação do provável agente causal do quadro infeccioso.

7. Meio de Transporte de Vírus (MTV)

Foi utilizada a solução salina de Gey ABC acrescida de gentamicina 500 μ g/mL e fungizona 100 μ g /mL.

8. Vírus Padrão

Para as análises foram utilizadas amostras padrões de todos os vírus pesquisados, gentilmente cedidas pelo Dr. Dean Erdman do *Respiratory and*

Enteric Viruses Branch do *Centers for Disease Control and Prevention* dos Estados Unidos.

9. Detecção de Vírus com Genoma de RNA

9.1. Extração do RNA Viral

A extração do RNA viral foi realizada utilizando-se o kit *RNAagents® Total RNA Isolation System* [Promega, Madison – WI, EUA], de acordo com as recomendações do fabricante. Em tubos tipo eppendorf de 1,5mL foram adicionados 300µL da amostra clínica, 300µL da solução desnaturante e 30µL de solução de acetato de sódio 2M (pH 4,0). O material foi misturado invertendo-se os tubos 3 a 5 vezes e mantido à temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida, foi adicionado 300µL da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, os tubos foram fechados, invertidos 3 a 5 vezes e então agitados por 10 segundos em vortex e mantidos 15 minutos em gelo. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 x *g*/20min; a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo onde foi, então, acrescentado um volume equivalente de isopropanol e as amostras foram incubadas a -20°C/5min para precipitação do RNA. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 x *g*/10min. O sedimento foi então lavado com 1mL de etanol 75% gelado e centrifugado a 10.000 x *g*/10min. O sedimento foi seco por evaporação, novamente suspenso em 50µL de água destilada estéril e estocado a -20°C, até o momento do uso.

9.2. Detecção de RNA viral através de RT-PCR

Para os vírus de genoma de RNA, tais como FluV, RSV, HMPV, HPIV e HRV, antes da amplificação por PCR, foi realizada, inicialmente uma etapa de

transcrição reversa para produção do DNA complementar [cDNA]. Para isso, 5 μ l do RNA viral foi adicionado a um tubo de PCR, misturado a 1 μ L de dimetil sulfóxido [DMSO] e aquecido a 97°C por 5 min. Após este período, foi adicionada à suspensão 5,1 μ l da seguinte mistura: 1 μ L de água destilada; 0,5 μ L da mistura de dideoxynucleotídeos trifosfato [contendo soluções 1.25mM de dATP, dGTP, dCTP, e dTTP cada]; 2 μ L de tampão 5x concentrado [contendo Tris-HCl 100mM, pH 9.0, KCl 500mM, e 1% de Triton X-100]; 1,2 μ L da solução de MgCl₂ 25mM; 0,2 μ L da solução de oligonucleotídeos [20 μ M] específicos para cada vírus [Quadro 3] e, 0,2 μ L da enzima transcriptase reversa (*ImProm Reverse Transcriptase*, Promega). A mistura foi então incubada a 25°C por 5 min [hibridização], seguida por incubação à 42°C por 45 min para a etapa de transcrição reversa. Após esse procedimento, as amostras foram submetidas a ciclos diferenciados de PCR, de acordo com os diferentes vírus pesquisados [Quadro 4]. No caso do da reação para FluV A foram utilizados dois conjuntos de oligonucleotídeos para detecção dos subtipos de hemaglutinina mais comuns entre humanos (H1 e H3) e um conjunto de oligonucleotídeos para FluV B. Para o HPIV foram usados conjuntos de oligonucleotídeos específicos para cada um dos quatro sorotipos. As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer modelo *Veriti 96 well* (Applied Biosystem, Foster City - CA, Estados Unidos), em tubos eppendorfs de 0,2mL, contendo 5 μ L de cDNA e 20 μ L da *Master Mix* que consiste de: 15,1 μ L de água destilada; 0,5 μ L da mistura de dideoxynucleotídeos trifosfato (dNTPs - 1.25mM de dATP, dGTP, dCTP, e dTTP cada) (Invitrogen, Carlsbad - CA, Estados Unidos); 2,5 μ L de tampão da enzima (Taq polimerase - *GoTaq Flexi*, Promega) 10x concentrado (Tris-HCl 100mM, pH

9.0, KCl 500mM e 1% de Triton X-100); 1,5 μ L da solução de MgCl₂ 25mM; 0,2 μ L da solução de oligonucleotídeos e 0,2 μ L da enzima Taq polimerase.

Finalmente, alíquotas de 10 μ L do produto do PCR foram aplicadas em gel de agarose 1,2% e foi procedida a eletroforese a 120V por 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídio e analisado por transiluminação com luz UV. No caso do FluV, RSV, HPIV e HRV, os produtos do PCR foram utilizados posteriormente numa reação de *Nested-PCR*. Nesta etapa, 5 μ L dos produtos amplificados na PCR foram acrescidos de 20 μ L da mistura de PCR descrita acima, não ocorrendo mudança no ciclo utilizado [Quadro 4]. Novamente, alíquotas de 10 μ L do produto gerado foram aplicadas em gel de agarose 1.2% e procedida a eletroforese a 120v por 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídio, analisado por transiluminação com luz UV e fotografado com máquina Polaroid. Os diferentes tamanhos de fragmentos gerados na PCR e *Nested-PCR* estão especificados no Quadro 3.

10. Detecção de Vírus com Genoma de DNA

10.1. Extração de DNA viral

A extração do DNA viral foi realizada utilizando-se o kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Alíquotas de 200 μ L da amostra clínica foram transferidas para tubos eppendorfs de 1,5mL contendo 300 μ L da solução de lise nuclear e 3 μ L da solução RNase. Os tubos foram, então, misturados por inversão e incubados por 15-30 min em banho-maria 37°C. Após a incubação, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 5 min para esfriarem. Foram, então, adicionados 200 μ L da solução

de precipitação de proteínas, os tubos foram agitados em vortex e incubados em gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 4 min e o sobrenadante transferido para outro tubo contendo 600 μ L de isopropanol. Os tubos foram misturados por inversão e deixados à temperatura ambiente, por 30 min. Decorrido esse período os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 1 min e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 600 μ L de etanol 70% e os tubos foram novamente centrifugados a 12000 x g por 1 min. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente, até que o precipitado estivesse seco. O sedimento foi suspenso em 65 μ L da solução de reidratação de DNA, incubado a 65°C por 1h e os tubos foram estocados a -20°C até o momento do uso.

10.2. Detecção de DNA viral através de PCR

Para detecção dos vírus de genoma de DNA foram aplicados ciclos diferenciados de PCR, de acordo com os diferentes vírus pesquisados [Quadro 4]. As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer modelo *Veriti 96 well* (Applied Biosystems), em tubos eppendorfs de 0,2mL, contendo 5 μ L de DNA e 20 μ L da *Master Mix* que consiste de: 15,1 μ L de água destilada; 0,5 μ L da mistura de dideoxynucleotídeos trifosfato (dNTPs - 1.25mM de dATP, dGTP, dCTP, e dTTP cada – Invitrogen); 2,5 μ L de tampão da enzima (Taq polimerase – *Go Taq Flexi*, Promega) 10x concentrado (Tris-HCl 100mM, pH 9.0, KCl 500mM e 1% de Triton X-100); 1,5 μ L da solução de MgCl₂ 25mM; 0,2 μ L da solução de oligonucleotídeos [20 μ M] e 0,2 μ L da enzima Taq polimerase.

Finalmente, alíquotas de 10 μ L do produto do PCR foram aplicadas em gel de agarose 1.2% e foi procedida a eletroforese a 120v por 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídio e analisado por transiluminação com luz UV. Para o KIPyV, os produtos do PCR foram utilizados numa *Nested-PCR*. Nesta etapa, 5 μ L foram acrescidos de 20 μ L da mistura de PCR previamente utilizada, ocorrendo mudança no ciclo utilizado [Quadro 4]. Os diferentes tamanhos de fragmentos gerados estão especificados no Quadro 3. Novamente, Alíquotas de 10 μ L do produto gerado (segundo PCR) foram aplicadas em gel de agarose 1,2% e procedida a eletroforese a 120v por 1 hora. O gel foi corado com brometo de etídio e analisado por transiluminação com luz UV.

11. Detecção de HCoV por *real-time* RT-PCR

Para a detecção dos HCoV foi utilizada a metodologia de RT-PCR em tempo real. Os oligonucleotídeos e sondas usadas estão listados no Quadro 5. Para tal, foi utilizado o protocolo descrito por Dare e colaboradores (2007). Inicialmente, foi realizada uma reação de RT-PCR que consistiu de quatro reações *monoplex* processadas sob as mesmas condições. As misturas foram preparadas utilizando-se o reagente kit *iScript One-Step RT-PCR for Probes* (Bio-Rad, Hercules - CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram preparados 25 μ L de reação contendo, tampão de reação 2X, transcriptase reversa *iScript 50X*, oligonucleotídeos, sonda, água e RNA. A amplificação foi realizada num termociclador *iCycleriQ Real Time Detection System* (Bio-Rad). A reação era constituída de um ciclo de 48°C/10min, 1 ciclo de 95°C/5min seguidos de 45 ciclos de 95°C/15s e 55°C/1min (Dare *et al.*, 2007).

12. Seqüenciamento dos produtos amplificados para confirmação dos vírus detectados

Com a finalidade de confirmação da positividade do agente detectado e desconsideração de possíveis contaminações foi realizado o seqüenciamento dos produtos gerados por PCR de algumas amostras selecionadas. Para tal, foram seguidas as seguintes etapas:

12.1. Purificação do produto obtido na PCR

Os produtos da PCR foram purificados através da utilização do *kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* [Promega], de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados 40µL de cada produto obtido na PCR, sendo adicionado igual volume de solução de ligação à membrana. Em um microtubo com capacidade para 2mL, para cada amostra a ser purificada, foi montada a minicoluna SV, transferindo-se a mistura, produto de PCR mais solução de ligação, para o mesmo e incubando-se por um minuto a temperatura ambiente [25°C]. Após a incubação, os produtos foram centrifugados a 10.000x g por um minuto. Em seguida, foram adicionados 700µL da solução de lavagem da membrana e o tubo foi, novamente, centrifugado a 10.000x g por 1min, sendo descartado o microtubo de coleta e o suporte da coluna transferido para um novo microtubo. Finalmente foram adicionados 40µL de água destilada estéril e os tubos, novamente, centrifugados a 10.000x g por cinco minutos.

12.2. Quantificação do produto da PCR purificado

Uma vez purificados, os cDNAs foram quantificados por comparação com um padrão de massa molecular [*Low DNA Mass Ladder* – Invitrogen]. Uma

mistura de 5µL do DNA e 2µL de *loading buffer* 6x foi aplicada num gel de agarose 1,2% como descrito no item 9.2.

12.3. Reação de seqüenciamento (*Cycle Sequencing*)

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o *kit ABI BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Read Reaction v3.1* [Applied Biosystems], de acordo com as recomendações do fabricante. Esta etapa do trabalho foi realizada no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ.

12.4. Análise das seqüências

As seqüências nucleotídicas obtidas foram editadas, utilizando o programa Chromas [Technelysium Pty Ltd, Austrália] e comparadas com seqüências disponíveis no banco de seqüências nucleotídicas do *National Center for Biotechnology Information* através do programa BLAST [www.ncbi.nlm.gov/BLAST], para confirmação do vírus detectado.

Quadro 3. Relação dos oligonucleotídeos utilizados para cada um dos vírus pesquisado.

<i>Oligonucleotídeos</i>	<i>Seqüência 5' → 3'</i>	<i>Tamanho do Produto</i>	<i>Região amplificada</i>	<i>Referência</i>
FluV RT-PCR¹				
AHI A	CAGATGCAGACACAATATGT	1015pb	HA	Stockton <i>et al.</i> , 1998
AHI FII	AAACCGGCAATGGCTCCAAA			
AH3 A	CAGATTGAAGTGACTAATGC	883pb	HA	Stockton <i>et al.</i> , 1998
AH3 DII	GTTTCTCTGGTACATTCCGC			
BHA A	GTGACTGGTGTGATACCACT	900pb	HA	Stockton <i>et al.</i> , 1998
BHA DII	TGTTTTCACCCATATTGGGC			
FluV Nested PCR¹				
AHI B	ATAGGCTACCATGCGAACAA	944pb	HA	Stockton <i>et al.</i> , 1998
AHI EII	CTTAGTCCTGTAACCATCCT			
AH3 B	AGCAAAGCTTTCAGCAACTG	591pb	HA	Stockton <i>et al.</i> , 1998
AH3 CII	GCTTCCATTTGGAGTGATGC			
BHA B	CATTTTGCAAATCTCAAAGC	767pb	HA	Stockton <i>et al.</i> , 1998
BHA CII	TGGAGGCAATCTGCTTCACC			
RSV RT-PCR				
RSVAB F	GTCTTACAGCCGTGATTAGG	838pb	N	Stockton <i>et al.</i> , 1998
RSVAB R	GGGCTTTCTTTGGTTACTTC			
RSV Nested PCR				
RSVA F	GATGTTACGGTGGGGAGTCT	334pb	N	Stockton <i>et al.</i> , 1998
RSVA R	GTACACTGTAGTTAATCACA			
RSVB F	AATGCTAAGATGGGGAGTTC	183pb	N	Stockton <i>et al.</i> , 1998
RSVB R	GAAATTGAGTTAATGACAGC			

HMPV RT-PCR				
MPV01.2	AACCGTGTACTAAGTGATGCACTC	213pb	N	Stockton <i>et al.</i> , 1998
MPV02.2	CATTGTTTGACCGGCCCCATAA			
HPIV RT-PCR²				
PIP1+	CCTTAAATTCAGATATGTAT	478pb	P	Echevarría <i>et al.</i> , 1998
PIP1-	GATAAATAATTATTGATACG			
PIP2+	AACAATCTGCTGCAGCATT	508pb	P	Echevarría <i>et al.</i> , 1998
PIP2-	ATGTCAGACAATGGGCAAAT			
PIP3+	CTGTAAACTCAGACTTGGTA	478pb	P	Echevarría <i>et al.</i> , 1998
PIP3-	TTTAAGCCCTTGCAACAAC			
PI4P+	CTGAACGGTTGCATTCAGGT	442pb	P	Aguilar <i>et al.</i> , 2000
PI4P-	AGGACTCATTCTTGATGCAA			
HPIV Nested PCR²				
PIS1+	CCGGTAATTTCTCATACCTATG	317pb	P	Echevarría <i>et al.</i> , 1998
PIS12	CTTTGGAGCGGAGTTGTAAAG			
PIS21	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT	203pb	P	Echevarría <i>et al.</i> , 1998
PIS22	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA			
PIS31	ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT	102pb		Echevarría <i>et al.</i> , 1998
PIS32	TAAATCTTGTTGTTGAGATTG			
PI4S1	AAAGAATTAGGTGCAACCAGTC	246pb		Aguilar <i>et al.</i> , 2000
PI4S2	GCTGCTTATGGGATCAGACAC			
HRV RT-PCR				
OL26	GCACTTCTGTTTCCCC	388pb		Myatt <i>et al.</i> , 2003
OL27	CGGACACCCAAAGTAG			
HRV Nested PCR				
OL26			Região 5'	

JWA-1b	CATTCAGGGGCCGGAGGA	292pb	não codificante	Myatt <i>et al.</i> , 2003
HAdV PCR				
hex1deg	GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC ³	301pb	Hexon	Allard, Albinsson & Wadel, 2001
hex2deg	CAGCACSCCICGRATGTCAAA			
HBoV PCR				
HBoV01.2	TATGGCCAAGGCAATCGTCCAAG	299pb	NS1	Sloots <i>et al.</i> , 2006
HBoV02.2	GCCGCGTGAACATGAGAAACAGA			
KIPyV PCR				
POLVP1-39F	AAGGCCAAGAAGTCAAGTTC	325pb	VP1	Allander <i>et al.</i> , 2007a
POLVP1-363R	ACACTCACTAACTTGATTTGG			
KIPyV Nested PCR				
POLVP1-118F	GTACCACTGTCAGAAGAAAC	207pb	VP1	Allander <i>et al.</i> , 2007a
POLVP1-324R	TTCTGCCAGGCTGTAACATAC			
WUPyV PCR				
AG0044	TGTTACAAATAGCTGCAGGTCAA	250pb	VP2	Gaynor <i>et al.</i> , 2007
AG0045	GCTGCATAATGGGGAGTACC			
	WUPyV PCR confirmatório⁴			Gaynor <i>et al.</i> , 2007
AG0048	TGTTTTCAAGTATGTTGCATCC	244pb	LTA _g	
AG0049	CACCCAAAAGACACTTAAAAGAAA			

¹No caso do da reação para FluV A foram utilizados dois conjuntos de oligonucleotídeos para detecção dos subtipos de hemaglutinina mais comuns entre humanos (H1 e H3) e um conjunto de oligonucleotídeos para FluV B. ²Para o HPIV foram usados conjuntos de oligonucleotídeos específicos para cada um dos quatro sorotipos. ³Oligonucleotídeos degenerados: R = A ou G, K = G ou T, W = A ou T. ⁴PCR para amplificação de uma região diferente do gene para confirmar a detecção do vírus e excluir falso-positivo devido a reações cruzadas com outros poliomavírus.

Quadro 4. Ciclos da PCR e *Nested-PCR* aplicado à cada vírus pesquisado.

Vírus	Ciclo	
	PCR	<i>Nested-PCR</i>
FluV	94°C/2'; 35x (94°C/1', 50°C/1', 72°C/1'); 72°C/5'; 4°C∞	94°C/2'; 35x (94°C/1', 50°C/1', 72°C/1'); 72°C/5'; 4°C∞
RSV	94°C/1'; 35x (94°C/1', 60°C/1', 72°C/1'); 72°C/5'; 4°C∞	94°C/1'; 35x (94°C/1', 60°C/1', 72°C/1'); 72°C/5'; 4°C∞
HMPV	45X (94°C/20", 55°C/20", 68°C/20") 68°C/7' 4°C∞	---
HPIV	94°C/2'; 35x (94°C/1', 50°C/1', 72°C/"); 72°C/5'; 4°C∞	94°C/2'; 35x (94°C/1', 58°C/1', 72°C/"); 72°C/5'; 4°C∞
HRV	36x (94°C/15", 55°C/30", 68°C/30"); 72°C/4'; 4°C∞	36x (94°C/15", 55°C/30", 68°C/30"); 72°C/4'; 4°C∞
HAdV	94°C/3'; 35x (94°C/30", 55°C/30", 72°C/1'); 72°C/5'; 4°C∞	---
HBoV	94°C/15'; 45x (94°C/20", 56°C/20", 72°C/30"); 72°C/5' 4°C∞	---
KIPyV	94°C/10'; 35x (94°C/1', 54°C/1', 72°C/2'); 72°C/7'; 4°C∞	94°C/10'; 35x (94°C/1', 54°C/1', 72°C/2'); 72°C/7'; 4°C∞
WUPyV	94°C/10'; 40x (94°C/30", 56°C/30", 72°C/1); 72°C/7'; 4°C∞	94°C/5'; 40x (94°C/30", 56°C/30", 72°C/1); 72°C/7'; 4°C∞

Quadro 5. Oligonucleotídeos e sondas utilizadas no *real-time* PCR para detecção de HCoV.

Variante/ Oligonucleotídeo	Concentração final nmol/L	Seqüência 5' → 3'	Região amplificada
229E			Nucleoproteína
Forward(+)	750	CAGTCAAATGGGCTGATGCA	
Reverse(-)	500	AAAGGGCTATAAAGAGAATAAGGTATTCT	
Sonda^a	50	CCCTGACGACCACGTTGTGGTTCA	
NL63			Nucleoproteína
Forward(+)	250	GACCAAAGCACTGAATAACATTTTCC	
Reverse(-)	250	ACCTAATAAGCCTCTTTCTCAACCC	
Sonda^b	50	AACACGCT“T”CCAACGAGGTTTCTTCAACTGAG	
OC43			Nucleoproteína
Forward(+)	500	CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT	
Reverse(-)	750	CCTTCCTGAGCCTTCAATATAGTAACC	
Sonda^a	50	TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT	
HKU1			Replicase 1b
Forward(+)	100	CCTTGCGAATGAATGTGCT	
Reverse(-)	750	TTGCATCACCCTGCTAGTACCAC	
Sonda^a	50	TGTGTGGCGTTGCTATTATGTTAAGCCTG	

^a marcada no terminal 5' com FAM (6-carboxy-6-carboxy-fluorescein) e no terminal 3' com *Black Hole Quencher-1* (BHQ).

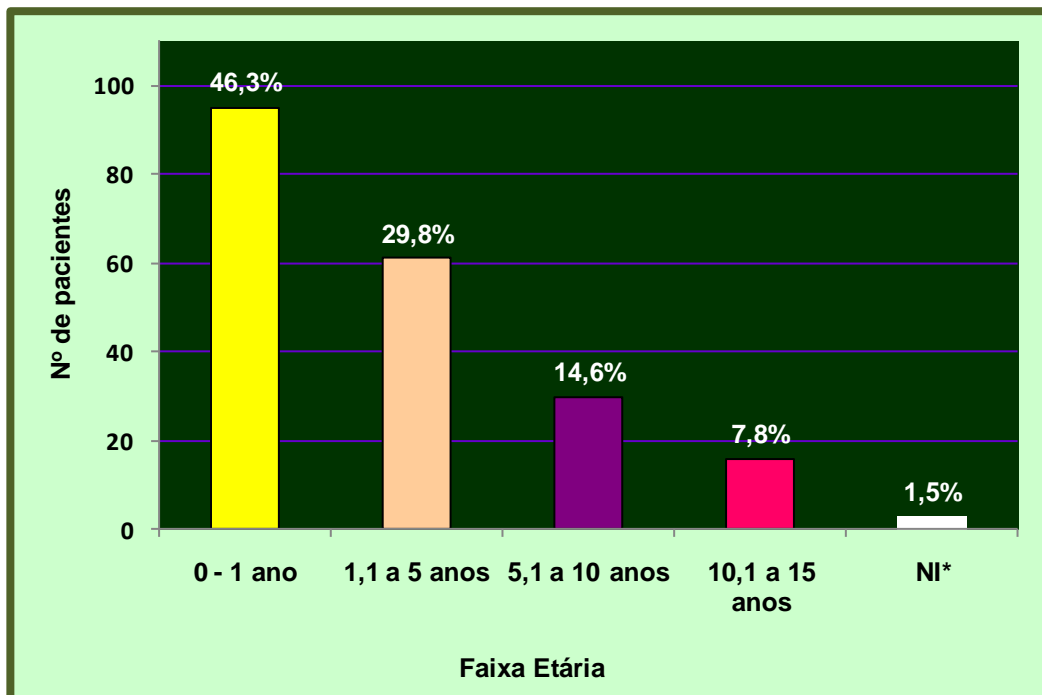
^b marcada no terminal 5' com FAM e internamente com BHQ-1 (identificado como “T”), e marcado no terminal 3' com fosfatase.

Resultados

Neste estudo 205 *swabs* nasais de crianças com infecção aguda do trato respiratório superior e inferior foram coletadas no período de março de 2006 a outubro de 2007 e testadas para a presença de patógenos virais. A doença respiratória aguda foi definida pela presença de rinorréia, tosse, dificuldade respiratória, ou dor de garganta, associado ou não com febre, com um tempo máximo de sete dias de surgimento dos sintomas. Estas amostras foram coletadas de pacientes hospitalizados, atendidos no serviço de emergência ou no ambulatório de dois hospitais universitários nas cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis. Informações relevantes tais como *status* de hospitalização, idade, sexo, e sintomas clínicos, foram coletadas durante a primeira visita médica através da aplicação de um questionário padrão (anexo 1). No total, foram coletadas 137 amostras na cidade do Rio de Janeiro e 68 amostras na cidade de Teresópolis.

Dentre os pacientes, 113 eram do sexo masculino e 92 do sexo feminino. A faixa etária dos pacientes variou de um mês a 15 anos; contudo, 76,1% (156/205) das crianças se encontravam na faixa etária ≤ 5 anos de idade (Gráfico 1). Cerca de um terço dos pacientes (73/205; 35,6%) estava hospitalizada no momento da coleta da amostra, 64,4% (132/205) não estavam hospitalizados. Dentre os pacientes não hospitalizados, 73 (35,6%; 73/205) foram atendidos em ambulatório, enquanto que 59 (28,8%; 59/205) foram atendidos no serviço de emergência (Gráfico 2).

Gráfico 1. Distribuição etária dos pacientes participantes do estudo.



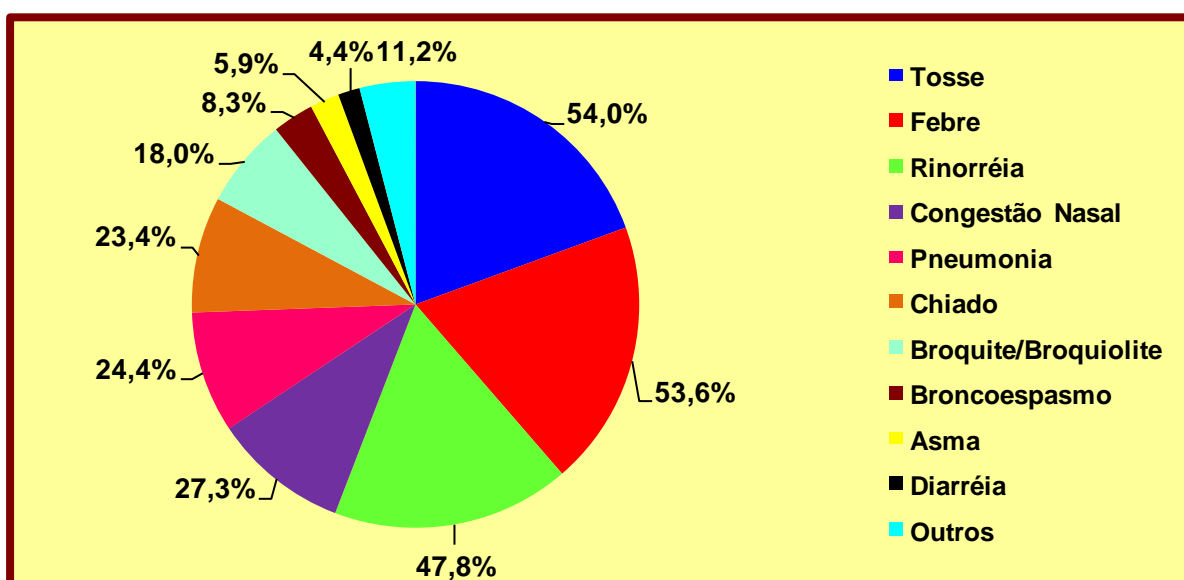
*NI = não informado.

Gráfico 2. Distribuição dos pacientes participantes do estudo, com relação ao *status* de hospitalização.



Os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes incluíam tosse (54%; 111/205), febre (53,6%; 110/205), rinorréia (47,8%; 98/205), congestão nasal (27,3%; 56/205), pneumonia (24,4%; 50/205), chiado (23,4%; 48/205), bronquite/bronquiolite (18%; 37/205), broncoespasmo (8,3%; 17/205), asma (5,9%; 12/205) e diarréia (4,4%; 9/205) (Gráfico 3). Alguns pacientes (11%; 23/205) apresentavam outros sintomas tais como dor de cabeça, dor de garganta, tonsilite, exantema, laringomalacia, vômito e otite.

Gráfico 3. Principais sintomas clínicos apresentados pelos pacientes participantes do estudo.



Outros sintomas incluem: dor de cabeça, dor de garganta, tonsilite, exantema, laringomalacia, vômito e otite.

Das 205 amostras de secreção respiratória analisadas no estudo, foram 64 positivas, portanto um índice de positividade de 31,2% (64/205) (Gráfico 4). Com relação ao local de coleta, a positividade das amostras estava distribuída da seguinte forma: das 137 amostras coletadas na cidade do Rio de Janeiro, 36 (26,3%) foram positivas para algum patógeno viral, enquanto que faz 68 amostras coletadas em Teresópolis 22 (32,4%) foram positivas para vírus (Gráfico 5).

Gráfico 4. Percentual de amostras positivas encontradas neste estudo.

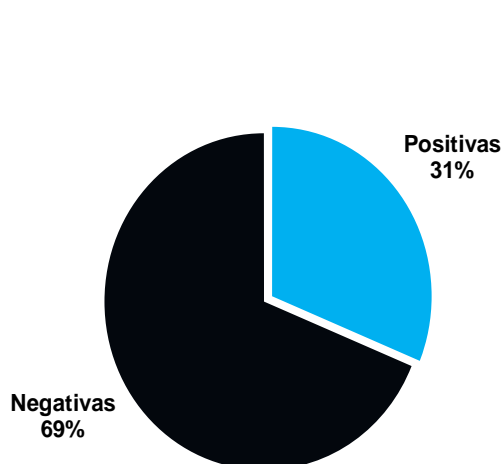
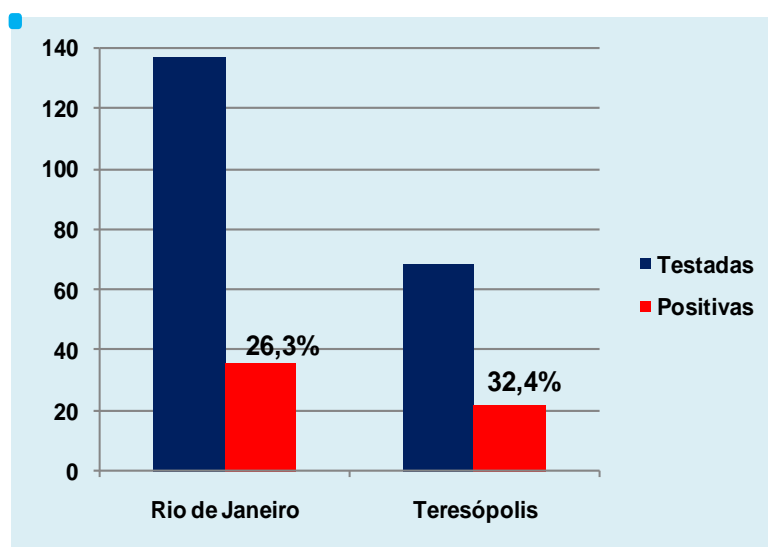


Gráfico 5. Distribuição das amostras positivas em relação ao local de coleta.



Os vírus pesquisados neste estudo compreenderam vírus com genoma composto por RNA (vírus influenza A e B [FluV A e FluV B], vírus sincicial respiratório [RSV], metapneumovírus humano [HMPV], vírus parainfluenza humano 1 – 4 [HPIV1-4], rinovírus humano [HRV] e coronavírus humano [HCoV]) e vírus composto por genoma de DNA (adenovírus humano [HAdV], bocavírus humano [HBoV] e poliomavírus humano KI e WU [KIPyV e WUPyV]). A positividade entre os vírus compostos de RNA foi mais elevada em relação aos vírus de DNA. Dentre os vírus de RNA, 33 amostras foram positivas para HRV (51,6%; 33/64), 5 amostras foram positivas para FluV A (7,8%; 5/64), 5 amostras foram positivas para HMPV (7,8%; 5/64), 4 amostras foram positivas para HCoV (6,3%; 4/64) e 3 amostras foram positivas para RSV (4,6%; 3/64). Para os vírus de DNA foram detectadas 5 amostras positivas para HBoV (7,8%, 5/64) e 1 amostra positiva para HAdV (1,6%; 1/64). Foram identificados 8 casos de co-infecção (12,5%; 8/64 - HCoV-NL63 + HMPV, HCoV-NL63 + RV, HMPV + RV +

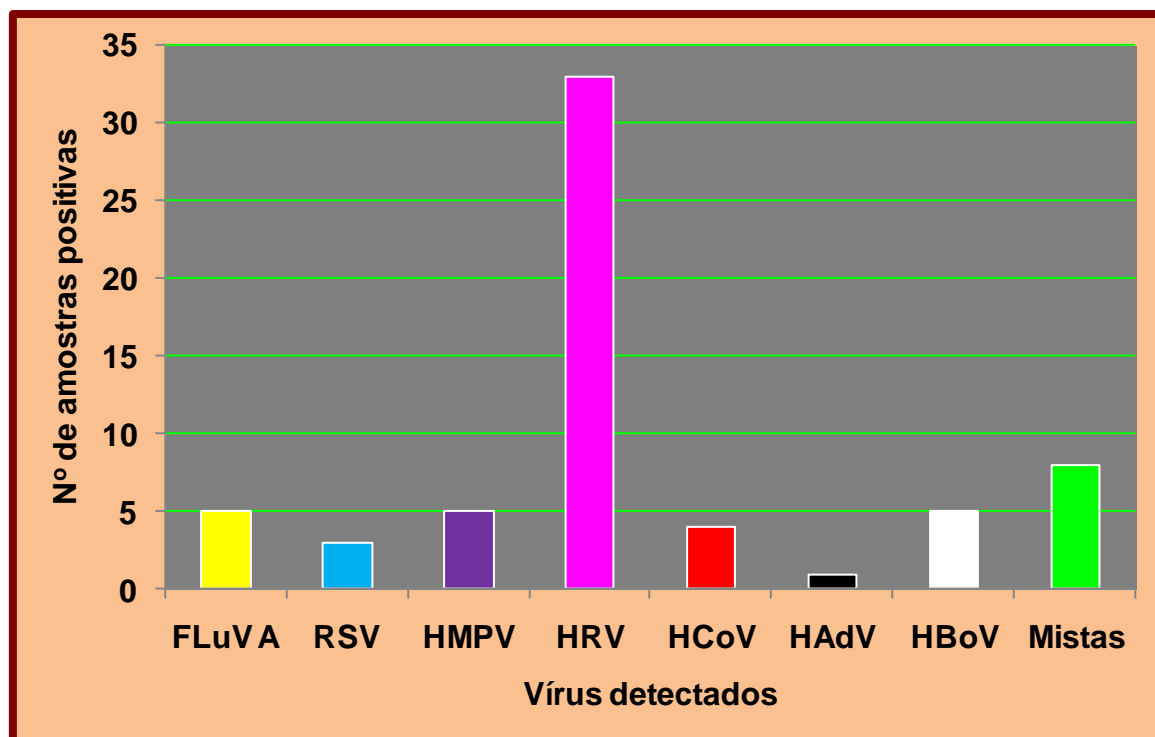
HCoV-OC43 + AdV, HMPV + KIPyV, HBoV + RV, HBoV + WUPyV, FluV A + RV, RSV + HCoV-OC43), incluindo duas amostras positivas para KIPyV e WUPyV. Não foi detectado amostra positiva para HPIV nem FluV B. Esses dados estão expostos na Tabela 1 e representados no Gráfico 6.

Tabela 1. Positividade das amostras analisadas para os diferentes vírus pesquisados.

Vírus Diagnosticados	Nº de amostras positivas (%)
Infecções simples	
Vírus de RNA	
FluV A	5 (7,8)
FluV B	0 (0)
RSV	3 (4,6)
HMPV	5 (7,8)
HPIV	0 (0)
HRV	33 (51,6)
HCoV	4 (6,3)
Sub Total	50 (78,1%)
Vírus de DNA	
HAdV	1 (1,6)
HBoV	5 (7,8)
KIPyV	0 (0)
WUPyV	0 (0)
Sub Total	6 (9,4%)
Infecções mistas¹	8 (12,5)
Total (simples+mistas)	64 (100)

¹ HCoV-NL63 + HMPV, HCoV-NL63 + RV, HMPV + RV + HCoV-OC43 + AdV, HMPV + KIPyV, HBoV + RV, HBoV + WUPyV, FluV A + RV, RSV + HCoV-OC43.

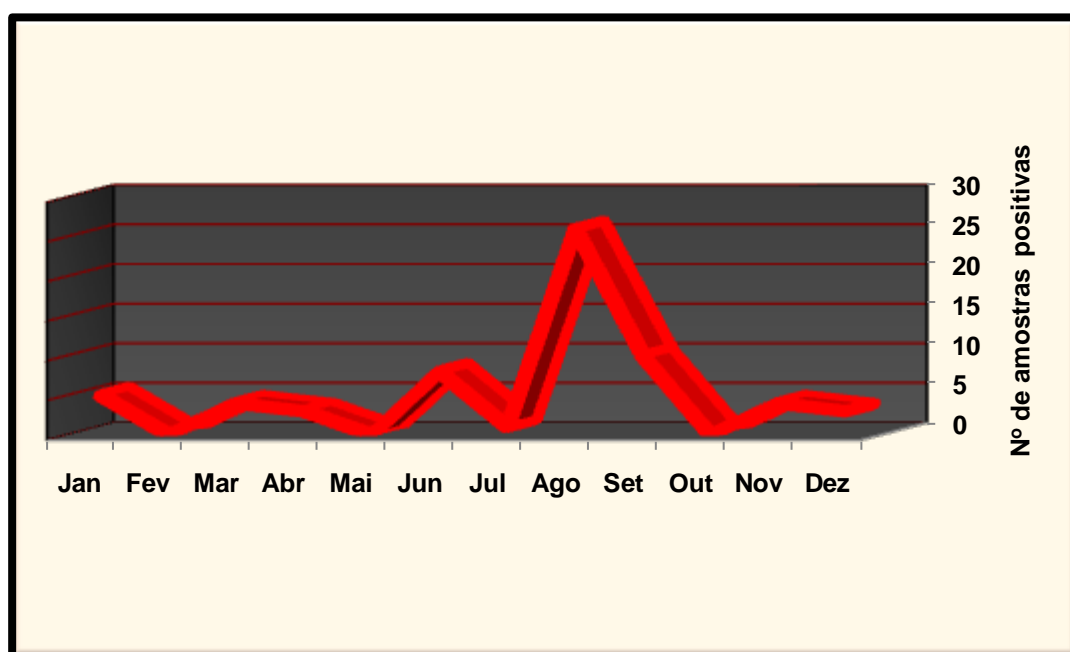
Gráfico 6. Representação gráfica dos resultados das amostras positivas quanto à detecção de vírus.



Com o objetivo de confirmar os resultados da PCR e descartar possíveis contaminações, principalmente no que se referia ao significativo número de amostras positivas para HRV, embora em todos os ensaios o controle negativo tenha se confirmado negativo, foram selecionadas randomicamente amostras positivas para HRV, HBoV, HAdV, KIPyV e WUPyV. O seqüenciamento confirmou a positividade das amostras encaminhadas para análise e descartou possíveis contaminações (dados não mostrados).

Em relação a sazonalidade das amostras positivas, foi observado um pico das infecções no período de junho a setembro, correspondendo ao inverno e início da primavera (Gráfico 7). Entretanto foram encontradas amostras positivas ao longo do ano todo, com exceção dos meses de fevereiro, maio e outubro. De fato, embora os dados apresentados no gráfico abaixo representem o total de amostras positivas para todos os vírus pesquisados, este padrão sazonal é representativo das infecções por HRV em virtude do número elevado de amostras positivas.

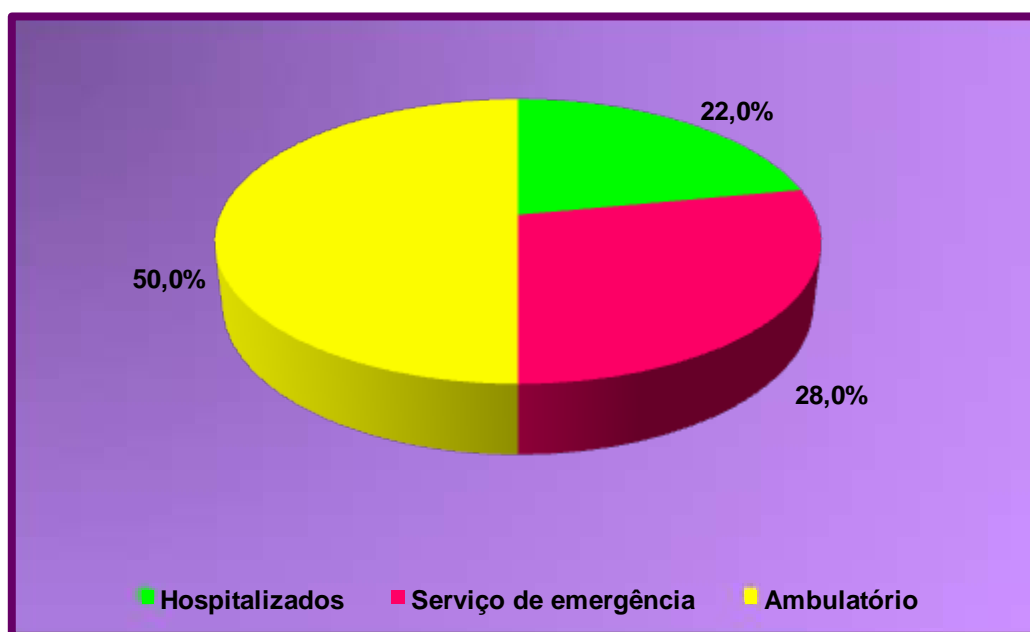
Gráfico 7. Representação gráfica da sazonalidade das amostras positivas.



Dentre os pacientes positivos para algum patógeno viral, 14 (22%; 14/64) estavam hospitalizados no momento da coleta do material; 18 (28%; 18/64) foram atendidos no serviço de emergência; e 32 (50%; 32/64) pacientes

receberam atendimento ambulatorial (Gráfico 8). Estes índices correspondem a 19,2%, 30,5% e 43,8% do total de pacientes participantes do estudo que estavam hospitalizados ou que foram atendidos na emergência e no ambulatório, respectivamente. Este dado é compatível com uma frequência elevada de infecções por HRV, visto que estes geralmente causam quadros de infecções brandas, não requerendo hospitalização. A faixa etária destes pacientes variou de um mês a 15 anos e, a média de idade foi de 3,3 anos (Gráfico 9).

Gráfico 8. Status dos pacientes positivos para patógenos virais.



Aproximadamente 40% (25/64) dos pacientes positivos para infecções virais tinham idade ≤ 1 ano; 23% (15/64) tinham idades entre 1,1 e 5 anos; 14% (9/64) tinham entre 5,1 e 10 anos de idade e somente um paciente tinha idade superior a 10,1 anos. Para três pacientes a idade não foi informada (Gráfico 9).

Na Tabela 2 e na Figura 10 estão apresentados os principais sintomas clínicos observados entre os pacientes positivos que apresentaram infecção por um único agente.

Os pacientes positivos somente para HRV apresentaram como sintomas mais freqüentes, tosse (67%), rinorréia (67%) e febre (52%) (Tabela 2, Figura 10). A faixa etária variou de um mês a 12 anos (Gráfico 7, Tabela 3). A maioria destes pacientes recebeu atendimento ambulatorial (45,4%, 15/33) (Gráfico 10, Tabela 3). Com relação aos pacientes apresentando infecção mista por HRV e outro vírus, três foram atendidos no ambulatório e um foi atendido no serviço de emergência, sugerindo que a co-infecção não levou ao agravamento dos sintomas, visto que não houve necessidade de hospitalização.

Os pacientes positivos somente para FluV A apresentaram idade mais elevada (1 a 15 anos – três pacientes tinham idades entre 9 e 15 anos) (Gráfico 9). Dois dos cinco pacientes positivos para este agente estavam hospitalizados (Gráfico 10, Tabela 3). Os sintomas mais freqüentemente observados foram: rinorréia (80%), congestão nasal (60%), tosse e febre (40% cada) (Tabela 2, Figura 10). Um paciente, o qual apresentou infecção mista por FluV A e HRV, foi atendido no ambulatório (Tabela 3).

Pacientes com infecção por HMPV apresentaram um miríade de sintomas incluindo febre, tosse, rinorréia, chiado, congestão nasal e bronquiolite (Tabela 2, Figura 10). Dos 5 pacientes com infecção simples, 4 foram tratados em

ambulatório e 1 foi atendido na emergência (Gráfico 10). Um paciente co-infectado com HMPV e HCoV-NL63 foi tratado no ambulatório. Um paciente co-infectado com HMPV e KIPyV, um co-infectado com HMPV, HCoV-OC43, HAdV e HRV foram tratados na emergência (Tabela 3).

O HBoV foi detectado em amostras de 5 pacientes como infecção simples e em amostras de 2 pacientes como infecção mista com HRV ou WUPyV. Os principais sintomas observados nos casos de infecção simples por este vírus estão listados na Tabela 2 e demonstrados na Figura 10. Três pacientes tinham pneumonia (2 com infecção simples e 1 co-infectado com HRV). Dois destes 3 foram tratados no ambulatório; 1 dos pacientes infectados somente com HBoV foi hospitalizado. O paciente apresentando co-infecção com WUPyV era um garoto de 10 meses de idade que foi atendido no serviço de emergência apresentando febre, rinorréia e laringomalacia (Tabela 3).

Com relação ao RSV foi observado que todos os pacientes positivos apenas para este agente eram neonatos, com idade variando entre 4 a 9 meses e todos foram atendidos no serviço de emergência (Gráfico 9, Tabela 3). Quanto aos sintomas predominantes notou-se que 100% dos pacientes apresentavam febre e rinorréia e 33% apresentavam tosse ou congestão nasal (Tabela 2, Figura 10). Um único paciente que apresentou co-infecção de RSV e HCoV-OC43 recebeu atendimento médico no serviço de emergência (Tabela 3).

O diagnóstico para a maioria dos pacientes infectados com HCoV-NL63 ou HCoV-HKU1 foi pneumonia. Dos 3 pacientes com infecção simples, 2 eram

hospitalizados e 1 foi tratado no serviço de emergência; 2 pacientes com infecção mista de HCoV-NL63 e HMPV ou RV foram tratados no ambulatório (Tabela 3).

A paciente positiva para HCoV-OC43 era uma criança de 3 meses de idade, e estava hospitalizada apresentando um quadro de bronquiolite. A paciente positiva para HAdV tinha 5 meses de idade, recebeu atendimento ambulatorial e apresentava febre, congestão nasal e chiado (Tabela 3).

Gráfico 9. Distribuição etária dos pacientes apresentando infecção por um único vírus.

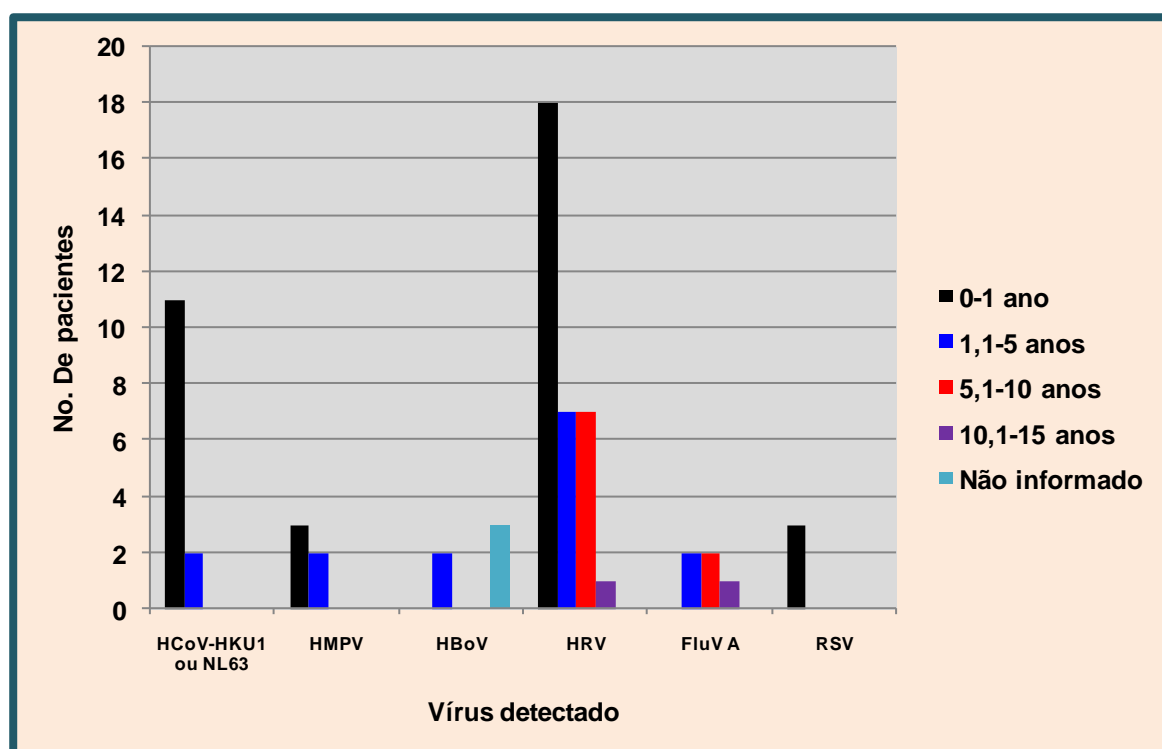


Tabela 2. Freqüência dos principais sintomas clínicos observados entre os pacientes apresentando infecção por um único vírus.

Sintomas clínicos	Vírus detectado							
	HCoV-HKU1 ou NL63	HMPV	HBoV	HRV	FluV A	RSV	HCoV- OC43	HAdV
Tosse	33% (1/3)	100% (5/5)	80% (4/5)	67% (22/33)	40% (2/5)	33% (1/3)	0% (0/1)	0% (0/1)
Febre	100% (3/3)	80% (4/5)	80% (4/5)	52% (17/33)	40% (2/5)	100% (3/3)	0% (0/1)	100% (1/1)
Rinorréia	33% (1/3)	60% (3/5)	60% (3/5)	67% (22/33)	80% (4/5)	100% (3/3)	0% (0/1)	0% (0/1)
Congestão nasal	0% (0/3)	20% (1/5)	20% (1/5)	27% (9/33)	60% (3/5)	33% (1/3)	0% (0/1)	100% (1/1)
Pneumonia	100% (3/3)	0% (0/5)	40% (2/5)	27% (9/33)	20% (1/5)	0% (0/3)	0% (0/1)	0% (0/1)
Chiado	33% (1/3)	40% (2/5)	60% (3/5)	27% (9/33)	20% (1/5)	0% (0/3)	0% (0/1)	100% (1/1)
Bronquite/Bronquiolite	33% (1/3)	20% (1/5)	0% (0/5)	12% (4/33)	0% (0/5)	0% (0/3)	100% (1/1)	0% (0/1)
Broncoespasmo	0% (0/3)	0% (0/5)	0% (0/5)	12% (4/33)	0% (0/5)	0% (0/3)	0% (0/1)	0% (0/1)
Asma	0% (0/3)	0% (0/5)	0% (0/5)	12% (4/33)	0% (0/5)	0% (0/3)	0% (0/1)	0% (0/1)

Figura 10. Representação gráfica dos principais sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com infecção simples por HCoV-HKU1 e NL63, HMPV, HBoV, HRV, FluV A e RSV.

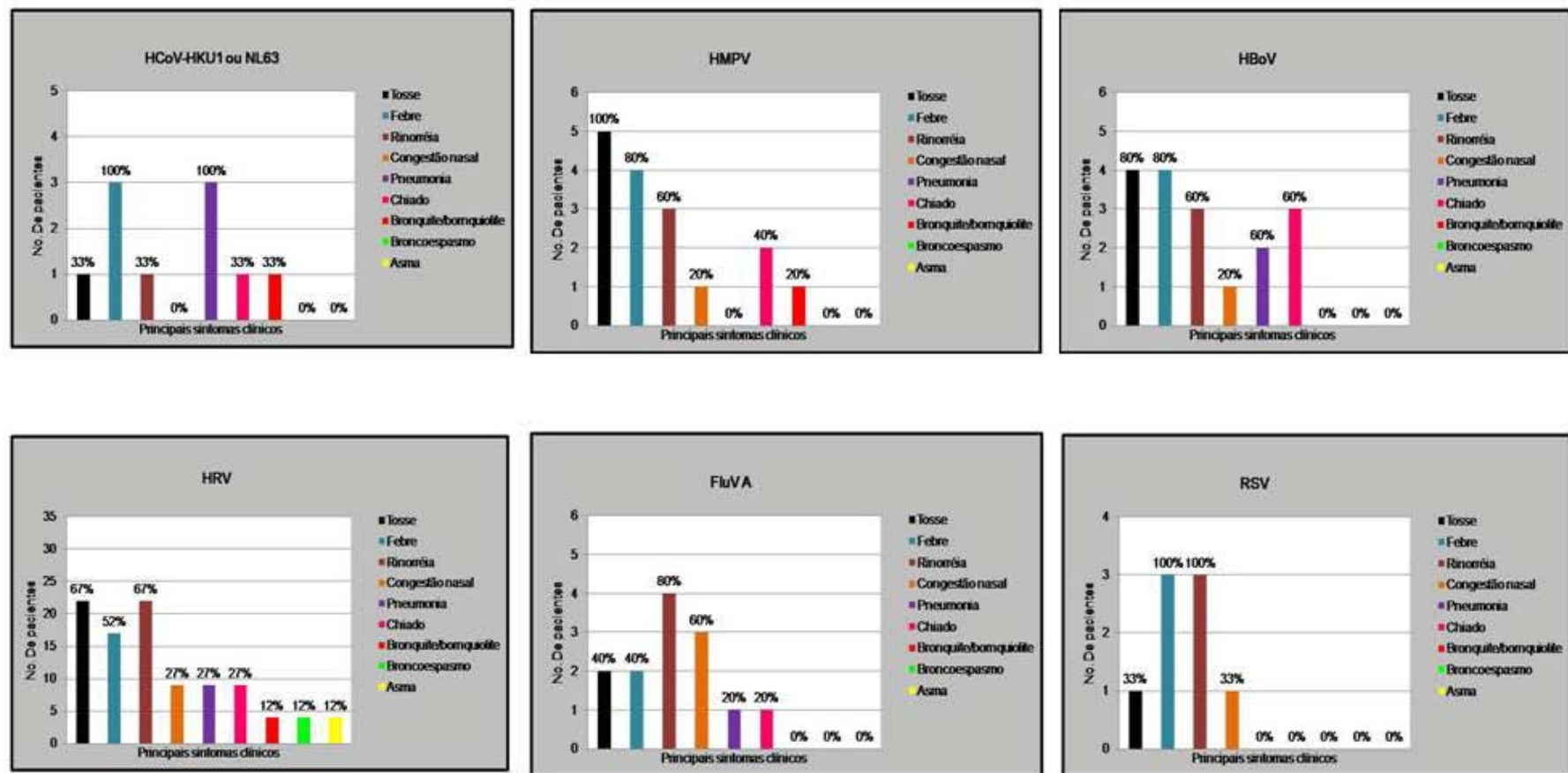


Gráfico 10. Status de hospitalização dos pacientes apresentando infecções simples com relação ao vírus detectado.

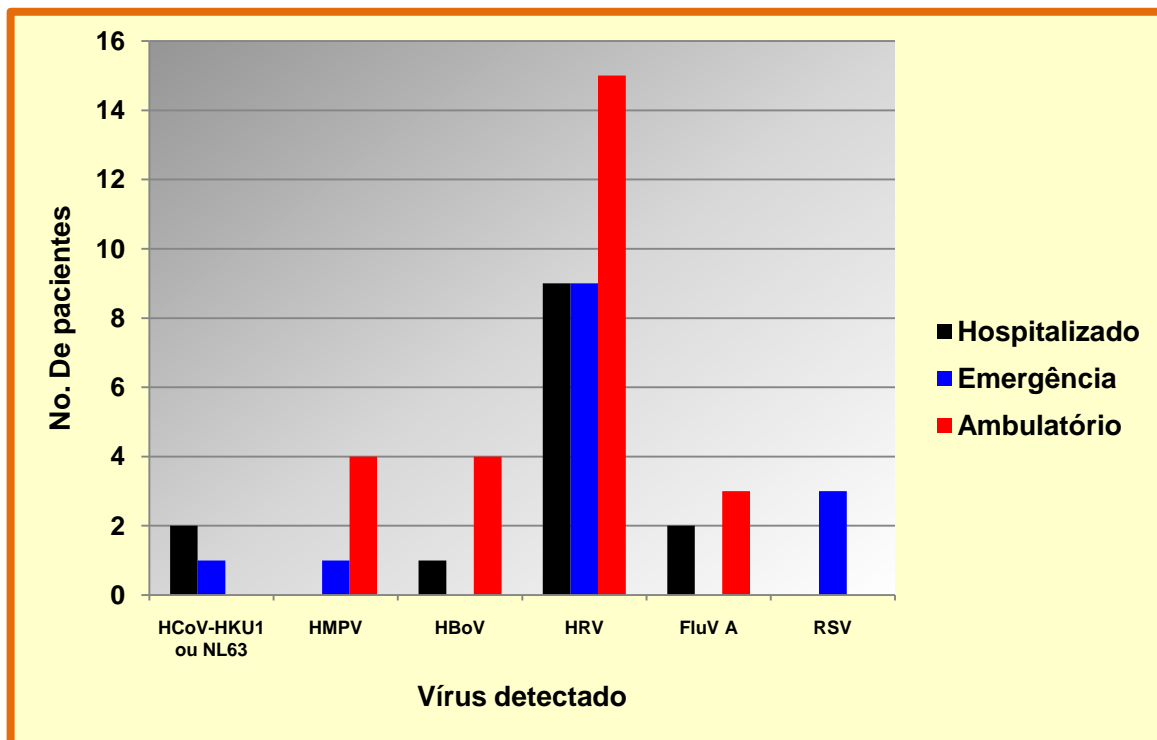


Tabela 3. Características clínicas dos pacientes apresentando infecções do trato respiratório causadas por vírus.

Vírus (nº de pacientes)	Sexo	Idade	Status	Manifestações Clínicas	
Infecções simples					
HRV (33)	F	1a	A	Tosse, rinorréia	
		10a	A	Febre, vômito, dor de cabeça	
		3a	E	Febre, tosse, rinorréia, chiado	
		5a	H	Febre, dor de garganta, tosse, congestão nasal, asma	
		7a	E	Febre, dor de garganta	
		10a	H	Rinorréia, asma	
		2m	A	Tosse, rinorréia, congestão nasal, chiado	
		5a	A	Tosse, congestão nasal, chiado asma	
		2m	E	Febre, congestão nasal	
		10m	E	Febre, congestão nasal, tosse, rinorréia	
		1a4m	A	Pneumonia, bronquiolite, febre, congestão nasal, tosse, chiado	
		1a	E	Pneumonia	
		4a	A	Febre, tosse, congestão nasal, vômito	
		1a	A	Tosse, rinorréia, chiado	
		7m	A	Bronquiolite, tosse, rinorréia, chiado	
		M	8m	A	Febre, tosse, rinorréia
			2a	A	Rinorréia, vômito, diarreia
	6m		E	Broncoespasmo	
	7m		H	Febre, tosse, congestão nasal, rinorréia	
	3m		H	Pneumonia, febre	
	9a		E	Tosse, rinorréia, asma	
	12a	H	Pneumonia, tosse, chiado, rinorréia		
	1a	A	Pneumonia, tosse, rinorréia		
7a	A	Pneumonia, tosse			
6a	H	Pneumonia, febre, rinorréia			
9m	E	Tosse, rinorréia			

		1m	H	Pneumonia, broncoespasmo, febre, rinorréia
		9m	H	Broncoespasmo, febre, rinorréia
		4m	H	Broncoespasmo, tosse, rinorréia, congestão nasal
		10m	E	Pneumonia, febre, rinorréia
		3a	A	Bronquiolite, chiado, tosse
		7m	A	Bronquiolite, chiado, tosse, rinorréia
		6a	A	Febre, tosse, rinorréia
FluV A (5)	F	15a	A	Dor de garganta, rinorréia, congestão nasal
		1a	A	Febre, tosse, rinorréia, congestão nasal, chiado
	M	9a	A	Dor de garganta, rinorréia
		10a	H	Pneumonia, febre, tosse
		2a	H	Dor de garganta, rinorréia, congestão nasal
	HMPV (5)	M	6m	E
4a			A	Febre, tosse, chiado, rinorréia
5a			A	Dor de garganta, tosse, rinorréia, vômito,
11m			A	Febre, tosse
F		7m	A	Febre, rinorréia, tosse, chiado, vômito, diarréia
HBoV (5)	M	2a5m	A	Pneumonia, febre, tosse, chiado
		1a	A	Febre, tosse, rinorréia, chiado, vômito
		?	A	Dor de garganta, tosse, rinorréia
		?	A	Febre, rinorréia
	F	1a8m	H	Pneumonia, febre, tosse, chiado
RSV (3)	M	9m	E	Febre, rinorréia
		4m	E	Febre, rinorréia
		5m	E	Febre, tosse, rinorréia, congestão nasal

HCoV-NL63 (2)	M	2a 2a5m	E H	Pneumonia, febre Pneumonia, febre, tosse
HCoV-HKU1 (1)	F	4m	H	Pneumonia, bronquiolite, febre, chiado, rinorréia
HCoV-OC43 (1)	F	3m	H	Bronquiolite
AdV (1)	F	5m	A	Febre, tosse, congestão nasal, chiado
Infecções mistas				
HCoV-NL63+HMPV	F	6a	A	Dor de garganta, tosse
HCoV-NL63+HRV	F	8a	A	Pneumonia, febre, tosse
HMPV+HRV+HCoV-OC43+HAdV	F	11a	E	Febre, rinorréia
HMPV+KIPyV	M	4a	E	Febre, tosse, rinorréia, chiado
HBoV+HRV	F	1a	A	Pneumonia, febre, tosse, chiado, rinorréia
HBoV+WUPyV	M	10m	E	Tosse, rinorréia, laringomalacia
FluV A+HRV	M	1a4m	A	Febre, rinorréia, diarreia, dor de ouvido
RSV+HCoV-OC43	M	5m	E	Bronquiolite, rinorréia

H, hospitalizados; E, emergência; A, ambulatório; ?, não informado.

Discussão

As infecções virais representam um das principais causas de doença respiratória em crianças. A maioria destas infecções são causadas por RSV, FluV A e B, HPIV, HRV e HAdV [Treanor 2009]. Diversos vírus descobertos recentemente, tais como HMPV, HBoV, e HCoV-NL63 e HCoV-HKU1, têm sido identificados como potenciais patógenos respiratórios [Kahn, 2007; Sloots *et al.*, 2008]. Além disso, dois novos poliomavírus humanos (KIPyV e WUPyV), têm sido detectados em pacientes com infecções respiratórias [Kahn, 2007; Sloots *et al.*, 2008].

No Brasil, estudos epidemiológicos têm demonstrado a importância dos vírus como agentes etiológicos de doença respiratória em crianças [Arruda *et al.*, 1991; Nascimento *et al.*, 1991; Miyao *et al.*, 1999; Cuevas *et al.*, 2003; Serafino *et al.*, 2004; Tsuchiya *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2006; Thomazelli *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2008; Fé, Monteiro & Moura, 2008; Oliveira *et al.*, 2008a]. Contudo, pelo fato de que estes estudos são focados na detecção dos patógenos virais mais comuns (p.ex.: FluV, RSV, HPIV, HRV e HAdV), o papel dos vírus emergentes (HMPV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HBoV, KIPyV e WUPyV) como agentes etiológicos de doença respiratória entre as crianças brasileiras permanece desconhecido.

Este estudo teve como meta principal avaliar a presença e a importância dos vírus como agentes de doença respiratória entre crianças nas cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis. Também buscamos investigar a ocorrência de

infecções respiratórias associadas aos vírus respiratórios emergentes nesta população. Para tal, foram analisadas 205 amostras de secreção nasal de crianças com sintomas de infecção respiratória atendidas no ambulatório, na emergência ou internadas nos hospitais envolvidos no estudo. Embora as amostras tenham sido coletadas de crianças sintomáticas e tenham sido analisadas para uma ampla variedade de vírus utilizando-se metodologias altamente sensíveis, a presença de patógeno viral foi detectada em menos de um terço destas amostras (31,2%). Em geral, os estudos epidemiológicos onde estas metodologias foram empregadas, têm descrito uma positividade mais elevada (46,6 a 91,5%) [Jennings *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2006; Freymuth *et al.*, 2006; Canducci *et al.*, 2008]. Talvez isto se deva ao fato de termos trabalhado com *swabs* nasais ao invés de, como nos referidos estudos, *swabs* ou aspirados de nasofaringe. A opção por este tipo de amostra foi baseada na facilidade de obtenção do espécime, uma vez que a coleta de *swabs* ou aspirados de nasofaringe, em geral, é feita pelo médico, ao passo que o *swab* nasal, pode ser coletado por outros profissionais. Além disso, a coleta deste espécime é mais bem tolerada pelos pacientes.

Em geral os vírus com genoma de RNA, particularmente RSV, FluV e HRV, apresentam maior incidência nos quadros de infecções respiratórias do que vírus de DNA [revisado por Girard *et al.*, 2005; Kahn, 2007; Weigl *et al.*, 2007 e Sloots *et al.*, 2008]. Neste estudo as infecções por vírus de RNA (FluV A, RSV, HMPV, HRV e HCoV) corresponderam a 78% das amostras positivas enquanto que vírus de DNA (HAdV, HBoV e HPyV) foram detectados em apenas 22% das amostras, corroborando os dados da literatura.

Dentre os vírus de RNA, o RSV é, em geral, o patógeno mais comumente detectado em crianças com doença respiratória aguda entre pacientes hospitalizados ou não hospitalizados [Miyao *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2006; Tsuchiya *et al.*, 2005; Cabello, *et al.*, 2006; Freymuth *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2006; Thomazelli *et al.*, 2007; Canducci, *et al.*, 2008]. Neste estudo o vírus detectado com maior frequência foi o HRV (51,6%; 33/64). Talvez este achado seja justificado pelo fato deste vírus ser primariamente encontrado em secreções do trato respiratório superior, com concentrações elevadas nas secreções nasais [Tuner & Lee, 2009] e, o material clínico escolhido ter sido *swab* nasal. Enquanto que o RSV é encontrado em maior concentração nas secreções do trato respiratório inferior. Contudo, alguns estudos realizados entre pacientes hospitalizados e não hospitalizados utilizando *swabs* ou aspirados de nasofaringe, também demonstraram uma maior incidência de HRV [Cheuk *et al.*, 2007; Calvo *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007]. Em um estudo prospectivo envolvendo vigilância ativa para 19 patógenos respiratórios (bacterianos e virais) realizado na Alemanha, o HRV também foi o patógeno mais freqüente [Weigl *et al.*, 2007]. No Brasil, um levantamento epidemiológico realizado durante 29 meses na cidade de Fortaleza, entre crianças carentes, revelou uma elevada incidência de doença respiratória e uma predominância de infecções por HRV (45,6%) [Arruda *et al.*, 1991]. Outros estudos realizados no país também demonstraram uma predominância de HRV. Souza e colaboradores, em um estudo longitudinal em crianças provenientes de uma creche em Salvador, demonstraram uma prevalência elevada (48,3%) de infecção por HRV [Souza *et al.*, 2003]. Num outro estudo realizado em Salvador, Nascimento-Carvalho e colaboradores

mostraram que o HRV foi o patógeno viral mais freqüente (21%); presente na mesma proporção encontrada para o *Streptococcus pneumoniae* [Nascimento-Carvalho *et al.*, 2008]. Bellei e colaboradores avaliaram a freqüência de infecções virais entre trabalhadores da área de saúde em São Paulo, e demonstraram uma predominância de HRV (37,7%) em relação aos outros vírus [Bellei *et al.*, 2007].

A sazonalidade dos HRV assim como de outros patógenos respiratórios varia geograficamente, de acordo com a temperatura. Nas áreas temperadas do hemisfério norte ocorre um pico em setembro (outono) e um segundo pico em abril/maio (primavera). Em áreas temperadas do hemisfério sul, a incidência sazonal dessa infecção é semelhante ao observado no hemisfério norte [revisado por Monto, 2002; Mackay, 2008 e Turner & Lee, 2009]. No Brasil, um estudo realizado em Salvador demonstrou o pico de incidência dos HRV durante o outono [Souza *et al.*, 2003]. Em nosso estudo, realizado nas cidades do Rio de Janeiro e de Teresópolis, nós detectamos um pico de infecção por HRV nos meses de inverno e início da primavera. Das 33 amostras positivas para este agente, 30 (90,1%) foram detectadas entre os meses de junho a setembro, tendo ocorrido um pico destas infecções no mês de agosto (15 amostras positivas; 45,5%).

Alguns autores têm sugerido uma associação entre a infecção pelo HRV e a exacerbação da asma [Duff *et al.*, 1993; Johnston *et al.*, 1995; Rakes *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2003; Wedzicha, 2004; Khetsuriani *et al.*, 2007; 2008; Turner, 2007]. Entre os 205 pacientes que participaram deste

estudo, 12 apresentavam o quadro de asma no momento da coleta da amostra. Quatro destes pacientes foram positivos para infecção viral, sendo que todos foram positivos para HRV. Contudo, como o número de indivíduos com asma e infecção viral foi pequeno, não é possível afirmar uma associação entre exacerbação da asma e infecção viral, neste estudo.

O FluV A foi detectado em 9,4% (6/64) das amostras positivas, sendo 5 infecções simples e uma co-infecção com HRV. A prevalência encontrada para FluV tem sido baixa nos estudos no Brasil. Em estudo recente realizado em 2007 na cidade de São Paulo, Thomazelli e colaboradores, detectaram FluV A em apenas 5% das amostras [Thomazelli *et al.*, 2007]. Em Curitiba, esse vírus foi responsável por 8,3% das infecções entre os pacientes estudados, que incluiu não só pacientes pediátricos, mas também pacientes transplantados; a maioria das amostras positivas era do tipo A [Vidal *et al.*, 2008]. Costa e colaboradores identificaram 9,5% de infecção por FluV A e B entre crianças menores que cinco anos em Minas Gerais [Costa., 2008].

No Brasil, a política de vacinação contra influenza teve início em 1999. A partir de então, a vacina não é oferecida gratuitamente para crianças, apenas para pessoas ≥ 60 anos de idade, para povos indígenas a partir de seis meses de idade, para trabalhadores de saúde e para a população carcerária [Ministério da Saúde, 2008]. Levantamentos realizados em diversas cidades do estado de São Paulo e em Belo Horizonte, Minas Gerais, indicou que a cobertura vacinal variou entre 63 e 66% da população alvo [Donalisio, Ruiz & Cordeiro, 2006; Francisco *et al.*, 2006; Costa, 2008], ficando relativamente próxima a meta de 80%

estabelecida pelo Ministério da Saúde [Ministério da Saúde, 2008], o que justificaria a baixa incidência de infecções por FluV observada no país atualmente. Infelizmente não conseguimos acessar dados epidemiológicos anteriores ao início da vacinação para confirmar essa possível tendência à diminuição das infecções por esses vírus na população.

Quatro amostras foram positivas para RSV, sendo três infecções simples e uma co-infecção com HCoV-OC43. Duas amostras foram identificadas como pertencentes ao grupo A e duas ao grupo B. Este resultado é discordante do que é observado na literatura nacional que aponta para uma incidência elevada deste patógeno [Miyao *et al.*, 1999; Straliozzo *et al.*, 2002; Straliozzo *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Thomazelli *et al.*, 2007]. Entretanto, estes estudos em que foi detectado uma frequência elevada de RSV, foram realizados em regiões do país de clima subtropical (São Paulo [Miyao *et al.*, 1999; Thomazelli *et al.*, 2007], Porto Alegre [Straliozzo *et al.*, 2002; Straliozzo *et al.*, 2004] e Minas Gerais [Costa *et al.*, 2006]) que se caracteriza por temperaturas médias inferiores a 18°C, com amplitude térmica entre 9°C e 13°C [<http://www.guianet.com.br/brasil/mapaclima.htm>]. No Rio de Janeiro o clima apresenta-se variado de acordo com a topologia de relevo do local. A região serrana (onde se localiza a cidade de Teresópolis) e na maior parte do planalto (onde fica localizada a cidade do Rio de Janeiro), o clima é tropical de altitude, apresentando temperaturas médias entre 18 e 22°C e amplitude térmica anual entre 7°C e 9°C [http://www.topgyn.com.br/conso01/rio_de_janeiro/index.php; <http://www.guianet.com.br/brasil/mapaclima.htm>]. Talvez esta variação térmica explique a baixa incidência de infecções por RSV observada neste estudo, visto

que, os estudos realizados em estados do nordeste brasileiro, região de clima tropical, onde as temperaturas médias excedem os 20°C, o HRV foi mais prevalente que o RSV [Arruda *et al.*, 1991; Souza *et al.*, 2003; Nascimento-Carvalho *et al.*, 2008]. Corroborando esta teoria, em um estudo realizado na Inglaterra e no País de Gales entre 1981 e 2004, observou-se que a elevação de 1°C na média anual da temperatura ao longo deste período levou ao encurtamento da “temporada” de RSV em até 3,1 semanas [Donaldson, 2006].

No Brasil, alguns estudos têm demonstrado a presença do HAdV em pacientes com infecções respiratórias virais, com frequência que varia entre 2,3% a 9,9% [Arruda *et al.*, 1991; Miyao *et al.*, 1999; Stralioetto *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2006; Moura *et al.*, 2007a e 2007b; Thomazelli *et al.*, 2007]. No presente estudo o HAdV representou 3,1% (2/64) das amostras positivas, percentagem compatível com a frequência deste patógeno no país, sendo uma co-infecção com HMPV, HRV e HCoV-OC43.

Os HPIVs apresentam um perfil sazonal bastante distinto, com um padrão epidêmico bienal, particularmente para os tipos HPIV-1, -2 e -3 [Williams, Piedra & Englund, 2009]. No presente trabalho, não foram encontradas amostras positivas para vírus parainfluenza. Parece que, conforme a região, período do ano e tamanho da amostra, esse vírus pode não apresentar uma prevalência significativa. Em um estudo realizado em Fortaleza compreendendo o período de 2001 a 2006, foram analisadas 3070 amostras de aspirado de nasofaringe das quais 976 (31,8%) foram positivas para vírus. Contudo, somente 117 (3,8%) foram positivas para HPIV [Fé, Monteiro & Moura, 2008]. Em São Paulo,

Thomazelli e colaboradores, após analisarem 336 amostras de secreções respiratórias detectaram HPIV-3 em 28 amostras (8,3%) e HPIV-1 em 2 (0,6%) amostras [Thomazelli *et al.*, 2007]. Em Uberlândia, Minas Gerais, HPIV foi detectado em 6,3% (24/379) das amostras pesquisadas [Costa *et al.*, 2006]. Em Porto Alegre, Straliozzo encontrou apenas 2,3% de positividade para HPIV em amostras coletadas em 1996 [Straliozzo *et al.*, 2004] e 1,5% em amostras coletadas entre 1990 e 1992 [Straliozzo *et al.*, 2002].

Estudos indicam que em 20% a 60% dos casos confirmados de pneumonia o patógeno não pode ser identificado. Estes estudos têm ainda demonstrado que as pneumonias virais são mais freqüentes que as pneumonias bacterianas, especialmente entre crianças <2 anos de idade [revisado por Farha & Thomson, 2005]. Contudo, em apenas 40% dos casos um agente viral pode ser identificado, mesmo utilizando-se métodos avançados de biologia molecular [revisado por Kahn, 2007 e Sloots *et al.*, 2008]. Isto sugere que vírus ainda não identificados podem estar circulando entre a população. Desde 2001, novos vírus têm sido identificados e estudos epidemiológicos têm demonstrado que alguns destes novos vírus são responsáveis, pelo menos em parte, por doenças que anteriormente não puderam ser atribuídas aos patógenos respiratórios virais comuns tais com RSV, HRV, FluV, HPIV e HAdV [revisado por Kahn, 2007 e Sloots *et al.*, 2008].

O HMPV foi descrito em 2001 [van den Hoogen *et al.*, 2001] e desde então a literatura descreve que a freqüência deste agente em infecções respiratórias varia de 2% a 20% em crianças [Boivin *et al.*, 2003; Dollner *et al.*, 2004; Galiano

et al., 2004; Bosis *et al.*, 2005; Chano *et al.*, 2005; Jofré *et al.*, 2007]. Nesse estudo, a prevalência encontrada foi de 12,5% (8/64) das amostras positivas, sendo três co-infecções, corroborando com o previamente descrito. Até o momento, as informações sobre as infecções por HMPV no Brasil são escassas. A primeira descrição de HMPV no Brasil ocorreu em 2003, num estudo realizado em Aracajú onde o vírus foi detectado em 17% (19/111) de infecções simples e 7% (8/111) de infecções mistas com RSV [Cuevas *et al.*, 2003]. Posteriormente, este patógeno foi detectado em outras partes do país. No Paraná, HMPV foi detectado em 6,4% dos 156 aspirados de nasofaringe, coletados de crianças hospitalizadas [do Carmo Debur *et al.*, 2007]. Em São Paulo, o HMPV pode ser detectado em 17,8% das 187 amostras positivas para vírus, em um estudo com pacientes pediátricos [Thomazelli *et al.*, 2007]. Este agente também foi demonstrado em 7,2% dos pacientes receptores de transplante de medula óssea em São Paulo [Oliveira *et al.*, 2008b].

O HBoV é outro vírus emergente que tem sido associado à doença do trato respiratório. Foi descrito pela primeira vez em 2005 [Allander *et al.*, 2005] e tem sido detectado com índices de prevalência que variam de 1,5% a 19% dos pacientes com infecção respiratória aguda [para revisão ver Allander, 2008]. No presente estudo, o HBoV foi detectado em 10,5% (7/64) das amostras positivas; taxa superior ao observado para RSV, e HAdV. Duas (28,6%) destas amostras apresentavam co-infecção com HRV ou WUPyV. Até onde sabemos, a presença de HBoV no Brasil foi descrita apenas duas vezes. Um estudo realizado em nosso laboratório, demonstrou a excreção de HBoV em 2% (14/705) das amostras fecais de crianças com diarreia [Albuquerque *et al.*, 2007] e um

segundo estudo publicado recentemente que descreve a detecção do HBoV em aspirados de nasofaringe de pacientes menores de 5 anos hospitalizados com infecção respiratória em Ribeirão Preto [Gagliardi *et al.*, 2009]. Neste último, o HBoV também foi detectado em 10,5% (26/248) dos pacientes, sendo que 81% (21) desses pacientes também foram positivos para outro vírus respiratório sem qualquer exacerbação dos sintomas clínicos. Dois dos pacientes positivos para HBoV também apresentavam co-infecção por outro vírus respiratório. A primeira co-infecção (HBoV + HRV) foi uma criança de 12 meses, do sexo feminino, com febre, tosse, chiado, rinorréia e pneumonia, que apresentava os sintomas há sete dias e recebeu atendimento ambulatorial. A outra co-infecção (HBoV + WUPyV) foi de um menino de 10 meses com rinorréia, tosse e laringomalasia que foi atendido na emergência. A incidência de co-infecção de HBoV com outros vírus respiratórios tem sido reportada, apesar de não se saber ainda a importância desse achado [Allander, 2008; Esposito *et al.*, 2008]. Parece que a associação de HBoV com outros vírus respiratórios agrava o quadro clínico [Esposito *et al.*, 2008], mas esse impacto não pode ser avaliado nesse trabalho, já que apenas dois pacientes apresentavam co-infecção.

Antes de 2003, apenas dois coronavírus humanos eram caracterizados: o HCoV-229E e o HCoV-OC43. Estes agentes são associados a quadros de infecções brandas do trato respiratório superior [Couceiro & Albuquerque, 2008]. Desde 2003, três novos coronavírus foram identificados, SARS-CoV, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1. O SARS-CoV entrou na população humana no final de 2002, e a epidemia se espalhou por 29 países nas Américas do Norte e do Sul, Europa e Ásia. Aproximadamente 8000 indivíduos foram infectados, e a taxa de

fatalidade ficou em torno de 10%. O último caso da doença ocorreu em abril de 2004 [revisado por Kahn, 2007 e Couceiro & Albuquerque 2008]. Diferentemente do SARS-CoV, os outros dois novos coronavírus humanos provavelmente têm circulado entre os humanos por muito tempo. O HCoV-NL63 tem sido identificado em 1% a 10% das infecções do trato respiratório de crianças [Pyrç, Berkhout & van der HoeK, 2007]. Este vírus é associado com doença do trato respiratório em crianças e adultos e pode ser uma causa comum de crupe [van der Hoek *et al.*, 2006]. O HCoV-HKU1 tem sido detectado em baixas porcentagem de indivíduos com doença respiratória variando de 0,3% a 2,4% [Woo *et al.*, 2005b; Esper *et al.*, 2006; Lau *et al.*; 2006]. Nós encontramos oito amostras positivas para HCoV, sendo uma HCoV-HKU1, quatro positivas para HCoV-NL63 e três amostras HCoV-OC43. O HCoV-NL63 tem sido relacionado a casos fatais de pneumonia, principalmente envolvendo crianças [Pyrç, Berkhout, & van der HoeK, 2007]. Dos quatro pacientes positivos desse estudo para HCoV-NL63 três apresentavam pneumonia. Todas as amostras foram colhidas na primavera. Os sintomas mais relacionados com a infecção por HKU1 são rinorréia, tosse, chiado, febre e bronquiolite ou pneumonia [Sloots *et al.*, 2008]. O paciente positivo para HCoV-HKU1 tinha 4 meses de idade e apresentava febre, bronquiolite, congestão nasal e chiado. Geralmente, o HCoV-OC43 causa resfriado comum, apesar de já ter sido associado a casos graves de infecção respiratória aguda do trato respiratório inferior. Rinorréia e bronquiolite foram os sintomas mais freqüentes nos pacientes positivos para HCoV-OC43, dois pacientes tinham menos de 6 meses de idade e não houve nenhum padrão sazonal. Não existem dados disponíveis na literatura sobre a freqüência das infecções por HCoV no Brasil,

particularmente no que se refere ao novos coronavírus humanos. De fato, este é o primeiro relato da circulação de HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 no país.

Recentemente dois novos poliomavírus, KIPyV e WUPyV, foram detectados em amostras do trato respiratório [Allander *et al.*, 2007a; Gaynor *et al.*, 2007]. Desde então, estes agentes têm sido detectados em diferentes regiões do mundo, sugerindo a presença global desses vírus [Bialasiewicz *et al.*, 2008; Norja *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2007b; Le *et al.*, 2007; Foulongne *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Neske *et al.*, 2008; Payungporn *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008; van der Zalm, *et al.*, 2008]. Um fator que chama atenção em relação a esses vírus é a alta taxa de co-infecção com outros vírus respiratórios, aproximadamente 80% para ambos poliomavírus [Bialasiewicz *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2007b; Le *et al.*, 2007]. O papel desses vírus como patógenos respiratórios ainda não está bem estabelecido e alguns trabalhos têm demonstrado a presença desses vírus na população assintomática [Abed, Wang & Boivin, 2007; Norja *et al.*, 2007]. No presente estudo, esses vírus estavam associados a outros patógenos respiratórios (WUPyV + HBoV e KIPyV + HMPV). O paciente positivo para WUPyV era do sexo masculino e apresentava coriza e tosse, enquanto o positivo para KIPyV tinha dois anos de idade, sexo masculino e apresentava febre, coriza, tosse e chiado. Este é o primeiro relato da circulação de KIPyV e WUPyV no Brasil. Estudos posteriores, envolvendo grupos controles, são necessários para melhor compreender o papel desses vírus como patógenos respiratórios, já que é possível que eles não estejam envolvidos em doença e a sua presença no trato respiratório reflita o modo de transmissão.

Esses achados reforçam a necessidade de uma maior e melhor avaliação das doenças respiratórias virais na infância, principalmente com relação aos vírus emergentes. Esses estudos assumem importância ainda maior por serem as infecções respiratórias a principal causa de hospitalização no primeiro ano de vida.

Conclusões

1. Com base nos resultados encontrados, é possível concluir que os vírus representaram um causa importante de infecções e doenças respiratórias (31,2%) entre as crianças que buscaram atendimento médico nos hospitais participantes deste estudo.
2. Neste estudo, aproximadamente 40% (25/64) dos pacientes positivos para infecções virais tinham idade ~~de~~ ano , demonstrando o impacto dessas infecções nesta faixa etária.
3. Dos pacientes participantes do estudo e que foram positivos para algum patógeno viral, 22% estavam hospitalizados; 28% foram atendidos no serviço de emergência; e 50% pacientes receberam atendimento ambulatorial. Estes dados sugerem que as infecções respiratórias virais representam uma parcela importante dos atendimentos médicos e, portanto têm papel significativo no Sistema de Saúde Pública das cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis.
4. Os vírus com genoma de RNA foram os patógenos detectados com maior frequência (78%) em relação aos vírus com genoma de DNA, em concordância com os dados da literatura nacional e internacional.
5. Os resultados demonstraram a circulação dos vírus respiratórios emergentes (HMPV, HBoV, HCoV-HKU1 e NL63, HPyV KI e WU) entre as crianças habitantes das duas cidades em que o estudo foi realizado. Entretanto, são

necessários mais estudos, abrangendo um número maior de pacientes, para demonstrar a importância destes vírus como agentes de doença respiratória nesta população.

6. Pela primeira vez foi demonstrada a circulação no Brasil dos coronavírus HCoV-NL63, HCoV-OC43 e dos poliomavírus KIPyV e WUPyV.

Referências Bibliográficas

Abed, Y.; Wang, D.; Boivin, G. (2007). WU polyomavirus in children, Canada. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**:1939–1941.

Aguilar, J. C.; Pérez-Breña, M. P.; García, M. L.; Cruz, N.; Erdman, D. D.; Echevarría, J. E. (2000). Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **38**:1191-1195.

Albuquerque, M. C. M.; da Silva, F. M.; Soares, C. C.; Volotão, E. M.; Santos, N. (2003). Adenoviruses isolated from civilian and military personnel in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **45**:233-236.

Albuquerque, M. C. M.; Rocha, L. R.; Benati, F. B.; Soares, C. C.; Maranhão, A. G.; Ramírez, M. L.; Erdman, D. & Santos, N. (2007). Human bocavirus infection in Brazilian children with gastroenteritis. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**:1756-1758.

Allander, T.; Tammi, M. T.; Eriksson, M.; Bjerkner, A.; Tiveljung-Lindell, A.; Andersson, B. (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **102**:12891-12896.

Allander, T.; Andreasson, K.; Gupta, S.; Bjerkner, A.; Bogdanovic, G.; Persson, M. A. A.; Dalianis, T.; Ramqvist, T.; Andersson, B. (2007a). Identification of a third human polyomavirus. *J. Virol.*, **81**:4130-4136

Allander, T.; Jartti, T.; Gupta, S.; Niesters, H. G. M.; Lehtinen, P.; Osterback, R.; Vuorinen, T.; Waris, M.; Bjerkner, A.; Tiveljung-Lindell, A.; van den Hoogen, B. G.; Hyypia, T.; Ruuskanen, O. (2007b). Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin. Infect. Dis.*, **44**:904-910.

Allander, T. (2008). Human bocavirus. *J. Clin. Virol.*, **41**:29-33.

Allard, A.; Albinsson, B.; Wadell, G. (2001). Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **39**:498-505.

Alto, W. A. (2004). Human metapneumovirus: A newly described respiratory tract pathogen. *J. Am. Board Fam. Pract.*, **17**:466-469.

Arden, K. E.; Nissen, M. D.; Sloots, T. P.; Mackay, I. M. (2005). New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J. Med. Virol.*; **75**:455-462.

Arnold, J. C.; K. K. Singh; Spector, S. A.; Sawyer, M. H. (2006). Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin. Infect. Dis.*, **43**:283-288.

Arnold, J. C.; Singh, K. K.; Spector, S. A.; Sawyer, M. H. (2008). Undiagnosed respiratory viruses in children. *Pediatrics*, **121**:e631-e637.

Arruda, E.; Hayden, F. G.; McAuliff, J. F.; de Souza, M. A.; Mota, S. B.; McAuliffe, M. I.; Geist, F. C.; Carvalho, E. P.; Fernandes, M. C.; Guerrant, R. L., Gwaltney Jr, J. M. (1991). Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. *J. Infect Dis.*, **164**:252-258.

Barlett, J. G.; Dowell, S. F.; Mandell, L. A.; File Jr., T. M.; Musher, D. M., Fine, M. J. (2000). Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*; **31**:347-382.

Beem, M.; Egerer, R.; Anderson, J. (1964). Respiratory syncytial virus neutralizing antibodies in persons residing in Chicago, Illinois. *Pediatrics*, **34**:761-70.

Bellau-Pujol, S.; Vabret, A.; Legrand, L.; Dina, J.; Gourain, S.; Petitjean-Lecherbonnier, J.; Pozzeto, B.; Ginerva, C.; Freymuth, F. (2005). Development of three multiplex RT-PCR assay for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J. Virol. Meth.*, **126**:53-63.

Bellei, N.; Carraro, E.; Perosa, A. H.; Benfica, D.; Granato, C. F. (2007). Influenza and rhinovirus infections among health-care workers. *Respirology*, **12**:100-103.

Berman, S. (1991). Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. *Rev. Infect. Dis.*; **13**[Suppl 6]:S454-S462.

Biacchesi, S.; Skiadopoulos, M. H.; Yang, L. ; Lamirande, E. W. ; Tran, K. C. ; Murphy, B. R. ; Collins, P. L. ; Buchholz, U. J. (2004). Recombinant human metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J. Virol.*, **78**:12877-12887.

Biacchesi, S.; Pham, Q. N.; Skiadopoulos, M. H.; Murphy, B. R.; Collins, P. L.; Buchholz, U. J. (2005). Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J. Virol.*, **79**:12608-12613.

Bialasiewicz, S.; Wwhiley, D. M.; Lambert, S.; Jacob, K.; Bletchly, C.; Wang, D. (2008). Presence of the newly discovered human polyomaviruses KI and WU in Australian patients with acute respiratory tract infection. *J. Clin. Virol.*, **41**:63–68.

Blount, R. E. Jr.; Morris, J. A. ; Savage, R. E. (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **92** :544-549.

Boivin, G.; Abed, Y.; Pelletier, G.; Ruel, L.; Moisan, D.; Côté, S.; Peret, T. C. T.; Erdman, D. D.; Anderson, L. J. (2002). Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J. Infect. Dis.*, **186**:1330-1334.

Boivin, G.; de Serres, G.; Côté, S. ; Gilca, R. ; Abed, Y. ; Rochette, L. ; Bergeron, M. G. ; Déry, P. (2003). Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**:634-640.

Bosis, S.; Esposito, S.; Niesters, H. G. M.; Crovari, P., Osterhaus, A. D. M. E.; Principi, N. (2005). Impact of human metapneumovirus in childhood: comparison with respiratory syncytial virus and influenza viruses. *J. Med. Virol.*; **75**:101-104.

Briese, T.; Renwick, N.; Venter, M.; Jarman, R. G.; Ghosh, D.; Köndgen, S.; Shrestha, S. K.; Hoegh, A. M.; Casas, I.; Adjogoua, E. V.; Akoua-Koffi, C.; Myint, K. S.; Williams, D. T.; Chidlow, G.; van den Berg, R.; Calvo, C.; Koch, O.; Palácios, G.; Kapoor, V.; Villari, J.; Dominguez, S. R.; Holmes, K. V.; Harnett, G.; Smith, D.; Mackenzie, J. S.; Ellerbrok, H.; Schweiger, B.; Schønning, K.; Chadha, M. S.; Leendertz, F. H.; Mishra, A. C.; Gibbons, R. V.; Holmes, E. C.; Lipkin, W. I. (2008). Global distribution of novel rhinovirus genotype. *Emerg. Infect. Dis.*, **14**:944-947.

Buchholz, U. J.; Biacchesi, S.; Pham, Q. N.; Tran, K. C.; Yang, L.; Luongo, C. L.; Skiadopoulos, M. H.; Murphy, B. R.; Collins, P. L. (2005). Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *J. Virol.*, **79**:6588-6597.

Cabello, C.; Manjarrez, M. E.; Olvera, R.; Villalba, J.; Valle, L.; Paramo, I. (2006). Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children

yonger than five years of age at a locality of Mexico City. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **101**:21-24.

Calvo, C.; García-García, M. L.; Blanco, C.; Pozo, F.; Flecha, I. C.; Pérez-Brenã, P. (2007). Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **26**:904-908.

Canducci, F.; Debiaggi, M.; Sampaolo, M.; Marinozzi, M. C.; Berrè, S.; Terulla, C.; Gargantini, G.; Cambieri, P.; Romero, E.; Clementi, M. (2008). Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses indentified recently in infants with acute respiratory disease. *J. Med. Virol.*, **80**:716-723.

CDC. (2003a). Update: influenza A activity – United States and worldwide, 2002-03 seasons, and composition of the 2003-04 influenza vaccine. *MMWR*, **52**:516-521.

CDC. (2003b). Outbreak of severe acute respiratory syndrome – worldwide, 2003. *MMWR*, **52**:226-228.

CDC. (2005). Update: influenza A activity – United States and worldwide, 2004-05 season. *MMWR*, **54**:631-634.

CDC. (2006). Human Parainfluenza Viruses (comom cold and crupe). <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/respiratory/hpivfeat.htm>, acesso 10/03/2009.

Chan, P. K. S. (2002). Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin. Infect. Dis.*, **34**[Suppl 2]:S58-S64.

Chano, F.; Rousseau, C.; Laferrière, C.; Couillard, M.; Charest, H. (2005). Epidemiological survey of human metapneumovirus infection in a large pediatric tertiary care center. *J. Clin. Microbiol.*, **43**:5520-5525.

Chanock, R. M. & Finberg, L. (1957). Recovery from infant with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am. J. Hyg.*, **66**:291-300.

Chanock, R.; Roizman, B.; Myers, R. (1957). Recovery from infants with respiratory illness of virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): I. isolation properties and characterization. *Am. J. Hyg.*, **66**:281-290.

Cheuk, D. K. L.; Tang, I. W. H.; Chan, K. H.; Woo, P. C. Y.; Peiris, M. J. S.; Chiu, S. S. (2007). Rhinovirus infection in hospitalized children in Hong Kong. A prospective study. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **26**:995-1000.

Choi, E. H.; Lee, H. J.; Kim, S. J.; Eun, B. W.; Kim, N. H.; Lee, J. A.; Lee, J. H.; Song, E. K.; Kim, S. H.; Park, J. Y.; Sung, J. Y. (2006). The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin. Infect. Dis.*, **43**:585-592.

Collins, P. L.; Crowe Jr, J. E. (2007). Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, p. 1601-1646. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). Fields Virology, 5th ed, vol 2,. Philadelphia, Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Costa, L. F.; Yokosawa, J.; Mantese, O. C.; Oliveira, T. F. M.; Silveira, H. L.; Nepomuceno, L. L.; Moreira, L. S.; Dyonisio, G.; Rossi, L. M. G.; Oliveira, R. C.; Ribeiro, L. Z. G.; Queiroz, D. A. O. (2006). Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **101**:301-306.

Costa, M. F. L. (2008). Fatores associados à vacinação contra gripe em idoso na região metropolitana de Belo Horizonte. *Rev. Saúde Pública* **42**:100-107.

Couceiro, J. N. S. S.; Albuquerque, M. C. M. (2008). Viroses Respiratórias, p.245-289. *In*: Santos, N. S. O.; Romanos, M. T. V.; Wigg, M. D. (Eds). *Introdução à Virologia Humana*, 2^a. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Crowe Jr., J. (2004). Human metapneumovirus as a major cause of human respiratory tract disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **23**:S215-S221.

Cuevas, L. E.; Ben Nassar, M. K.; Dove, W.; Gurgel, R.Q.; Greensill, J.; Hart, C.A. (2003). Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**:1626-1628.

Dare, R. K.; Fry, A. M.; Chittaganpitch, M.; Sawanpanyalert, P.; Olsen, S. J.; Erdman, D. D. (2007). Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *J. Infect. Dis.*, **196**:1321-1328.

da Silva, L. H. A.; Spilki, F. R.; Riccetto, A. G. L.; de Almeida, R. S.; Bacarat, E. C. E.; Arns, C. W. (2008). Variant isoaltes of human metapneumovirus subgroup B genotype 1 in Capinas, Brazil. *J. Clin. Virol.*, **42**:78-81.

Deffernez, C.; Wunderli, W.; Thomas, Y.; Yerly, S.; Perrin, L.; Kaiser, L. (2004). Amplicon sequencing and improved detection of human rhinovirus in respiratory samples. *J. Clin. Microbiol.*, **42**:3212-3218.

Defrasnes, C.; Hamelin, M.-E.; Boivin, G. (2007). Human metapneumovirus. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, **28**:213-221.

de Jong, J. C.; Rimmelzwaan, G. F.; Fouchier, R. A. M.; Osterhaus, A. D. M. E. (2000). Influenza virus: a master of metamorphosis. *J. Infect.*, **40**:218-228.

do Carmo Debur, M. C.; Bordignon, J.; Duarte dos Santos, C. N.; Vidal, L. R.; Nogueira, M. B.; de Almeida, S. M.; Raboni, S. M. (2007). Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J. Clin. Virol.*, **39**:59-62.

Dollner, H.; Risnes, K.; Radtke, A.; Nordbo, S. A. (2004). Outbreak of human metapneumovirus infection in Norwegian children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **23**:436-440.

Donaldson, G. C. (2006). Climate change and the end of the respiratory syncytial virus season. *Clin. Infect. Dis.*, **42**:677-679.

Donalisio, M. R.; Ruiz, T.; Cordeiro, R. (2006). Factors associated with influenza vaccination among elderly persons in southeast Brazil. *Rev. Saúde Pública*, **40**:115-119.

Duff, A. L.; Pomeranz, E. S.; Gelber, L. E.; Price, G. W.; Farris, H.; Hayden, F. G.; Platts-Mills, T. A.; Heymann, P. W. (1993). Risk factors for acute wheezing in infants and children: viruses, passive smoke, and IgE antibodies to inhalant allergens. *Pediatrics*, **92**:535-540.

Ebihara, T.; Endo, R.; Ma, X.; Ishiguro, N.; Kikuta, H. (2005). Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *J. Med. Virol.*, **75**:463-465.

Echavarría, J. E.; Erdman, D. D.; Swierkosz, E. M.; Holloway, B. P.; Anderson, L. J. (1998). Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **36**:1388-1391.

Elliot, A.; Fleming, D. M. (2008). Influenza and respiratory syncytial virus in the elderly. *Expert Rev. Vaccines*, **7**:249-258.

Enders, J. F.; Bell, J. A.; Dingler, J. H.; Francis, Jr. T.; Hilleman, M. R.; Huebner, R. J. & Payne, A. M.–M. (1956). "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, **124**:119-120.

Esper, F.; Martinello, F. A.; Boucher, D.; Weibel, C.; Ferguson, D.; Landry, M. A.; Kahn, J.S. (2004). A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J. Infect. Dis.*, **189**:1388-1396.

Esper, F.; Weibel, C.; Ferguson, D.; Landry, M. L.; Kahn, J. S. (2005a). Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J Infect Dis.*, **191**:492-498.

Esper, F.; Shapiro, E. D.; Weibel, C.; Ferguson, D.; Landry, M. L.; Kahn, J. S. (2005b). Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J. Infect. Dis.*, **191**:499-502.

Esper, F.; Weibel, C.; Ferguson, D.; Landry, M. L.; Kahn, J. S. (2006). Coronavirus HKU1 infection in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**:775-779.

Esposito, S.; Bosis, S.; Niesters, H. G. M.; Tremolati, E.; Sabatini, C.; Porta, A.; Fossali, E.; Osterhaus, A. D. M. E.; Principi, N. (2008). Impact of human bocavirus on children and their families. *J. Clin. Micro.*, **46**:1337-1342.

Farha, T.; Thomson, A. H. (2005). The burden of pneumonia in children in the developed world. *Pediatr. Resp. Ver.*, **6**:76-82.

Fé, M. M. M.; Monteiro, A. J.; Moura, F. E. A. (2008). Parainfluenza vírus infections in a tropical city: clinical and epidemiological aspects. *Braz. J. Infect. Dis.*, **12**:192-197.

Feng, H.; Shuda, M.; Chang, Y.; Moore, P. S. (2008). Clonal integration of a poliomavírus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, **319**:1096-1100.

Fouchier, R. A. M.; Hartwig, N. G.; Bestebroer, T. M.; Niemeyer, B.; de Jong, J. C.; Simon, J. H.; Osterhaus, A. D. M. E. (2004). A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**:6112-6216.

Foulongne, V.; Brieu, N.; Jeziorski, E.; Chatain, A.; Rodière, M.; Segondy, M. (2008). Ki and WU polyomaviruses in children France. *Emerg. Infect. Dis.*, **14**:523-525.

Francisco, P. M.; Donalisio, M. R.; Barros, M. B.; César, C. L.; Carandina, L.; Goldbaum, M. (2006). Factors associated with vaccination against influenza in the elderly. *Ver. Panam. Salud Publica*, **19**:259-264.

Freytmuth, F.; Vabret, A.; Legrand, L.; Eterradossi, N.; Lafay-Delaire, F.; Brouard, J.; Guillois, B. (2003). Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **22**:92-94.

Freytmuth, F.; Vabret, A.; Cuvillon-Nimal, D.; Simon, S.; Dina, J.; Legrand, L.; Gouarin, S.; Petitjean, J.; Eckart, P.; Brouard, J. (2006). Comparison of multiplex and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J. Med. Virol.*, **78**:1498-1504.

Fry, A. M.; Lu, X.; Chittaganpitch, M.; Peret, T.; Fischer, J.; Dowell, S. F.; Anderson, L. J.; Erdman, D.; Olsen, S. J. (2007). Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis.*, **195**:1038-1045.

Gagliardi, T. B.; Iwamoto, M. A.; Paula, F. E.; Proença-Modena, J. L.; Saranzo, A. M.; Criado, M. F.; Acrani, G. O.; Camara, A. A.; Cintra, O. A. L.; Arruda, E. (2009). Human bocavirus respiratory infections in children. *Epidemiol. Infect.*, **12**:1-5.

Gagneur, A.; Vallet, S.; Talbot, P. J.; Legrand-Quillien, M.-C. ; Picard, B.; Payan, C. ; Sizun, J. (2008). Outbreaks of human coronavirus in a paediatric and neonatal intensive care unit. *Eur. J. Pediatr.*, **167**:1427-1434.

Galiano, M.; Videla, C.; Puch, S. S.; Matínez, A.; Echavarría, M.; Carballal, G. (2004). Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J. Med. Virol.*, **72**:299-303.

Gardner, S. D.; Field, A. M.; Coleman, D. V.; Hulme, B. (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*, **1**:1253-1257.

Gaynor, A. M.; Nissen, M. D.; Wwhiley, D. M.; Mackay, I. M.; Lambert, S. B.; Wu, G.; Brennan, D. C.; Storch, G. A.; Sloots, T. P.; Wang, D. (2007). Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.*, **3**:e64.

Girard, M. P.; Cherian, T.; Pervikov, Y.; Kieny, M. P. (2005). A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. *Vaccine*, **23**:5708-5724.

Hamelin, M-E.; Abed, Y.; Boivin, G. (2004). Human Metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin. Infect. Dis.*, **38**:983-990.

Hamre, D.; Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**:190-193.

Han, T. H.; Chung, J. Y.; Kim, S. W.; Hwang, E. S. (2007a). Human Coronavirus-NL63 infections in Korean children, 2004-2006. *J. Clin. Virol.*, **38**:27-31.

Han, T. H.; Chung, J. Y.; Koo, J. W.; Kim, S. W.; Hwang, E. S. (2007b). WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**:1766–1768.

Herd, K. A.; Mahalingam, S.; Mackay, I. M.; Nissen, M.; Sloots, T. P.; Tindle, R. W. (2006). Cytotoxic T-lymphocyte epitope vaccination protects against human metapneumovirus infection and disease in mice. *J. Virol.*, **80**:203402044.

Hilleman, M.R. & Werner, J. H. (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **85**:183-188.

<http://www.allamericanpatriots.com/files/images/influenza-virus.jpg>. Micrografia eletrônica do FluV A. Acesso 05/03/2009.

<http://template.bio.warwick.ac.uk/staff/easton/IMAGES/Diagrams/3dvirus.jpg>. Esquema da partícula do RSV. Acesso em 05/03/2009.

<http://pathmicro.med.sc.edu/virol/rsv06.jpg>, acesso em 05/03/2009. Micrografia eletrônica do RSV. Acesso em -5/03/2009.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/vsd13_c.jpg. Micrografia eletrônica do HMPV. Acesso em 05/03/2009.

http://gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig59_1.JPG. Micrografia eletrônica do HPIV. Acesso em 05/03/2009.

<http://www.worsleyschool.net/science/files/virus/enterovirus.jpg>. Micrografia eletrônica do HRV. Acesso em 05/03/2009.

<http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/Corona.jpg>. Micrografia eletrônica do HCoV. Acesso em 05/03/2009.

http://dsfoster.googlepages.com/em_adeno.gif/em_adeno-large.gif. Micrografia eletrônica dos AdV. Acesso em 05/03/2009.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/em_parvo_2.jpg. Estrutura da partícula dos parvovírus. Acesso em 05/03/2009.

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/9/9d/Canine_parvovirus_Samp_k8797o.jpg/180px-Canine_parvovirus_Samp_k8797o.jpg. Micrografia eletrônica dos parvovírus. Acesso em 05/03/2009.

http://www.faperj.br/img/repositorio/virusImp_peq.jpg. Estrutura da partícula dos poliomavírus. Acesso em 05/03/2009.

<http://www.scielosp.org/img/revistas/resp/v79n2/42.jpg>. Micrografia eletrônica dos poliomavírus. Acesso em 05/03/2009.

<http://www.guianet.com.br/brasil/mapaclima.htm>. GuiaNet. O Guia do Brasil – Mapa Climático do Brasil. Acesso em 13/03/2009.

http://www.topgyn.com.br/conso01/rio_de_janeiro/index.php. Clima do Rio de Janeiro. Acesso em 13/03/2009.

ICTV. (2008).

<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2008&bhcp=1>. Acesso 09/03/2009

Imperiale, M. J. & Major, E. O. (2007). Polyomaviruses. pp.2263 – 2298. *In*: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). Fields Virology, 5th ed, vol 2, Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Jennings, L. C.; Anderson, T. P.; Werno, A. M.; Beynon, K. A.; Murdoch, D. R. (2004). Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital. Role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **23**:1003-1007.

Jofré, L.; Luchsinger, V.; Zepeda, G.; Rojas, A.; Muñoz, A. (2007). Apnea como forma de presentación de uma infecção por metapneumovirus humano. *Rev. Chil. Infect.*, **24**:313-318.

Johnston, S. L.; Pattemore, P. K.; Sanderson, G.; Smith, S.; Lampe, F.; Josephs, L.; Symington, P.; O'Tolle, S.; Mynt, S. H.; Tyrell, D. A. ; Holgate, S. T. (1995). Community study of role of viral infections in exacerbation of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*, **310**:1225-1229.

Kahn, J. S. (2007). Newly discovered respiratory viruses: significance and implications. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **7**:1-6.

Kaiser, L.; Regamey, N.; Roiha, H.; Deffernez, C.; Frey U. (2005). Human coronavirus NL63 associated with lower respiratory tract symptoms in early life. *Pediatr. Infect. Dis.*; **24**:1015-7.

Kaiser, L. (2006). Influenza will not miss opportunities. *Clin. Infect. Dis.*, **43**:1562-1564.

Karron, R. A.; Collins, P. L. (2007). Parainfluenza Viruses, p. 1497-1526. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology*, 5th ed, vol 1,. Philadelphia, Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Kesebir, D.; Vazquez, M.; Weibel, C.; Shapiro, E. D.; Ferguson, D.; Landry, M. L.; Kahn, J. S. (2006). Human bocavirus infection in Young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J. Infect. Dis.*, **194**:1276-1282.

Khetsuriani, N.; Kazerouni, N. N.; Erdman, D. D.; Lu, X.; Redd, S. C.; Anderson, L. J.; Teague, W. G. (2007). Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **119**:314-321.

Khetsuriani, N.; Lu, X.; Teague, W. G.; Kazerouni, N.; Anderson, L. J.; Erdman, D. D. (2008). Novel human rhinoviruses and exacerbation of asthma in children. *Emerg. Infect. Dis.*, **14**:1393-1796.

Ksiazek, T.; Erdman, D.; Goldsmith, C. S.; Zaki, S. R.; Peret, T.; Emery, S.; Tong, S.; Urbani, C.; Comer, J. A.; Lim, W.; Rollin, P. E.; Dowell, S. F.; Ling, A.-E.; Humphrey, C. D.; Shieh, W.-J.; Guarner, J.; Paddock, C.D.; Rota, P.; Fields, B.; DeRisi, J.; Yang, J.-Y.; Cox, N.; Hughes, J. M.; LeDuc, J. W.; Bellini, W. J.; Anderson, L. J.; SARS Working Group. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **348**:1953-1966.

Kuiken, T.; Fouchier, R.; Rimmelzwaan, G.; Osterhaus A. (2003). Emerging viral infections in a rapidly changing world. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**:641-646.

Kupfer, B.; Simon, A.; Jonassen, C. M.; Viazov, S.; Ditt, V.; Tillmann, R.-L.; Müller, A.; Matz, B.; Schildgen, O. (2007). Two cases of severe obstructive pneumonia associated with an HKU1-like coronavirus. *Eur. J. Med. Res.*, **12**:134-138.

Lai, M. M. C.; Perlman, S.; Anderson, L. J. (2007). Coronaviridae, p.1305-1335. *In: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). Fields Virology, 5th ed, vol 1. Philadelphia, Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.*

Lau, S. K.; Woo, P. C.; Yip, C. C.; Tse, H.; Tsoi, H. W.; Cheng, V. C.; Lee, P.; Tang, B. S.; Cheung, C. H.; Lee, R. A.; So, L. Y.; Lau, Y. L.; Chan, K. H.; Yuen, K. Y. (2006). Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.*, **44**:2063-2071.

Lau, S. K.; Yip, C. C.; Tsoi, H. W.; Lee, R. A.; So, L. Y.; Lau, Y. L.; Chan, K. H.; Woo, P. C.; Yuen, K. Y. (2007a). Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J. Clin. Microbiol.*, **45**:3655-3664

Lau, K. P.; Yip, C. C. Y.; Que, T.-L.; Lee, R. A.; Au-Yeung, R. K. H.; Zhou, B.; So, L.-Y.; Lau, K.-L.; Chan, K.-H.; Woo, P. C. Y.; Yuen, K.-Y. (2007b). Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J. Infect. Dis.*, **196**:986-993.

Le, B. M.; Demertzis, L. M.; Wu, G.; Tibbets, R. J.; Buller, R.; Arens, M. Q. (2007). Clinical and epidemiologic characterization of WU polyomavirus infection, St. Louis, Missouri. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**:1936–1938.

Lee, J. I.; Chung, J.-Y.; Han, T. H.; Song, M.-O.; Hwang, E.-S. (2007). Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J. Infect. Dis.*, **196**:994-997.

Le Gall, O. ; Christian, P. ; Fauquet, C. M. ; King, A. M. Q. ; Knowles, N. J. ; Nakashima, N. ; Stanway, G. ; Gorbalenya, A. E. (2008). *Picornavirales*, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Arch. Virol.*, **153** :715-727.

Leidy, N. K. ; Margolis, M. K. ; Marcin, J. P. ; Flynn, J. A. ; Frankel, L. R. ; Johnson, S. ; Langkamp, D. ; Simoes, A. F. (2005). The impact of severe respiratory syncytial virus on the child, caregiver, and family during hospitalization and recover. *Pediatrics*, **115** :1536-1546.

Lin, F.; Zheng, M.; Li, H.; Zheng, C.; Li, X.; Rao, G.; Zheng, M.; Wu, F.; Zeng, A. (2008). WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, China. *J. Clin. Virol.*, **42**:94-102.

Lu, X.; Chittaganpitch, M.; Olsen, S. J.; Mackay, I. M.; Sloots, T. P.; Fry, A. M.; Erdman, D. D. (2006). Real-time PCR assay for detection of bocavirus in human specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **44**:3231-3235.

Mackay, I. M.; Jacob, K. C.; Woolhouse, D.; Waller, K.; Syrmis, M. W.; Whiley, D. M.; Siebert, D. J.; Nissen, M.; Sloots, T. P. (2003). Molecular Assays for Detection of Human Metapneumovirus. *J. Clin. Microbiol.*, **41**:100-105.

Mackay, I. M. (2008). Human rhinoviruses: the cold wars resume. *J. Clin. Virol.*, **42**:297-320.

McIntosh, K.; Dees, J. H.; Becker, W. B.; Kapikian, A. Z.; Chanock, R. M. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **57**:933-940.

McIntosh, K. (2006). Human bocavirus: developing evidence for pathogenicity. *J. Infect. Dis.*, **194**:1197-1199.

McIntosh, K.; Peiris, J. S. M. (2009). Coronaviruses, p.1155-1171. In: Richman, D. D.; Whitley, R. J.; Hayden, F. G. (eds). *Clinical Virology*, 3rd ed, Washington, DC, ASM Press.

McErlean, P.; Shackelton, L. A.; Andrews, E.; Webster, D. R.; Lambert, S. B.; Nissen, M. D.; Sloots, T. P.; Mackay, I. M. (2008). Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, *Human Rhinovirus C* (HRV C). *Plos One*, **3**:e1847.

Mejías, A.; Chávez-Bueno, S.; Ramilo, O. (2004). Human metapneumovirus: a not so new virus. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **23**:1-10.

Ministério da Saúde (2008). Nota Técnica N.º 26/08/CGPNI/DEVEP/SVS/MS, 15 de abril de 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_vacina_idoso2008.pdf. Acesso em 13/03/08.

Minosse, C.; Selleri, M.; Zaniratti, M. S.; Cappiello, G. ; Spanò, A.; Schifano, E.; Lauria, F. N.; Gualano, G.; Puro, V.; Campanini, G.; Gerna, G.; Capobianchi, M. R. (2008). Phylogenetic analysis of human coronavirus NL63 circulating in Italy. *J. Clin. Virol.*, **43**:114-119.

Miyao, C. R.; Gilio, A. E.; Vieira, S.; Hein, N.; Pahl, M. M. C.; Betta, S. L.; Durigon, E. L.; Stewien, K. E.; Queiroz, D. A. O.; Botoso, V. F.; Gomes, M. C. S.; Lopes, C. L. B. C.; Ejzenberge, B.; Okay, Y. (1999). Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. *J. Pediatr (Rio J.)*, **75**:334-344.

Moës, E.; Vijgen, L.; Keyaerts, E.; Zlateva, K.; Li, S.; Maes, P.; Pirc, K.; Berkhout, B.; van der Hoek, L.; van Ranst, M. (2005). A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect Dis.*, **5**:6

Monto, A. S. (2002). Epidemiology of viral respiratory infections. *Am. J. Med.*, **112**:4S-12S.

Monto, A. S. (2004). Occurrence of respiratory virus: time, place and person. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **23**:S58-64.

Moura, P. O.; Roberto, A. F.; Hein, N.; Baldacci, E.; Vieira, S. E.; Ejzenberg, B.; Perrini, P.; Stewien, K. E.; Durigon, E. L.; Mehnert, D. V.; Harsi, C. M. (2007a). Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. *J. Med. Virol.*, **79**:174-181.

Moura, F. E.; Mesquita, J. R.; Portes, S. A.; Ramos, E. A.; Siqueira, M. M. (2007b). Antigenic and genomic characterization of adenovirus associated to respiratory infections in children living in Northeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **102**:937-941.

Mufson, M. A. (2000). Respiratory Viruses, pp. 235-251, *In*: Specter, S., Hodinka, R.L. & Young, S.A. (eds). *Clinical Virology Manual*, 3th ed., ASM Press, Washington, DC.

Murray, C.J.L.; Lopez, A.D.; Mathers, C.D.; Stein, C. (2001). The global burden of disease 2000 project: aims, methods and data sources. WHO, GPE Discussion paper no. 36. URL: www.who.int/evidence.bod.

Myatt, T. A.; Johnston, S. L.; Rudnick, S.; Milton, D. K. (2003). Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay. *BMC Public Health* **3**:5.

Nascimento, J. P.; Siqueira, M. M.; Sutmoller, F.; Krawczuk, M. M.; Farias, V.; Ferreira, V.; Rodrigues, M.J. (1991). Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **33**:287-296.

Nascimento-Carvalho, C. M.; Ribeiro, C. T.; Cardoso, M. R.; Barral, A.; Araújo-Neto, C. A.; Oliveira, J. R.; Sobral, L. S.; Viriato, D.; Souza, A. L.; Saukkoriipi, A. Paldanius, M.; Vainiopää, R.; Leinonen, M.; Ruuskanen, O. (2008). The role of respiratory viral infections among children hospitalized for community-acquired pneumonia in a developing country. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **27**:939-941.

Neske, F.; Blessing, K.; Tollman, F.; Schuber, J.; Rethwilm, A.; Kreth, H. W.; Weissbrich, B. (2007). Real-Time PCR assay for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **45**:2116-2122.

Neske, F.; Blessing, K.; Ullrich, F.; Pröttel, A.; Kreth, H. W.; Weissbrich, B. (2008). WU polyomavirus infection in children, Germany. *Emerg. Infect. Dis.*, **14**:680–681.

Neske, F.; Blessing, K.; Pröttel, A.; Ullrich, F.; Kreth, H. W.; Weissbrich, B. (2009). Detection of WU poliomavirus DNA by real-time PCR in nasopharyngeal aspirates, serum, and stool samples. *J. Clin. Virol.*, **44**:115-118.

Norja, P.; Ubillos, I.; Templeton, K.; Simmonds, P. (2007). No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *J. Clin. Virol.*, **40**:307–311.

Oliveira, T. F. M.; Freitas, G. R. O.; Ribeiro, L. Z. G.; Yokosawa, J.; Siqueira, M. M.; Portes, S. A. R.; Silveira, H. L.; Calegari, T.; Costa, L. F.; Mantese, O. C.; Queiróz, D. A. O. (2008a). Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial vírus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **103**:417-422.

Oliveira, R.; Machado, A.; Tateno, A.; Boas, L. V.; Pannuti, C.; Machado, C. (2008b). Frequency of human metapneumovirus infection in hematopoietic recipients during 3 consecutive years. *Bone Marrow Transplant.*, **42**:265-269.

OPAS. (1995). Infecciones respiratorias agudas en las Américas. *Biol. Epidemiol.*; **16**:1-5.

Padgett, B.L., Walker, D.L., Zurhein, G.M., Eckroade, R.J., Dessel, B.H. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*, **19**:1257-1260.

Payungporn, S.; Chieochansin, T.; Thongmee, C.; Samransamruajkit, R.; Theamboolers, A.; Poovorawan, Y. (2008). Prevalence and molecular characterization of WU/KI polyomaviruses isolated from pediatric patients with respiratory disease in Thailand. *Virus Res.*, **135**:230-236. .

Peiris, M.; Yuen, K. Y.; Leung, C. W.; Chan, K. H.; Ip, P. L. S.; Lai, R. W. M.; Orr, W. K.; Shortridge, K. F. (1999). Human infection with influenza H9N2. *Lancet*, **354**:916-917.

Pham, Q. N.; Biacchesi, S.; Skiadopoulos, M. H.; Murphy, B. R.; Collins, P. L.; Buchholz, U. J. (2005). Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo. *J. Virol.*, **79**:15114-15122.

Pyrk, K.; Berkhout, B.; van der Hoek, L. (2007). The novel human coronaviruses NL63 and HKU1 .*J. Virol.*, **81**:3051-3057.

Rakes, G. P.; Arruda, E.; Ingram, J. M.; Hoover, G. E.; Zambrano, J. C.; Hayden, F. G.; Platts-Mills, T. A. E.; Heymann, P. W. (1999). Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **159**:785-790.

Raymond, F.; Carbonneau, J.; Boucher, N.; Robitaille, L.; Boisvert, S.; Wu, W. K.; de Serres, G.; Boivin, G.; Corbeil, J. (2009). Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assay for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *J. Clin. Microbiol.*, **47**:743-750.

Ren, L.; Gonzalez, R.; Xie, Z.; Zhang, J.; Liu, C.; Li, J.; Li, Y.; Wang, Z.; Kong, X.; Yao, Y.; Hu, Y.; Qian, S.; Geng, R.; Yang, Y.; Vernet, G.; Paranhos-Baccalà, G.; Jin, Q.; Shen, K.; Wang, J. (2008). WU and KI polyomavirus present in the respiratory tract of children, but not in immunocompetent adults. *J. Clin. Virol.*, **43**:330-333.

Rohde, G.; Wiethage, A.; Borg, I.; Kauth, M.; Bauer, T. T.; Gillissen, A.; Bufe, A.; Schultze-Werninghaus, G. (2003). Respiratory viruses in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalization: a case-control study. *Torax*, **58**:37-42.

Rota, P. A.; Oberste, M. S.; Monroe, S. S.; Nix, W. A.; Campagnoli, R.; Icenogle, J. P.; Peñaranda, S.; Bankamp, B.; Mather, K.; Chen, M.-H.; Tong, S.; Tamin, A.; Lowe, L.; Frace, M.; DeRisi, J. L.; Chen, Q.; Wang, D.; Erdman, D. D.; Peret, T. C. T.; Burns, C.; Ksiazek, T. G.; Rollin, P. E.; Sanchez, A.; Liffick, S.; Holloway, B.; Limor, J.; McCaustland, K.; Olsen-Rassmussen, M.; Fouchier, R.; Günther, S.; Osterhaus, A. D. M. E.; Drosten, C.; Pallansch, M. A.; Anderson, L. J.; Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, **300**:1394-1399.

Rowe W.R.; Huerbner R.J.; Gilmore L.K.; Parrot R.H. & Ward T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**:570–573.

Ruuskanen, O.; Metcalf, J. P.; Meurman, O.; Akusjärvi, G. (2009). Adenoviruses, p.559-579. In: Richman, D. D.; Whitley, R. J.; Hayden, F. G. (eds). *Clinical Virology*, 3rd ed, Washington, DC, ASM Press.

Santos, N. S. O.; Soares, C. C. (2008). *Viroses Entéricas*, p.147-176. In: Santos, N. S. O.; Romanos, M. T. V.; Wigg, M. D. (Eds). *Introdução à Virologia Humana*, 2^a. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Schappert, S. M. (1997). Ambulatory care visits to physician offices, hospital outpatient departments, and emergency departments: United States, 1997. *Vital Health Stat.*, **13**:ii-iv.

Serafino, R. L.; Gurgel, R. Q.; Dove, W.; Hart, C. A.; Cuevas, L. E. (2004). Respiratory syncytial vírus and metapneumovirus in children over two seasons with a high incidence of respiratory infections in Brazil. *Ann. Trop. Pediatr.*, **24**:213-217.

Silva, M. J.; Ferraz, C.; Pissarra, S.; Cardoso, M. J.; Simões, J.; Vítor, A. B. (2007). *Allergol et Immunopathol.*, **35**:4-9.

Silverman, L.; Rubinstein, L. J. (1965). Electron microscopy observation on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol.*, **5**:215-224.

Slouts, T. P.; McErlean, P.; Speicher, D. J.; Arden, K.; Nissen, M. D.; Mackay, I. A. (2006). Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J. Clin. Virol.*, **35**:99-102.

Slouts, T. P.; Whiley, D. M.; Lambert, S. B.; Nissen, M. D. (2008). Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J. Clin. Virol.*, **42**:233-243.

Souza, L. S.; Ramos, E. A.; Carvalho, F. M.; Guedes, V. M.; Souza, L. S.; Rocha, C. M. Soares, A. B.; Velloso, L. de F.; Macedo, I. S.; Moura, F. E.; Siqueira, M.; Fortes, S.; de Jesus, C. C.; Santiago, C. M.; Carvalho, A. M.; Arruda, E. (2003). Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. *Pediatr Pulmonol.*, **35**:184-191.

Stockton, J.; Ellis, J. S.; Saville, M.; Clewley, J. P.; Zambon, M. C. (1998). Multiplex PCR for Typing and Subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **36**:2990-2995.

Straliootto, S. M.; Siqueira, M. M.; Muller, R. L.; Fischer, G. B.; Cunha, M. L. T.; Nestor, S. M. (2002). Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **35**:283-291.

Straliootto, S. M.; Siqueira, M. M.; Machado, V.; Maia, T. M. R. (2004). Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99**:883-887.

Straus, J. H. & Straus, E. G. (2002). Minus-strand RNA virus – Family *Paramyxoviridae*, pp.132-144. *Viruses and human disease*, Academic Press, San Diego.

Suzuki, A.; Okamoto, M.; Ohmi, A.; Watanabe, O.; Miyabayashi, S.; Nishimura, H. (2005a). Detection of human coronavirus-NL63 in children in Japan. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **24**:645-646.

Suzuki, A.; Watanabe, O.; Okamoto, M.; Endo, H.; Yano, H.; Suetake, M.; Nishimura, H. (2005b). Detection of human metapneumovirus from children with acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **24**:655-656.

Tan, W. C.; Xiang, X.; Qiu, D.; Ng, T. P.; Lam, S. F.; Hegele, R. G. (2003). Epidemiology of respiratory viruses in patients hospitalized with near-fatal asthma, acute exacerbation of asthma, or chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med.*, **115**:272-277.

Tang, R. S.; Schickli, J. H.; MacPhail, M.; Fernandes, F.; Bicha, L.; Spaete, J.; Fouchier, R. A. M.; Osterhaus, A. D. M. E.; Spaete, R.; Haller, A. A. (2003). Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome position of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. *J. Virol.*, **77**:10819-10828.

Tang, R. S.; Mahmood, K.; MacPhail, M.; Guzzetta, J. M.; Haller, A. A.; Liu, H.; Kaur, J.; Lawlor, H. A.; Stillman, E. A.; Schickli, J. M.; Fouchier, R. A.; Osterhaus, A. D.; Spaete, R. R. (2005). A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits immunity in African green monkeys. *Vaccine*, **25**:1657-1667.

Taubenberger, J. K.; Morens, D. M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annu. Rev. Pathol.*, **3**:499-522.

Thomazalli, L. M.; Vieira, S.; Lea, A. L.; Sousa, T. S.; Oliveira, D. B. L.; Golono, M. A.; Gillio, A. E.; Stwien, K. E.; Erdman, D. D.; Durigon, E. L. (2007). Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J. Pediatr. (Rio J)*, **83**:422-428.

Treanor, J. J. (2009). Respiratory Infections, p.7-27. In: Richman, D. D.; Whitley, R. J.; Hayden, F. G. (eds). *Clinical Virology*, 3rd ed, Washington, DC, ASM Press.

Tsuchiya, L. R. R. V.; Costa, L. M. D.; Raboni, S. M.; Nogueira, M. B.; Pereira, L. A.; Rotta, I.; Takahashi, G. R. A.; Coelho, M.; Siqueira, M. M. (2005). Viral respiratory infection in Curitiba, southern Brazil. *J. Infect.*, **51**:401-407.

Turner, R. B. (2007). Rhinovirus: more than just a common cold virus. *J Infect Dis.*, **195**:765-766.

Turner, R. B.; Couch, R. B. (2007). Rhinoviruses, p.895-909. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). Fields Virology, 5th ed, vol 1,. Philadelphia, Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Turner, R. B.; Lee, W.-M. (2009). Rhinovirus, p.1063-1082. *In*: Richman, D. D.; Whitley, R. J.; Hayden, F. G. (eds). Clinical Virology, 3rd ed, Washington, DC, ASM Press.

Tyrrell, D. A. J. & Bynoe, M. L. (1965). Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Brit. Med. J.*, **1**:1467-1470.

Vabret, A.; Mourez, T.; Dina, J.; van der Hoek, L.; Gouarin, S.; Petitjean, J.; Brouard, J.; Freymuth, F. (2005). Human coronavirus NL63, France. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**:1225-1229.

Vabret, A.; Dina, J.; Gouarin, S.; Petitjean, J.; Corbet, S.; Freymuth, F. (2006). Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin. Infect. Dis.*, **42**:634–639.

van den Hoogen, B. G.; de Jong, J. C.; Groen, J.; Huiken, T.; de Groot, R.; Fouchier, R. A. M.; Osterhaus, A. D. M. E. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.*, **7**:719-724.

van den Hoogen, B. G.; Bestebroer, T. M.; Osterhaus, A. D.; Fouchier, R. A. (2002). Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*, **295**:119-32.

van den Hoogen, B.G.; Osterhaus, A.D.M.E.; Fouchier, R.A.M. (2004). Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **23**:S25-S32.

van der Hoek, L.; Pyrc, K.; Jebbink, M. F.; Vermeulen-Oost, W.; Berkhout, R. J. M.; Wolthers, K. C.; Wertheim-van Dillen, P. M. E.; Kaandrop, J.; Spaargaren, J.; Berkhout, B. (2004). Identification of a new coronavirus. *Nat. Med.*, **10**:368-373.

van der Hoek, L.; Pyrc, K.; Berkhout, B. (2006.) Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**:760-773

van der Hoek, L.; Sure, K.; Ihorst, G.; Stang, A.; Pyrc, K.; Jebbink, M. F.; Petersen, G.; Forster, J.; Berkhout, B.; Uberla, K. (2006). Human coronavirus NL63 infection is associated with croup. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **581**:485-491.

van der Zalm, M. M.; Rossen, J. W. A.; van Ewijk, B. E.; Wilbrink, B.; van Esch, P. C. H. M.; Wolfs, T. F. W.; van der Ent, C. K. (2008). Prevalence and pathogenicity of WU and KI polyomaviruses in children, the Netherland. *Emerg. Infect. Dis.*, **14**:1787-1789.

van Regenmortel, M. H. V.; Fauquet, C. M.; Bishop, D. H. L.; Carstens, E. B.; Estes, M. K.; Lemon, S. M.; Maniloff, J.; Mayo, M. A.; McGeoch, D. J.; Pringle, C. R.; Wickner, R. B. (2000). *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York San Diego.

Vicente, D.; Cilla, G.; Montes, M.; Pérez-Yarza, E. G.; Pérez-Trallero, E. (2007). Human Bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**:636-637.

Vidal, L. R. R.; Siqueira, M. M.; Nogueira, M. B.; Raboni, S. M.; Pereira, L. A.; Takahashi, G. R. A.; Rotta, I.; Debur M. do C.; Dalla-Costa, L. M. (2008). The epidemiology and antigenic characterization of influenza viruses isolated in Curitiba, south Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **103**:180-185.

Wedzicha, J. A. (2004). Role of viruses in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **1**:115-120.

Weigl, J. A. I.; Puppe, W.; Meyer, C. U.; Berner, R.; Forster, J.; Schmitt, H. J.; Zepp, F.; PID-ARI.net. (2007). Ten years' experience with year-round active surveillance of up to 19 respiratory pathogens in children. *Eur. J. Pediatr.*, **166**:957-966.

WHO. (2003a). WHO issues a global alert about cases of atypical pneumonia. WHO press release, 12 March 2003. URL: http://www.who.int.csr/sars/archive/2003_03_12.

WHO. (2003b). Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. URL: http://www.who.int/csr/sars/country/table2003_09_23/en.

Wigg, M. D. (2008). Antivirais, p.117-146. *In*: Santos, N. S. O.; Romanos, M. T. V.; Wigg, M. D. (Eds). *Introdução à Virologia Humana*, 2^a. Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Williams, J. V. (2005). Human metapneumovirus: an important cause of respiratory disease in children and adults. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, **7**:204-210.

Williams, J. V.; Piedra, P. A.; Englund, J. A. (2009). Respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and parainfluenza viruses, p.817-847. *In*: Richman, D. D.; Whitley, R. J.; Hayden, F. G. (eds). *Clinical Virology*, 3rd ed, Washington, DC, ASM Press.

Wold, W. S. M.; Howitz, M. S. (2007). Adenoviruses, p.2395-2436. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology*, 5th ed, vol 2,. Philadelphia, Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Woo, P. C. Y.; Lau, S. K. P.; Chu, C.-M.; Chan, K.-H.; Tsoi, H.-W.; Huang, Y.; Wong, B. H. L.; Poon, R. W. S.; Cai, J. J.; Luk, W.-K.; Poon, L. L. M.; Wong, S. S. Y.; Guan, Y.; Malik Peiris, J. S.; Yuen, K.-Y. (2005a). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.*, **79**:884-895.

Woo, P. C. Y.; Lau, S. K. P.; Tsoi, H.-W.; Huang, Y. ; Poon, R. W. S.; Chu, C.-M.; Lee, R. A.; Luk, W.-K.; Wong, G. K. M.; Wong, B. H. L.; Cheng, V. C. C.; Tang, B. S. F.; Wu, A. K. L.; Yung, R. W. H.; Chen, H.; Guan, C. Y.; Chan, K.-H.; Yuen, K.-Y. (2005b). Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J. Infect. Dis.*, **192**:1898-1907.

Wright, Neumann & Kawakami, 2007. Orthomyxoviruses, p.1691-1740. *In*: Knipe D.M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus (ed). *Fields Virology*, 5th ed, vol 2,. Philadelphia, Wolters Kluwer Health / Lippincott, Williams and Wilkins.

Wyde, P. R.; Chetty, S. N.; Jewell, A. M.; Boivin, G.; Piedra, P. A. (2003). Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin *in vitro*. *Antiviral. Res.*, **60**:51-59.

Yuen, K. Y. & Wong, S. S. Y. (2005). Human infection by avian influenza A H5N1. *Hong Kong Med. J.*, **11**:189-199.

Zu Rhein, G. M. (1967). Polyoma-like virions in a human demyelinating disease. *Acta Neuropathol.*, **8**:57-68.

zur Hausen, H. (2008). Novel human polyomaviruses – re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int. J. Cancer*, **123**:247-250.

ANEXO I

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DE AMOSTRAS DE SECREÇÃO RESPIRATÓRIA

Nº da amostra _____

Nome: _____ Idade: _____

Bairro de Origem: _____

Hospitalizado Emergência Ambulatório

Sintomas Clínicos: Febre Bronquiolite

Dor de garganta Tosse

Congestão nasal Chiado

Pneumonia Outros: _____

Tempo de Duração dos Sintomas: _____

Local e Data da Coleta: _____

ANEXO II

**Manuscrito publicado no Emerging Infectious Disease Journal,
13(11):1756-1758, 2007.**

Título: Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil.

Autores: Marial Carolina M. Albuquerque, Ludmila N. Rocha, Fabrício José Benati, Caroline C. Soares, Adriana G. Maranhão, Maria Liz Ramírez, Dean Erdman & Norma Santos

Neste estudo foram analisadas 705 amostras fecais de crianças com gastroenterite, coletadas entre 2003 e 2005. Nosso objetivo foi investigar se o HBoV poderia infectar o trato gastrointestinal de humano e ser detectado nas fezes, a exemplo do que ocorre com os bocavírus de animais, além de acessar a frequência dessas infecções. O vírus foi detectado em 2% das crianças com gastroenterite e sem sintomas respiratórios, demonstrando que o HBoV pode ser replicado no intestino e excretado nas fezes e que poderia estar associado aos quadro de gastroenterite. Esta foi a primeira descrição da circulação de HBoV no Brasil e na América do Sul.

Human Bocavirus Infection in Children with Gastroenteritis, Brazil

Maria Carolina M. Albuquerque,*
Ludmila N. Rocha,* Fabrício José Benati,*
Caroline C. Soares,* Adriana G. Maranhão,*
Maria Liz Ramírez,* Dean Erdman,†
and Norma Santos*

Human bocavirus (HBoV) was detected in 14 (2%) of 705 fecal specimens from Brazilian children with gastroenteritis. Coinfection with rotavirus, adenovirus, or norovirus was found in 3 (21.4%) HBoV-positive specimens. None of the HBoV-positive patients had respiratory symptoms.

Human bocavirus (HBoV) was first identified in pooled human respiratory tract specimens from Swedish children in 2005 and was provisionally classified within the genus *Bocavirus* of the family *Parvoviridae* (1). Previously, the only parvovirus known to be pathogenic in humans was B19 virus, which is responsible for Fifth disease in children (2). Because HBoV was first found in respiratory specimens, most epidemiologic studies have focused on such specimens. Shortly after its first description in Sweden, HBoV was detected in respiratory tract specimens from patients with respiratory illness in several parts of the world (3–8).

Other members of the family *Parvoviridae* that infect animals cause diseases such as leukopenia/enteritis syndrome, seen most commonly in dogs 8–12 weeks of age, with clinical features of vomiting, anorexia, lethargy, and diarrhea that lead to rapid dehydration (9). For this reason, we hypothesized that HBoV may play a role in human gastrointestinal disease. In this study, we retrospectively tested stool specimens collected from 2003 through 2005 from Brazilian children with acute diarrhea to investigate whether this virus can infect the human gastrointestinal tract and be detected in feces, and to assess the frequency of such infections.

The Study

A total of 705 stool specimens from Brazilian children <15 years of age (median 3.5 years) with acute diarrhea

*Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; and †Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

were obtained from January 2003 through December 2005 and screened by PCR for HBoV DNA. Of these specimens, 285 (40.4%) were collected from hospitalized patients and 420 (59.6%) from outpatients: 142 (20.2%) from the emergency department and 278 (39.4%) from walk-in clinics. Only 1 specimen was obtained per patient. A total of 314 (44.5%) patients were <2 years of age, 190 (27%) were 2–5 years of age, 120 (17%) were 6–10 years of age, and 61 (8.6%) were 11–15 years of age. Age was not known for 21 patients. Relevant clinical information was collected on a standard questionnaire. This information included hospitalization status, age, sex, and clinical symptoms.

Specimens were collected at university hospitals in 3 different cities in Brazil located in areas with distinct sanitation conditions and socioeconomic backgrounds. The specimens were previously tested for other enteric viruses and bacteria, including rotavirus, norovirus, astrovirus, adenovirus, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., and *Shigella* spp. (10,11). The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira of the Federal University of Rio de Janeiro.

Stool suspensions were prepared as 10% (w/v) in phosphate-buffered saline (pH 7.2), clarified by centrifugation at 2,500× *g* for 5 min. Two hundred microliters of each suspension was used for DNA extraction with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. PCRs were performed as described (7) by using forward primer HBoV 01.2 (5'-TATGGCCAAGGCAATCGTCCAAG-3') and reverse primer HBoV 02.2 (5'-GCCGCGTGAACATGAGAAACAGA-3') for the nonstructural protein 1 gene. A 291-bp amplicon was generated. DNA samples were subjected to 1 cycle at 95°C for 15 min, followed by 45 cycles at 94°C for 20 s, 56°C for 20 s, and 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were detected by agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide.

To confirm the presence of HBoV, amplified DNAs of PCR-positive samples were purified by using the Wizard SV gel and PCR Clean-Up system kit (Promega). Sequences were determined by using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit and the ABI PRISM 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). DNA sequences were assembled and analyzed with the SeqMan, EditSeq, and MegAlign programs in the Lasergene software package (DNASTAR, Madison, WI, USA). Nucleotide sequences obtained in this study were deposited in GenBank under accession nos. EF560205–EF560216.

Fourteen (2%) of 705 diarrhea stool samples were positive for HBoV by PCR. Rotavirus was detected in 84 (11.9%) samples, adenovirus in 34 (4.8%) samples, noro-

virus in 24 (3.4%) samples, and astrovirus in 2 (0.3%) samples. Enteropathogenic bacteria were found in 57 (8.1%) samples (10,11). The frequency of enteric pathogens identified in epidemiologic studies is variable (45%–54%) and dependent on several parameters such as country and type of method used for diagnosis (12–14). In our study, a potential pathogen was found in 215 (30.5%) samples (including HBoV-positive samples). No bacterial or virus pathogen was found in 499 (69.5%) samples. Samples were not tested for intestinal parasites, which in general account for ≈11% of the diarrhea etiology in developing countries (12,14).

There was no obvious temporal clustering of the HBoV-positive patients. The median age of HBoV-infected children was 1.9 years; 11 children (78.6%) were <2 years of age, 1 child was 35 months of age, 1 child was 11 years of age, and 1 child was 15 years of age. A total of 57% were boys and 43% were girls. Three patients were coinfecting with other enteric viruses (1 with adenovirus, 1 with rotavirus, and 1 with norovirus). All HBoV-positive patients had diarrhea but none reported concomitant respiratory symptoms. Fever was reported in 2 patients, vomiting in 1, and bloody diarrhea in 2. One hospitalized boy (the oldest study participant) was reported to be positive for HIV and cytomegalovirus, and 1 hospitalized girl was undergoing dialysis. Ten (71.2%) HBoV-positive children were hospitalized because of diarrhea; 3 were outpatients (2 from walk-in clinics and 1 from an emergency department).

A semiquantitative PCR of HBoV in stool specimens was performed by using dilutions of DNA extracted from stool samples. We detected DNA up to a dilution of 10^{-3} in 3 samples. In the remaining samples, DNA was detected only in undiluted samples. Sequence analysis showed high nucleotide similarity between Brazilian samples and the Chinese respiratory HBoV WLL-3 strain (GenBank accession no. EF584447) from the People's Republic of China (91.8%–99.6%) and among the Brazilian samples (96.4%–100%) (Figure). We could not compare our enteric strains with a Spanish enteric strain (8) because we sequenced a different portion of the virus genome. Strain MC-8 showed the lowest homology with the WLL-3 strain (91.8%) and with the other Brazilian strains (96.4%). We are conducting additional sequencing to characterize the complete genome of this strain to confirm that it represents a new variant of the virus.

Conclusions

HBoV has been isolated from respiratory specimens from patients with acute respiratory illness, and increasing evidence suggests a causal relationship with this disease (3–8). The presence of HBoV in the human gastrointestinal tract was demonstrated by Vicente et al. (8), as well as in our study. In the first study, virus was isolated from feces

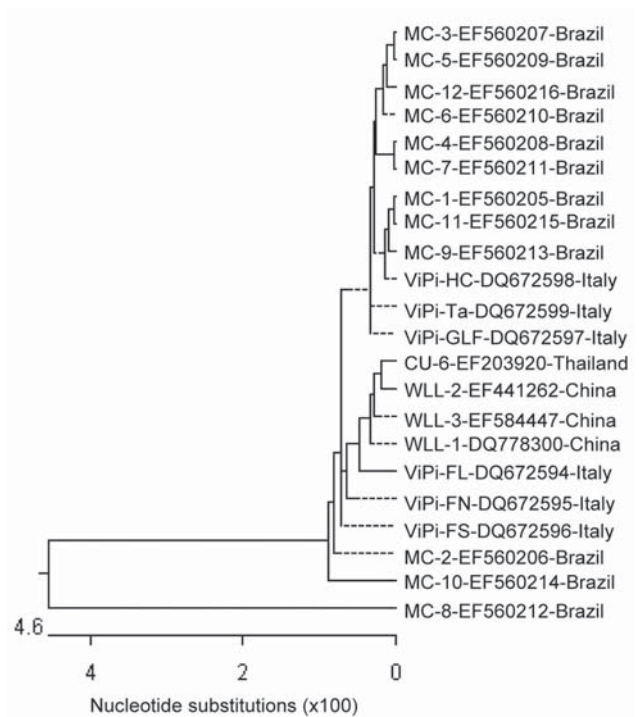


Figure. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the nonstructural protein 1 gene of enteric strains of human bocavirus from Brazil. The dendrogram was constructed with the Clustal W algorithm of the MegAlign program in the Lasergene software package (DNASTAR, Madison, WI, USA). The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs. Dashed lines on a phenogram indicate a negative branch length. GenBank accession nos. are shown with strains.

of children with gastroenteritis with or without symptoms of respiratory infection. Coinfection with other intestinal pathogens was found in 28 (58.3%) of 48 HBoV-positive samples. In our study, none of the HBoV-positive patients reported respiratory symptoms. Coinfection with other enteric viruses was found in 3 (21.4%) of 14 HBoV-positive samples. High titers of DNA in some specimens suggest that the virus replicates in the human gut. However, additional studies that include control groups are needed to demonstrate an association between HBoV infection and gastroenteritis.

This article represents a portion of a thesis submitted by M.C.M.A. to the Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, as a partial fulfillment of the requirements for a Doctor of Science degree.

This study was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Brazil.

Ms Albuquerque is a doctoral student at the Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil. Her research interests include diagnosis and epidemiology of enteric and respiratory viruses.

References

1. 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 U S A*. 2005;102:12891–6.
2. Berns K, Parish CR. 2007. Parvovirus. In: Knipes DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al. editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott, Williams and Wilkins; 2007. p. 2437–77.
3. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:848–50.
4. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis*. 2007;195:1038–45.
5. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis*. 2006;194:1276–82.
6. Simon A, Groneck P, Kupfer B, Kaiser R, Plum G, Tillmann RL, et al. Detection of bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of child with bronchiolitis. *J Infect*. 2006;54:e125–7.
7. Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden K, Nissen MD, Mackay IA. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol*. 2006;35:99–102.
8. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Yarza EG, Pérez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:636–7.
9. Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ, editors. *Veterinary virology*. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1999;343–56.
10. Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MCM, Maranhão AG, Rocha LN, et al. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1244–6.
11. Volotão EM, Soares CC, Maranhão AG, Rocha LN, Hoshino Y, Santos N. Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro–Brazil during 2000–2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J Med Virol*. 2006;78:263–72.
12. El-Mohamady H, Abdel-Messiha IA, Youssef FG, Saide M, Farage H, Shaheena HI, et al. Enteric pathogens associated with diarrhea in children in Fayoum, Egypt. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;56:1–5.
13. Olesen B, Neimann J, Böttiger B, Ethelberg S, Schiellerup P, Jensen C, et al. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3636–41.
14. Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB, Silva T, Penati M, Nogueira PA, et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med Biol Res*. 2006;39:507–17.

Address for correspondence: Norma Santos, Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS –BI, I, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro – J, 21.941-590, Brazil; email: nsantos@micro.ufrj.br

ANEXO III

Manuscrito publicado no *Emerging Infectious Disease Journal*,

15(5):806-808, 2009

Título: **Novel respiratory virus infections in children, Brazil.**

Autores: Marial Carolina M. Albuquerque, Giselle P. A. Pena, Rafael B. Varella, George Gallucci, Dean Erdman & Norma Santos

Neste estudo foram analisados 205 *swabs* nasais de crianças com infecção respiratória coletados entre março de 2006 e outubro de 2007. Nosso objetivo foi investigar a ocorrência de infecções respiratórias associadas com HMPV, HBoV, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, KIPyV, e WUPyV entre crianças brasileiras. O estudo revelou a circulação destes agentes em 9,2% dos pacientes estudados sugerindo que estes vírus poderiam ser patógenos respiratórios importantes no país.

Novel Respiratory Virus Infections in Children, Brazil

Maria Carolina M. Albuquerque, Gisele P.A. Pena, Rafael B. Varella, George Gallucci, Dean Erdman, and Norma Santos

Recently discovered respiratory viruses were detected in 19 (9.2%) of 205 nasal swab specimens from children in Brazil with respiratory illnesses. Five each were positive for human metapneumovirus (HMPV) alone and human bocavirus (HBoV) alone, 3 for human coronaviruses (HCoV-HKU1 or -NL63) alone, and 6 for more than 1 recently discovered virus.

Viral infections are among the leading causes of respiratory disease in children. Most of these infections are caused by respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus A or B (FluV), parainfluenza virus (PIV), rhinovirus (RV), or adenovirus (AdV). Several recently discovered viruses, such as human metapneumovirus (HMPV), human bocavirus (HBoV), and the human coronaviruses (HCoVs) NL63 and HKU1, have been identified as potential respiratory pathogens (1). In addition, 2 new human polyomaviruses (HPyVs), KIPyV and WUPyV, have been detected in patients with respiratory infections (1). In Brazil, epidemiologic studies have demonstrated the extent to which viruses cause respiratory illness in children (2–4). However, because such studies have focused on the most common viral pathogens, the extent to which the novel respiratory viruses are etiologic agents of respiratory disease in Brazilian children remains unknown. In this study, we sought to investigate the occurrence of respiratory infections associated with HMPV, HBoV, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, KIPyV, and WUPyV among children in Brazil.

The Study

The study protocol was reviewed and approved by the research ethics committees of the Institute of Puericulture and Pediatrics Martagão Gesteira of the Federal University of Rio de Janeiro and the Educational Foundation of Serra dos Órgãos of Teresópolis. The parents of all children involved in the study gave informed consent for their chil-

dren's participation in accordance with Resolution 196/96 of the Brazilian Ministry of Health.

Nasal swabs from 205 children (median age 3.3 years; range 1 month to 15 years) with acute upper or lower respiratory illnesses were collected from March 2006 through October 2007 and tested for viral pathogens. Acute respiratory illness was defined by the presence of rhinorrhea, cough, respiratory distress, or sore throat, associated or not with fever, for a maximum duration of 7 days. The specimens were collected from hospitalized patients, emergency departments, and walk-in clinics at 2 university hospitals in the cities of Rio de Janeiro and Teresópolis. Relevant clinical information, including patients' hospitalization status, age, sex, and clinical symptoms, was collected during the first medical visit by means of a standard questionnaire.

The nasal swabs were immersed in 1 mL of virus transport media and kept at -70°C until processing. Nucleic acid was extracted from 200 μL of the sample by using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA) or RNAagents kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Specimens were tested for presence of FluV A and B (5), PIV 1–4 (6), AdV (7), RSV (8), RV (8), HMPV (9), HBoV (10), WUPyV (11), and KIPyV (12) by conventional PCR assays as previously described. A real-time PCR protocol was used for detection of HCoVs (229E, OC43, NL63, and HKU1) (13).

Of the 205 samples tested, 63 (30.7%) were positive for at least 1 of the viral pathogens specified above. Nineteen (9.2%) were positive for at least 1 of the newly described viruses: 5 for HMPV only, 5 for HBoV only, 3 for HCoV-HKU1 or HCoV-NL63 only, and 6 for co-infections with these viruses, including 2 samples positive for KIPyV or WUPyV (Table). Of the samples positive for common respiratory viruses, 33 were positive for rhinovirus only, 5 for FluV A only, 3 for RSV only, and 1 each for HCoV-OC43 and AdV only. Two samples were positive for >1 common respiratory viruses, and PIV was not detected (online Appendix Table, available from www.cdc.gov/EID/content/15/5/806-appT.htm). The age of the patients infected with the newly described viruses ranged from 4 months to 11 years (median 2.7 years). The most frequent clinical symptoms were fever, rhinorrhea, cough, sore throat, wheezing, bronchiolitis, and pneumonia (Table). Although the specimens were collected from symptomatic children and a wide range of viruses were screened for by highly sensitive methods, less than one third of the samples were positive. Perhaps if we had collected nasopharyngeal swabs or aspirates, the percentage of samples that tested positive would have been higher.

The diagnosis for most patients infected with HCoV-NL63 or HCoV-HKU1 was pneumonia. Of the 3 patients with single infections, 2 were hospitalized and 1 was treated at the emergency department; the 2 patients with mixed

Author affiliations: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (M.C.M. Albuquerque, G.P.A. Pena, N. Santos); Centro Universitário Serra dos Órgãos, Teresópolis, Rio de Janeiro (R. B. Varella); and Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA (G. Gallucci, D. Erdman)

DOI: 10.3201/eid1505.081603

Table. Clinical symptoms observed among patients with a single infection, by virus, Brazil, 2006–2007*

Clinical symptom	% Patients (no. positive/no. tested)							
	HCoV-HKU1 or NL63	HMPV	HBoV	RV	FluV A	RSV	HCoV-OC43	AdV
Fever	100 (3/3)	80 (4/5)	80 (4/5)	52 (17/33)	40 (2/5)	100 (3/3)	0 (0/1)	100 (1/1)
Rhinorrhea	33 (1/3)	60 (3/5)	60 (3/5)	67 (22/33)	80 (4/5)	100 (3/3)	0 (0/1)	0 (0/1)
Cough	33 (1/3)	100 (5/5)	80 (4/5)	67 (22/33)	40 (2/5)	33 (1/3)	0 (0/1)	100 (1/1)
Sore throat	0 (0/3)	20 (1/5)	20 (1/5)	6 (2/33)	60 (3/5)	0 (0/3)	0 (0/1)	0 (0/1)
Wheezing	33 (1/3)	40 (2/5)	80 (4/5)	27 (9/33)	20 (1/5)	0 (0/3)	0 (0/1)	100 (1/1)
Bronchiolitis	33 (1/3)	20 (1/5)	0 (0/5)	12 (4/33)	0 (0/5)	0 (0/3)	100 (1/1)	0 (0/1)
Pneumonia	100 (3/3)	0 (0/5)	40 (2/5)	27 (9/33)	20 (1/5)	0 (0/3)	0 (0/1)	0 (0/1)

*HCoV, human coronavirus; HMPV, human metapneumovirus; HBoV, human bocavirus; RV, rhinovirus; FluV A, influenza virus A; RSV, respiratory syncytial virus; AdV, adenovirus.

infection of HCoV-NL63 and HMPV or RV were treated at walk-in clinics.

Patients with HMPV infections had a myriad of symptoms, including fever, cough, rhinorrhea, wheezing, and sore throat. Of the 5 patients with single infections, 4 were treated at walk-in clinics and 1 was treated at an emergency department. A patient co-infected with HMPV and HCoV-NL63 was treated at a walk-in clinic, and a patient co-infected with HMPV and KIPyV and 1 co-infected with HMPV, HCoV-OC43, AdV, and RV were treated at an emergency department. The patient co-infected with KIPyV was a 4-year-old boy with cough, fever, rhinorrhea, and wheezing.

HBoV was detected in samples from 5 patients as a single infection and in samples from 2 patients as a co-infection with RV or WUPyV. Three patients had pneumonia (2 single infections and 1 co-infection with RV). Two of the 3 were treated at walk-in clinics; 1 of the patients with only HBoV infection was hospitalized. The patient co-infected with WUPyV was a 10-month-old boy who had been treated at an emergency department after exhibiting cough, rhinorrhea, and laryngomalacia.

Conclusions

Previous studies have documented the importance of respiratory virus infections among pediatric patients in Brazil (2–4). However, the effect of the so-called emerging respiratory viruses on the children of Brazil is yet to be clarified. Few studies have demonstrated the circulation of HMPV among Brazilian children (4,14), and to our knowledge, none have described the circulation of HBoV, HCoV, or HPyVs as respiratory pathogens in Brazil, although 1 study did report the presence of HBoV in the stools of Brazilian children with gastroenteritis (15). Our finding that HMPV, HBoV, HCoV-HKU1 or HCoV-NL63, or the newly described KIPyV or WUPyV was present in 9.2% of the tested samples suggests that these viruses could be important respiratory pathogens in the country. However, further investigative studies that include appropriately matched control groups will be necessary to demonstrate that these novel viruses act as etiologic agents of respiratory disease in Brazil.

Acknowledgments

We thank Shifaq Kamili and Soluza dos Santos Gonçalves for their technical assistance.

This manuscript represents a portion of a thesis submitted by M.C.M.A. to the Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil, as a partial fulfillment of the requirements for a Doctor of Science degree.

This study was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

Ms Albuquerque is a PhD candidate at Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil. Her research interests include the diagnosis of enteric and respiratory infections and the epidemiology of enteric and respiratory viruses.

References

1. Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD. Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol*. 2008;42:233–43. DOI: 10.1016/j.jcv.2008.03.002
2. Tsuchiya LR, Costa LMD, Raboni SM, Nogueira MB, Pereira LA, Rotta I, et al. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect*. 2005;51:401–7. DOI: 10.1016/j.jinf.2004.12.002
3. Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TF, Silveira HL, Nepomuceno LL, et al. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:301–6. DOI: 10.1590/S0074-02762006000300014
4. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2007;83:422–8.
5. Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2990–5.
6. Aguilar JC, Perez-Brena MP, Garcia ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarria JE. Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcriptase-PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1191–5.
7. Allard A, Albinsson B, Wandell G. Rapid typing of adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*. 2001;39:498–505. DOI: 10.1128/JCM.39.2.498-505.2001

8. Myatt TA, Johnston SJ, Rudnick S, Milton DK. Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay. *BMC Public Health*. 2003;3:5. DOI: 10.1186/1471-2458-3-5
9. Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, Waller K, Syrnis MW, Whiley DM, et al. Molecular assay for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol*. 2003;41:100–5. DOI: 10.1128/JCM.41.1.100-105.2003
10. Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden K, Nissen MD, Mackay IA. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol*. 2006;35:99–102. DOI: 10.1016/j.jcv.2005.09.008
11. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog*. 2007;3:e64. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030064
12. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. A newly reported human polyomavirus, KI virus, is present in the respiratory tract of Australian children. *J Virol*. 2007;81:4130–6. DOI: 10.1128/JVI.00028-07
13. Dare RK, Fry AM, Chittaganpitch M, Sawanpanyalert P, Olsen SJ, Erdman DD. Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. *J Infect Dis*. 2007;196:1321–8. DOI: 10.1086/521308
14. Cuevas LE, Ben Nsser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:1626–8.
15. Albuquerque MC, Rocha LN, Benati FJ, Soares CC, Maranhão AG, Ramírez ML, et al. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1756–8.

Address for correspondence: Norma Santos, Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, CCS-BI. I, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro-RJ, 21.941-590, Brazil; email: nsantos@micro.ufrj.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)