

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Caracterização molecular dos quatro subtipos do metapneumovírus humano em crianças atendidas em Uberlândia, MG, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre

Bruno Moreira Carneiro

Uberlândia

2009

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Caracterização molecular dos quatro subtipos do metapneumovírus humano em crianças atendidas em Uberlândia, MG, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre

Bruno Moreira Carneiro

Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz  
(orientadora)

Uberlândia  
2009

C289c Carneiro, Bruno Moreira, 1984 -

Caracterização molecular dos quatro subtipos do metapneumovirus humano em crianças atendidas em Uberlândia, MG, Brasil / Bruno Moreira Carneiro - Uberlândia, 2009.

47f.:il

Orientadora: Divina Aparecida Oliveira Queiróz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada – Instituto de Ciências Biomédicas.

Inclui bibliografia.

1. Doenças respiratórias infantis - Teses. 2. Vírus respiratórios - Teses. 3. Metapneumovirus humano - Teses. I. Queiróz, Divina Aparecida Oliveira. II. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada – Instituto de Ciências Biomédicas. III. Título.

CDU: 616.2-053.2

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre

Bruno Moreira Carneiro

Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz  
(orientadora)

Uberlândia  
2009

*“If I have seen further,  
it's by standing on the  
shoulder of giants.”*

**Isaac Newton**

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais Maurílio e Rita pelo carinho e incentivo em todos os momentos.

À minha namorada Sabrina por seu amor e por estar sempre ao meu lado, incondicionalmente.

À minha irmã Lise, pelo carinho e pelas inúmeras revisões em meus textos em inglês.

À Prof. Dra. Divina Queiroz, minha orientadora, por dentre inúmeras outras coisas, ter me ensinado que são nos nossos erros que aprendemos.

Ao Dr. Jonny Yokosawa, que apesar da distância me socorreu nos momentos cruciais.

Aos amigos do laboratório Lourenço Costa, Guilherme Ramos, Thelma Mattos, Lysa Nepomuceno e Nayhanne Tizzo pelos inúmeros auxílios, discussões, risadas e pausas para o café, fazendo com que esses dois anos fossem muito mais agradáveis.

Ao Dr. Carlos Ueira e Dr. Luiz Ricardo Goulart por terem colaborado em minhas preciosas reações de seqüenciamento.

À equipe do laboratório de vírus respiratórios e sarampo da Fiocruz/RJ, Dra. Marilda Siqueira, Fernando Motta, Paulo, Silvana, e Fátima por terem aberto a porta de seu laboratório e me ensinado a técnica da reação de seqüenciamento.

Ao Dr. Juan Arbiza e o mestre Santiago Mirazo da Universidad de La República/Uruguay, por terem me auxiliado no ponta pé inicial desde projeto e pelos controles da reação de PCR.

Aos colegas de mestrado, Jorge Carísio, Juliana Pena, Mariana Bodini, Mariana Manhani, Vanessa Ribeiro e Rafaela Carolina pela força e companheirismo nos inúmeros seminários.

Aos professores do PPIPA que contribuíram bastante para o meu crescimento.

Aos laboratórios de Biologia Molecular e de Fisiologia do ICBIM e de Genética do INGEB pelos equipamentos e espaços físicos cedidos, sem os quais não seria possível realizar este trabalho.

Aos professores Dra. Janethe Deolina de Oliveira Pena, Dra. Denise Von Dolinger de Brito e Dra. Leonilda Stanziola Knychala, pelas valiosas sugestões durante a minha qualificação.

As secretárias do PPIPA Luceleide e Lucélia, pela gentileza, atenção e colaboração, disponibilizadas durante esse período.

Aos membros da banca examinadora: Dr. Fernando Motta (Fiocruz/RJ) e Dra. Leonilda Stanziola Knychala (UFU-Uberlândia), por aceitarem com presteza, nosso convite para participar da concretização deste trabalho.

E a todos os outros que aqui não foram citados, mas que com certeza serei eternamente grato.

**Lista de abreviaturas, siglas e símbolos:**

hMPV - human metapneumovirus (metapneumovírus humano)

nm - nanômetro

RNA - ácido ribonucléico

VRS - vírus respiratório sincicial

aMPV - avian metapneumovirus (metapneumovírus aviário)

IRA - infecção respiratória aguda

ITRI - infecção do trato respiratório inferior

ITRS - infecção do trato respiratório superior

SARS - severe acute respiratory syndrome (síndrome respiratória aguda grave)

IFI - imunofluorescência indireta

RT-PCR - “reverse transcription of polymerase chain reaction” (transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase)

ANF - nasofaringe

HC - Hospital de Clínicas

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

Mabs - “monoclonal antibodies” (anticorpos monoclonais)

cDNA - ácido desoxirribonucléico complementar



TBE - Tris-borate-EDTA

ECP - efeito citopátogênico

TAE - Tris-acetate-EDTA

DNA - ácido desoxirribonucléico

ng - nanogramas

MG - Minas Gerais

## SUMÁRIO

Resumo .....	1
Abstract.....	2
1. Introdução.....	3
2. Objetivos .....	10
3. Material e Métodos.....	11
3.1. Antecedentes .....	11
3.2. O metapneumovírus humano utilizado como controle das reações.....	13
3.3. Extração dos ácidos nucleicos .....	13
3.4. Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA.....	14
3.5. Reação de RT-PCR para detecção dos rinovírus humanos.....	15
3.6. Reação de PCR para detecção do hMPV .....	15
3.7. Nested PCR.....	16
3.8. Reação de purificação .....	17
3.9. Reação de seqüenciamento .....	17
3.10. Análise filogenética.....	18
3.11. Isolamento viral.....	18
4. Resultados .....	20
5. Discussão.....	25
6. Conclusões .....	28
7. Referências bibliográficas .....	29
Anexo A.....	36
Anexo B.....	37
Anexo C.....	38

## **Resumo**

O metapneumovírus humano (hMPV) é um importante patógeno do trato respiratório que foi descrito inicialmente na Holanda em 2001 e desde então em todos os continentes. O principal objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os hMPV em amostras coletadas de crianças menores de cinco anos de idade que apresentavam doença respiratória aguda atendidas em um hospital público de Uberlândia, MG. Num total de 114 amostras de aspirado de nasofaringe que apresentaram resultado negativo ou inconclusivo para nove outros vírus respiratórios investigou-se pela transcrição reversa associado a reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) a presença do RNA do vírus. Os produtos obtidos da PCR foram seqüenciados e comparados com seqüências depositadas no GenBank. Um percentual de 12,3% (14/114) das amostras apresentaram resultado positivo para o RNA do hMPV, e foi possível obter seqüência de oito delas, sendo possível também identificar os quatro subtipos do vírus. A média de idade das crianças infectadas por esse vírus foi de 21 meses, com envolvimento principalmente do trato respiratório superior. O hMPV foi detectado em amostras coletadas de março a novembro, meses que correspondem ao final do verão e início da primavera no Brasil. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo a descrever a circulação dos quatro subtipos do metapneumovírus no Brasil e também na América do Sul.

**Abstract**

The human metapneumovirus (hMPV) is a pathogen of the respiratory tract first identified in The Netherlands in 2001 and since then has already been detected in all continents. The purpose of this study was to identify and characterize hMPV in samples collected from children <5 years presenting acute respiratory disease seen at a public hospital in Uberlândia, in Southeast Brazil. One hundred fourteen nasopharyngeal aspirates samples that were negative for nine other respiratory viruses were tested by RT-PCR to the presence of hMPV RNA. PCR products obtained by the amplification reaction of the N hMPV gene, were sequenced and compared with sequences deposited in GenBank. Fourteen out of 114 (12.3%) samples were positive for presence of hMPV RNA; sequences from eight samples were obtained and all four subtypes were identified, including the novel sublineages A2a and A2b; mean age was 21 months old; upper respiratory tract infection was the most common clinical symptom; the virus was detected in samples collected from March to November, a period that corresponds to late summer to mid-spring in Brazil. As far as is known, this is the first study to describe the circulation of the four subtypes of hMPV in Brazil

## 1. Introdução

O metapneumovírus humano (hMPV) é um importante agente de infecções respiratórias e, apesar de sua identificação ter ocorrido em 2001, acredita-se que o vírus venha circulando entre humanos há pelo menos 50 anos, sendo que a demora em sua identificação pode ser devido a deficiências em técnicas de diagnóstico (VAN DEN HOOGEN et al., 2001). Atualmente o vírus já foi reportado em todos os continentes (HAMELIN et al. 2004, CROWE, 2004).

Através da técnica de microscopia eletrônica foi demonstrado que as partículas de hMPV são pleomórficas (Figura 1), com um diâmetro que varia de 150-600 nm e possuem projeções do envelope que em média possuem 15 nm de comprimento. Além disto, foi determinado que o nucleocapsídeo do vírus possui um diâmetro médio de 17 nm.

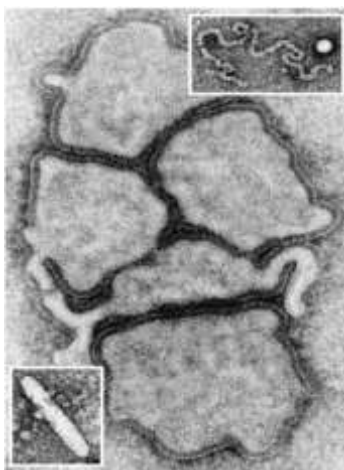


Figura 1. Ultramicrografia do metapneumovírus humano. No centro – cinco partículas pleomórficas do vírus; Superior – nucleocapsídeo; Inferior – partícula filamentosa. Fonte: Dr. Charles Humphrey (Peret et al., 2002).

O hMPV tem ácido nucléico do tipo RNA de fita simples, polaridade negativa e foi classificado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) dentro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Metapneumovirus*

(DOMACHOWSKE et al., 2003). Essa classificação se deve em parte, devido à similaridade filogenética (Figura 2) desse agente com outros paramyxovírus, especificamente com o vírus respiratório sincicial (VRS), e também pelo percentual de homologia na seqüência de aminoácidos entre o hMPV e o metapneumovírus aviário (aMPV) (VAN DEN HOOGEN et al., 2002).

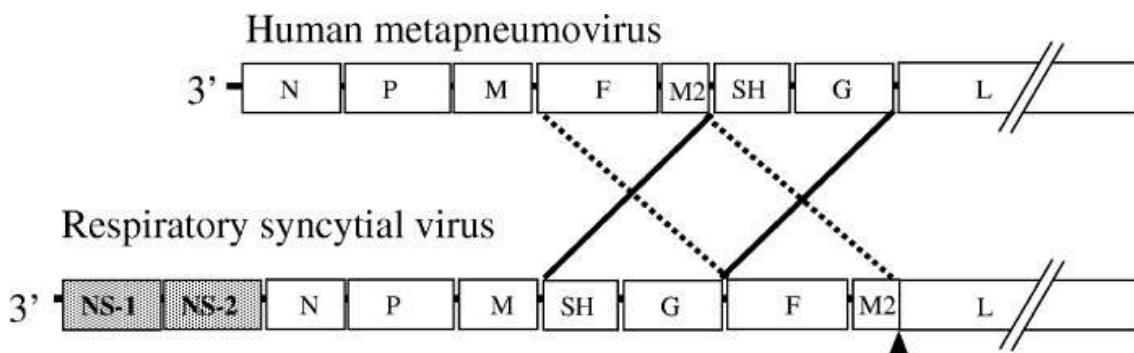


Figura 2. Arranjo genômico (Kahn et al., 2006) do hMPV (acima) e do VRS (abaixo). VRS é o vírus humano mais análogo ao hMPV como pode ser evidenciado por sua similaridade genética. As únicas diferenças são os arranjos dos genes e a presença de dois genes não estruturais (NS1 e NS2) no VRS.

A similaridade filogenética do hMPV com o VRS, reflete em padrões semelhantes de distribuição sazonal e de sintomatologia nosológica entre esses dois agentes (OSTERHAUS e FOUCHIER, 2003; XEPAPADAKI et al., 2004; BACH et al., 2004).

Análises filogenéticas confirmaram a existência de dois subgrupos do hMPV - A e B - sendo que cada um possui dois subtipos denominados A1, A2 e B1, B2, respectivamente (VAN DEN HOOGEN et al., 2004). Além disto, estudos recentes vêm sugerindo a existência de um novo subtipo pertencente ao subgrupo A (HUCK et al., 2006). A identidade entre seqüências de um mesmo subgrupo é de 77-95% e entre cada linhagem de 59-87% sendo que os genes N, F, L e M são os mais conservados e os genes G e SH os mais variáveis. (BIACHESI et al, 2003).

Tem sido sugerida uma diversidade clínico epidemiológica entre os subgrupos, sendo o A indicado como o mais virulento (VICENTE et al., 2006). Estudos recentes demonstram que ocorre predominância de um dos subgrupos durante os surtos epidêmicos. Entretanto, essa predominância pode se inverter de ano para ano, como ocorre com o VRS e com outros vírus (AGAPOV et al., 2006).

Os hMPV já foram identificados em amostras de pacientes com idades que variam de 2 meses a 87 anos de idade, apesar de que crianças aparentam ser a faixa etária mais afetada (PERET et al., 2002). Estudos retrospectivos demonstraram que os hMPV são responsáveis por 4,5-17,0% das infecções respiratórias agudas (IRAs) em crianças, fazendo com que este vírus seja o segundo mais prevalente nessa faixa etária, atrás somente do VRS (CUEVAS et al, 2003; EBIHARA et al., 2004; BOIVIN et al., 2002; FALSEY et al., 2003). Adicionalmente, de 1,2% a 4,1% dos indivíduos infectados são assintomáticos, indicando a possibilidade de infecções inaparentes (Kahn, 2006).

Estudos têm demonstrado que o hMPV é responsável por uma porcentagem substancial dos casos de infecção do trato respiratório inferior (ITRI) em lactentes e crianças menores de cinco anos de idade e a segunda principal causa de bronquiolite na primeira infância. Aproximadamente 10% das ITRI que requerem internações estão relacionadas ao hMPV (BOIVIN et al., 2003). Além disto, este vírus também tem sido relacionado com aproximadamente 1,0 a 5,0% dos casos de infecção do trato respiratório superior (ITRS), sendo a otite média aguda um dos sintomas clínicos mais evidentes. Como outros *Paramyxovirus*, re-infecções tem sido reportadas tanto em hospedeiros imunocompetentes quanto imunosuprimidos (VAN DEN HOOGEN et al., 2003).

Estudos de soroprevalência do hMPV demonstraram que entre nove e 18 meses de idade, metade das crianças sem doença respiratória aparente, eram soropositivas para o hMPV (MIRAZO et al., 2005). Acredita-se que até os cinco anos de idade praticamente 100% das crianças já tenham sido infectadas por este vírus. Ainda, os maiores títulos de anticorpos foram identificados em crianças de um a dois anos de idade indicando que a infecção pelo vírus ocorre principalmente nesta faixa etária (MIRAZO et al., 2005). A soroprevalência em crianças menores de três meses de idade indica que anticorpos maternos estão presentes nesses indivíduos. Entretanto, não se sabe se esses anticorpos maternos contra o hMPV protegem contra infecções ou amenizam a gravidade da doença (LEUNG et al., 2005).

Alguns estudos reportaram taxas de co-infecções de aproximadamente 10% entre o hMPV e o VRS, possivelmente devido à similaridade de ocorrência sazonal entre estes vírus (WILLIAMS et al., 2005; GERNA et al., 2005; WOLF et al., 2006). Greensill et al., (2003), reportaram que 70% das crianças infectadas pelo VRS que necessitaram tratamento intensivo, apresentavam co-infecção com hMPV, sugerindo que dupla infecções por VRS e hMPV poderiam agravar o estado clínico do paciente, particularmente em crianças previamente saudáveis. Em outro estudo no Reino Unido, co-infecções por estes vírus proporcionaram um aumento no risco de admissão na unidade de terapia intensiva pediátrica (SEMPLE et al. 2005). Em 2002, uma nova doença respiratória, denominada de síndrome respiratória aguda grave (severe acute respiratory syndrome -SARS) (KSI AZEK et al., 2003) emergiu no sudeste asiático sendo atribuída a um novo coronavírus. Porém, em algumas regiões da China e do Canadá, muitos indivíduos com SARS também estavam infectados pelo hMPV (CHAN et al., 2003). Entretanto segundo esses mesmos autores isto não foi observado em outros países e,



portanto, ainda não está claro, se a co-infecção resultou em uma maior gravidade da doença. Assim a significância desta infecção dupla ainda é desconhecida.

No hemisfério norte, a maioria das infecções por hMPV acontece nos meses finais do inverno e início da primavera, sendo que a maior parte ocorre entre fevereiro e março - aproximadamente dois meses após à circulação de outros vírus como o VRS e os influenzavírus (WILLIAMS et al., 2005).

Na América do Sul, esse vírus já foi identificado no Chile (LUCHSINGER et al., 2005), no Peru (GRAY et al., 2006), Uruguai (MIRAZO et al., 2005) e Brasil (CUEVAS et al., 2003), sendo que no Brasil o hMPV foi reportado nas regiões sul e nordeste, não havendo ainda dados a respeito de sua circulação nas demais regiões. Além disto, essa circulação do vírus aqui tem se mostrado relativamente diferente em relação ao hemisfério norte (WILLIAMS et al., 2005), predominando do outono até o inverno (DEBUR et al., 2007).

Os hMPV passaram despercebidos por vários anos possivelmente por apresentarem cinética de replicação bastante lenta *in vitro*, não replicarem eficientemente em várias linhagens contínuas celulares e requerem tripsina para seu crescimento (VAN DEN HOOGEN et al., 2001). Esse vírus pode ser melhor cultivado em linhagem contínua proveniente de rim de macaco rhesus (LLC-MK2) (VAN DEN HOOGEN et al., 2001; BOIVIN et al., 2002; SKIADOPOULOS et al., 2004; DEFFRASNES et al., 2005). Alguns estudos também demonstraram replicação em células HEp-2 e VERO, entretanto o vírus não se propaga células A-549, RD, 293, HT-29 e MDCK (BOIVIN et al., 2002). Apesar dos hMPV serem capazes de infectar células LLC-MK2, efeitos citopáticos podem não ser visualizados antes de 17 dias pós-infecção, em média (BOIVIN et al., 2002). Isso faz com que o vírus não seja identificado em um tempo apropriado para otimizar o tratamento do paciente.

Análise da seqüência genômica dos hMPV (VAN DEN HOOGEN et al., 2002) tem propiciado avanços, não apenas em termos taxonômicos, mas também no que diz respeito aos métodos de diagnóstico, que podem ser aplicados para detecção desse agente, como a transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (MACKAY et al., 2003). Essa técnica vem substituindo o isolamento em cultura de células e outros métodos retrospectivos, como a análise sorológica para investigar a causa de doenças virais em humanos (FALSEY et al., 2006). Os genes da nucleoproteína (N) e da polimerase (P) têm sido utilizados mais freqüentemente como alvos de amplificação da RT-PCR, devido à sua natureza conservada entre as linhagens do hMPV (MACKAY et al., 2003). Adicionalmente, alguns estudos confirmaram ser possível detectar até uma porção mínima de cinco a 10 cópias do RNA viral desses vírus (MAERTZDORF, 2004).

Não existe um tratamento específico disponível para os hMPV. A ribavirina e imunoglobulinas comumente administrada intravenosamente apresentaram atividade antiviral e *in vitro*. De acordo com Lanciotti et al. (2001) ambos os tratamentos são extremamente caros, além disto a ribavirina é um agente teratogênico e as imunoglobulinas podem interferir em vacinas que utilizaram vírus vivos (MMR e Varicela). A molécula NMSO3 possui uma atividade viral contra o VRS e também foi demonstrado que inibe a infecção dos hMPV *in vitro*, entretanto essa atividade não pode ser demonstrada para outros paramyxovirus, como os parainfluenzavírus (PIV) e vírus do sarampo. Esse agente molecular diminui a formação de sincícios e interfere na infecção (WU et al., 2001). Vacinas não estão comercialmente disponíveis.

O hMPV tem um grande significado para a saúde pública, pois infecta crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos, com envolvimento do trato respiratório inferior causando bronquiolite em parte dos casos. Além disso, casos fatais

foram reportados no qual o hMPV foi o único patógeno isolado em tecido pulmonar, coletado *post mortem* (BOIVIN et al, 2002). Apesar desse vírus ser considerado uma importante causa de infecções do trato respiratório superior e inferior, muitos aspectos a respeito da infecção ainda precisam ser esclarecidos - em particular, a gravidade dessas infecções pelo (BOIVIN et al., 2002; HAMELIN et al., 2004; WILLIAMS et al., 2004; VAN DEN HOOGEN et al., 2004). Além disso, devido a sua recente descrição, pouco é sabido sobre sua epidemiologia.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo detectar o hMPV em secreções de nasofaringe, obtidas de crianças no período de 2001 a 2007, previamente testadas por imunofluorescência indireta (IFI) e transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para nove outros vírus respiratórios. As amostras de hMPV identificadas foram seqüenciadas e analisadas filogeneticamente.

## 2. Objetivos

1. Detectar o hMPV em secreções de nasofaringe, obtidas de crianças no período de 2001 a 2007, previamente testadas por imunofluorescência indireta (IFI) e transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para nove outros vírus respiratórios.
2. Seqüenciar e caracterizar filogeneticamente as amostras positivas de metapneumovírus humano.
3. Determinar os subtipos circulantes do metapneumovírus humanos na cidade de Uberlândia e região.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Antecedentes

No período de 2001 a 2007, 497 amostras de aspirado de nasofaringe (ANF) de crianças menores de cinco anos de idade, com doença respiratória aguda e duração máxima de cinco dias, foram coletadas mediante consentimento prévio dos pais ou responsáveis (Anexo A), no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG. Essas amostras foram processadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas conforme descrito por Oliveira et al. (2008) e investigadas quanto a presença de nove vírus respiratórios.

O espécime foi obtido após instilação de 1 mL de soro fisiológico estéril (0,9%) em cada narina da criança, seguida de aspiração por um sistema de sucção a vácuo conectado a um cateter, conforme previamente descrito (VIEIRA et al., 2001). Dados dos pacientes, tais como idade, gênero e sintomas clínicos foram obtidos no momento da coleta (Anexo B). Essa coleta recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU, protocolado sob o número 250/2005 (Anexo C).

Em um período máximo de quatro horas o espécime clínico foi processado, conforme previamente descrito (QUEIRÓZ et al, 2002) e a amostra foi dividida em quatro alíquotas, sendo: (i) uma para a realização da imunofluorescência indireta (IFI); (ii) duas *in natura*, armazenadas em nitrogênio líquido e freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ , para a extração de ácidos nucleicos e estudos futuros e; (iii) a última foi combinada numa concentração de 1:2 com meio de congelamento para posterior inoculação em cultura de células.

O espécime clínico da alíquota (i) foi então tratado com uma mistura de anticorpos monoclonais (MAbs) anti-vírus respiratórios do *Respiratory Panel I Viral Screening and Identification Kit* (Chemicon International, Inc., Temecula, CA),

conforme instruções do fabricante, para detecção do vírus respiratório sincicial (VRS), influenzavírus (FLU) A e B, parainfluenzavírus (PIV) 1, 2 e 3 e adenovírus (AdV). As amostras com resultados positivos para o VRS foram subgrupadas em A ou B, mediante a utilização de monoclonais específicos (Chemicon).

As amostras negativas e inconclusivas pela reação de IFI foram submetidas à transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), para a pesquisa de rinovírus, mediante a utilização de *primers* descritos por Arruda & Hayden (1993) – gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Eurico Arruda Neto, da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP.

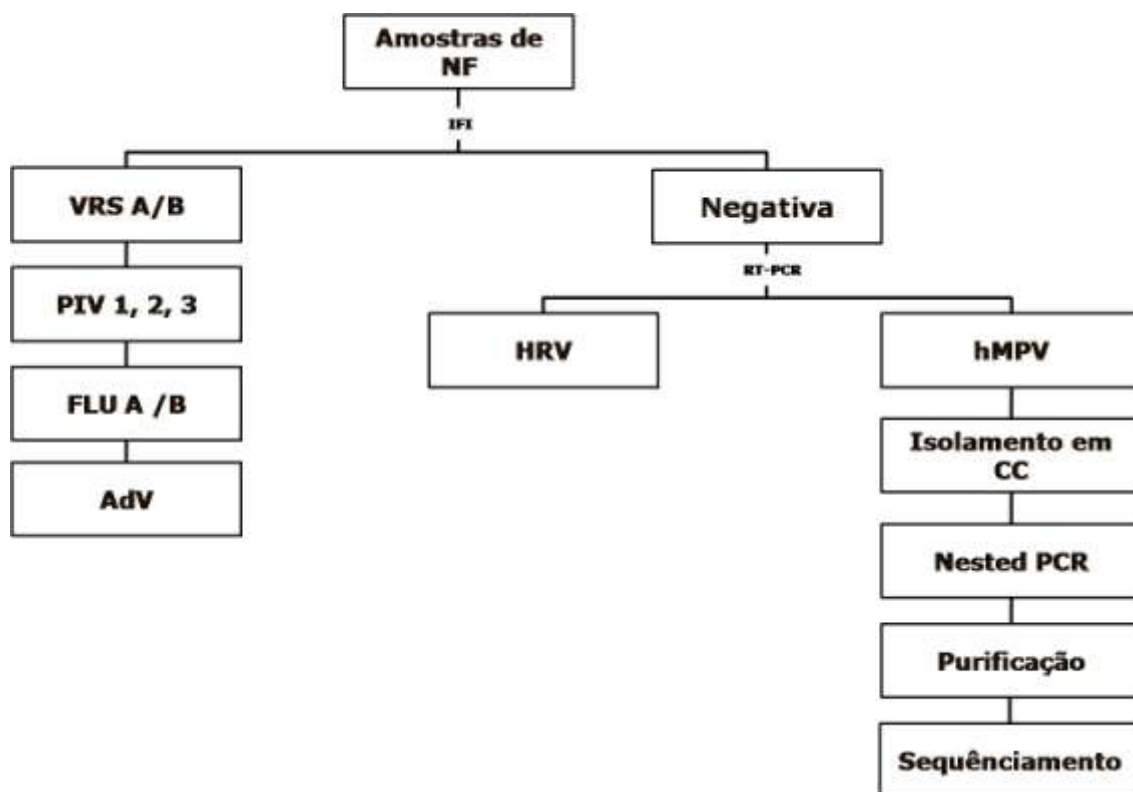


Figura 3. Fluxograma da investigação. IFI – imunofluorescência indireta; RT-PCR – transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase; VRS – vírus respiratório sincicial; PIV – parainfluenzavírus; FLU – influenzavírus; AdV – adenovírus; HRV – rinovírus humano; hMPV – metapneumovírus humano.

As 114 amostras negativas ou inconclusivas para os nove vírus acima referidos foram submetidas à RT-PCR para a investigar a presença do RNA do metapneumovírus humano (hMPV).

### **3.2. O metapneumovírus humano utilizado como controle das reações**

O controle das reações de RT-PCR foi gentilmente doado pelo Dr. Juan Arbiza da Universidad de La República (Montevideu/Uruguai). Após o recebimento no Laboratório de Virologia/UFU, a amostra referida como hMPV cepa ARG-3-02, (número de acesso: DQ362951) foi inoculada em uma monocamada semi-confluyente da linhagem celular contínua, LLC-MK2 proveniente de rim de macaco da espécie *Macaca mulatta*, conforme adiante descrito. Após o surgimento dos primeiros efeitos citopatogênicos, o sobrenadante e lisado celular foram colhidos e estocados em nitrogênio líquido, até o uso.

### **3.3. Extração dos ácidos nucléicos**

A extração do ácido nucléico viral tanto do isolado controle como das amostras clínicas foi realizada pelo método Trizol® (Gibco, BRL), seguindo as instruções do fabricante.

Em um tubo tipo *ependorf* contendo 750 µl de Trizol adicionou-se 250 µl da amostra clínica, sendo esta mistura vigorosamente agitada e incubada por cinco minutos em temperatura ambiente, para lisar células e vírus. Após a incubação, acrescentou-se 200 µl de clorofórmio e imediatamente foi realizada uma centrifugação à 12000xg em 4°C por 15 minutos. Ao fim da centrifugação foi observado a formação de duas fases, a superior de coloração transparente, fase orgânica, contendo ácido nucléico do tipo RNA

e a inferior de coloração rósea, denominada fase aquosa composta basicamente de DNA. A fase superior foi então cuidadosamente separada e transferida para outro tubo do tipo *ependorf*.

Ao tubo contendo RNA foram adicionados 800 µl de isopropanol e 1,5 µl de glicogênio, sendo a mistura homogeneizada por inversão e incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, o tubo foi centrifugado à 12000 xg, 4°C por 10 minutos. Posteriormente, o sedimento foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75%, sendo que ao final da segunda lavagem o etanol foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 20 µl de água DEPC e 0,5 µl de inibidor de RNAses. Sempre que possível o RNA foi imediatamente transcrito em cDNA, quando não, o mesmo foi armazenado à -80°C.

### **3.4. Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA**

Para utilização do RNA na reação de PCR o mesmo foi transformado em DNA complementar (cDNA). Cinco microlitros do RNA total extraído foram incubados com 1 µl de dNTPs (10mM) e 10 pmol do *primer* N1, por 5 minutos à 65°C. Essa mistura foi adicionada a uma segunda, contendo 4 µl de buffer 5x *first strand* (Invitrogen), 2 µl de 0,1M DTT (Invitrogen), 5U de inibidor de ribonuclease (Promega, Madison, WI) e água DEPC - até completar o volume final de 19 µl - seguida de uma incubação por 2 minutos à 37°C. Posteriormente, adicionou-se 200U de *Superscript II – Reverse transcriptase*® (Invitrogen) e o tubo foi incubado por 50 minutos à 42°C e por fim a enzima foi inativada em 70°C por 5 minutos.



### 3.5. Reação de RT-PCR para detecção dos rinovírus humanos

Para a reação de detecção do RNA dos rinovírus humano foram utilizados quatro *primers* (Arruda & Hayden 1993). Inicialmente o RNA extraído foi reversamente transcrito em cDNA utilizando-se *primers* inespecíficos. Posteriormente, 5 µl do cDNA foi misturado com *primer* 1 (5' – GCACTTCTGTTTCCCC) e o *primer* 2 (5'CGGACACCCAAAGTAG) e ainda 10mM de dNTPs, 5 µl de 10X PCR *buffer* Mg<sup>-</sup> (Invitrogen), 50mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 1.25U de Taq Polimerase (Invitrogen) e 20 µl de água DEPC (Gibco). Os produtos da primeira reação foram diluídos na proporção 1:100, misturados ao *primer* 3 (5'AGCCTGCGTGGCTGCC) e *primer* 4 (5'GCATTCAGGGGCCGAG) e adicionados aos mesmos reagentes da reação anterior. As condições do termociclador utilizados em ambas as reações foram as seguintes: desnaturação inicial à 95°C/3' e 95°C/1' 48°C/90" 72°C/1' por 30 ciclos seguida de uma extensão final em 72°C/7'. Os tamanhos de banda esperados eram de 390 nt para a primeira reação de PCR e 110 nt no segundo ensaio.

### 3.6. Reação de PCR para detecção do hMPV

Cinco microlitros do cDNA foram amplificados através da PCR, tendo a mistura os seguintes reagentes: 10mM de dNTPs, 5 µl de 10X PCR *buffer* Mg<sup>-</sup> (Invitrogen), 50mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol dos *primers* N2 e N3, 1.25U de Taq Polimerase (Invitrogen) e 20 µl de água DEPC (Gibco). As condições utilizadas no termociclador foram às seguintes: uma desnaturação inicial à 94°C/3' e 94°C/45" 50°C/30" 72°C/30" por 50 ciclos seguida de uma extensão final em 72°C/10'. O tamanho esperado do produto da PCR foi de 928 pares de base.

Quadro 1. *Primers* utilizados na reação de PCR, nested PCR e seqüenciamento

Nome	Seqüência	Posição	Gene	Tamanho	Referência
N2	5'-GAGTCTCAGTACACAATAA-3'	97	N	928nt	Coté et al, 2003
N3	5'-GCATTTCCGAGAACAACAC-3'	1025			
S1	5'-ACGGGGTAGAGAAGAGCTGG-3'	389	N	616nt	Samransamruajkit, et al, 2006
S2	5'-GCAAAGTTGGGACAGTTGGC-3'	1004			

Para a visualização dos produtos da amplificação foi aplicado 10 µl de cada amostra em um gel de agarose 1,5%, diluído em tampão tris-borato-EDTA (TBE) e submetido a uma tensão de 100 volts para a realização da eletroforese. Após 40 minutos, o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídeo por 10 minutos e digitalizado através do equipamento ImageMaster®VDS (GE Healthcare).

### 3.7. Nested PCR

Os produtos da primeira PCR foram diluídos na proporção de 1:10 em água milli-Q e submetidos à uma nova reação utilizando-se *primers* internos (Samransamruajkit et al., 2006) para amplificar um fragmento de 616nt (Quadro 1) e, os mesmos reagentes e concentrações da primeira amplificação. As condições utilizadas no termociclador foram às seguintes: 95°C/2' e 95°C/1', 48°C/1', 72°C/1' por 35 ciclos, seguido por extensão final à 72°C por cinco minutos.

Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1,5%, nas mesmas condições da reação anterior.

### 3.8. Reação de purificação

Os produtos que tiveram um resultado positivo pela *nested* PCR foram purificados, utilizando-se de um kit denominado *Invisorb Spin DNA Extraction Kit* (Invitek, GmbH, Alemanha).

Primeiramente 40 µl dos produtos da reação de *nested* PCR foram inseridos em um gel de agarose a 2%, diluído em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) e submetidos a uma corrente de 50 volts foi aplicada para a realização da eletroforese. Após 90 minutos de corrida o gel foi imerso em uma solução de brometo de etídeo por 15 minutos e visualizado em um transiluminador ImageMaster®VDS (GE Healthcare). Com o auxílio de um bisturi de número 11, o fragmento de 616nt foi cortado e transferido para um tubo do tipo *ependorf*.

Posteriormente adicionou-se 1 mL do tampão “Gel Solubilizer S” e a mistura foi aquecida à 50°C por cinco minutos, até a dissolução total do gel. Após este processo, 500 µl do tampão de ligação foi adicionado ao tubo e seu conteúdo transferido para uma coluna de sílica e centrifugado à 10000 xg por um minuto. Em seguida a coluna foi lavada duas vezes com o tampão de lavagem e centrifugada por quatro minutos à 14000 xg. Após, foi adicionado 30 µl do tampão de eluição à coluna, seguida de incubação por 10 minutos e de uma centrifugação à 8000xg por um minuto. Ao fim do processo de purificação foi feita uma eletroforese do produto, para confirmação de sua pureza.

### 3.9. Reação de seqüenciamento

Os produtos purificados foram quantificados utilizando-se um espectrofotômetro de massa, calibrado para o comprimento de onda de 560 nm (DNA de fita dupla). Para a realização da reação de sequenciamento, aproximadamente 60 ng de cada amostra foram transferidos para uma placa contendo os mesmos dois *primers* utilizados na

nested PCR, numa concentração de 5pmol, acrescidos de 8 µl do DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare. Piscataway, NJ) e água milli-Q, até completar o volume de 20 µl. Esta reação foi feita em um termociclador utilizando as seguintes condições: 25 ciclos de 95°C/20”, 50°C/15” e 60°C/1’. Para uma segunda purificação adicionou-se aos produtos da reação 2 µl de acetato de amônia 7,5M e 60 µl de etanol 95,0% e a placa foi centrifugada por 30 minutos à 2500 xg. O sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com etanol a 70%. Esses produtos foram secados à temperatura ambiente e ressuspensos com 10 µl de MegaBACE *loading solution* (GE Healthcare. Piscataway, NJ). A leitura da reação de seqüenciamento foi feita em um seqüenciador MegaBace 1000 ® (GE Healthcare. Piscataway, NJ).

### **3.10. Análise filogenética**

Considerando a utilização de dois primers no sequenciamento obteve-se duas fitas de DNA das amostras estudadas – sense e anti-sense. A partir daí, com o auxílio do *software* Mega 4.0 (Kumar et al., 1994) fez-se o alinhamento das duas fitas e assim foi determinada a seqüência consenso de cada amostra. Com o auxílio do *software* BLAST, as fitas consenso dos hMPV de Uberlândia foram comparadas com outras seqüências-padrão, depositadas no GenBank. Com isto, através da utilização do algoritmo “neighbour-joining”, o modelo “Kimura-2-parameter” e a análise estatística “bootstrap 500x” foi possível construir uma árvore filogénica inserindo as amostras dos vírus que circularam na região de Uberlândia, MG.

### **3.11. Isolamento viral**

Com o intuito de amplificar o número de partículas virais e conseqüentemente aumentar a concentração dos produtos da PCR e melhorar a qualidade das reações de

seqüenciamento foi implantado o isolamento em cultura de células da linhagem LLC-MK2.

Um volume de 200µL de cada amostra de nasofaringe *in natura*, filtrada em membrana de nitrocelulose de 0,45µm de diâmetro (Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA) foi inoculado em monocamada de células semiconfluentes, crescidas em garrafas de poliestireno de 25cm<sup>3</sup>. Após 1 hora de incubação, para a adsorção viral em estufa a , com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, acrescentou-se 5 mL de meio de inoculação (DMEM + Tripsina 0,1% + HEPES 1%) e as garrafas foram novamente incubadas nas condições acima descritas. Como controle negativo, foram adicionados 200 µL de meio de inoculação em outra garrafa e seguiu-se o mesmo protocolo para as amostras teste. Uma observação diária por até 21 dias ou até o aparecimento de efeito citopático (ECP) foi realizada e, subsequentemente, procedeu-se a RT-PCR para a confirmação do isolamento viral. Quando nenhum ECP foi visualizado em até 14 dias, adicionou-se mais 2 mL de meio de inoculação à garrafa e foi feita nova incubação, seguida de observação diária por mais 7 dias. Quando não foi constatado um efeito citopatogênico, realizou-se a RT-PCR para confirmar a falha no isolamento.

#### 4. Resultados

A partir das 114 amostras de nasofaringe coletadas de 2001-2007, que apresentaram resultado negativo ou inconclusivo para nove outros vírus respiratórios, foi possível detectar o RNA do metapneumovírus humano (hMPV), pela RT-PCR, em 13 amostras. A pesquisa desse vírus em 30 amostras positivas para o VRS, resultou na detecção de mais uma amostra de hMPV, totalizando 12,3% (14/114) de amostras identificadas. Se considerar o total de amostras coletadas no período do estudo esse percentual representa 2,8% (14/497) dos casos.

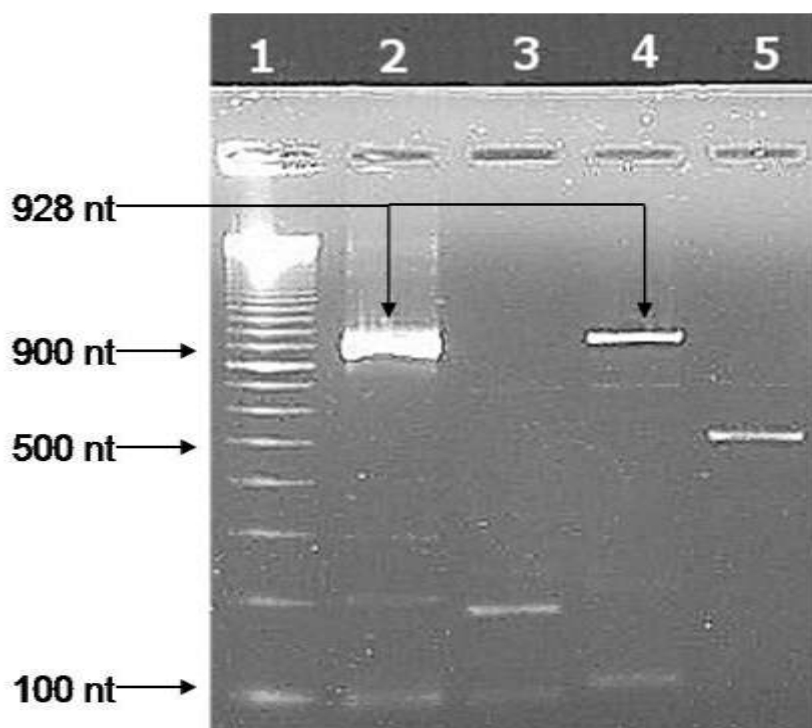


Figura 4. Produtos da reação de PCR para a detecção do hMPV. 1 – Marcador de peso molecular – 100bp; 2 – Controle positivo do hMPV; 3 e 5 - Amostra com resultado negativo; 4 – Amostra clínica com resultado positivo.

A quadro 2 mostra que referente ao gênero, 57,1% (8/14) das crianças infectadas pelo hMPV eram do sexo masculino, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significante. Infecções do trato respiratório superior foram mais frequentemente observadas, apesar de casos de bronquiolite, pneumonia, bronquite e asma terem sido

identificados. Em termos da faixa etária, a média das crianças infectadas por esse vírus em Uberlândia foi de 21 meses.

Quadro 2: Características das crianças infectadas pelo hMPV de acordo com a idade, gênero e sintomas.

Idade (meses)	N	hMPV (%)	Gênero		Sintomas	
			M	F	ITRS	ITRI
≤ 12	66	6 (42.6)	3	3	4	2
13 a 24	24	3 (21.5)	2	1	2	1
25 a 36	13	3 (21.5)	2	1	2	1
37 a 48	8	2 (14.4)	1	1	2	0
49 a 60	3	0 (0)	0	0	0	0
Total	114	14 (100)	8	6	10	4

N – Amostras testadas / ITRS – Infecção do trato respiratório superior / ITRI – Infecção do trato respiratório inferior

Em relação as 14 amostras identificadas, cinco delas foram coletadas no ano de 2003, quatro em 2002, três em 2004 e somente uma por ano nos anos 2005, 2006 e 2007. No ano de 2001, nenhuma foi identificada. Além disto, foi possível identificar que em Uberlândia os hMPV circularam durante todo o ano, com um pequeno pico nos meses do outono e do inverno.

Do total de 14 amostras do hMPV, 12 foram submetidas ao isolamento em cultura de células. Foi possível observar a formação de efeitos citopáticos em seis delas (Figura 4), após uma média de 16 dias, sendo que em todas, o isolamento foi confirmado pela RT-PCR. Dentre os seis espécimes que não apresentaram efeito citopático também, foi possível confirmar o isolamento em dois deles, totalizando assim oito amostras isoladas.

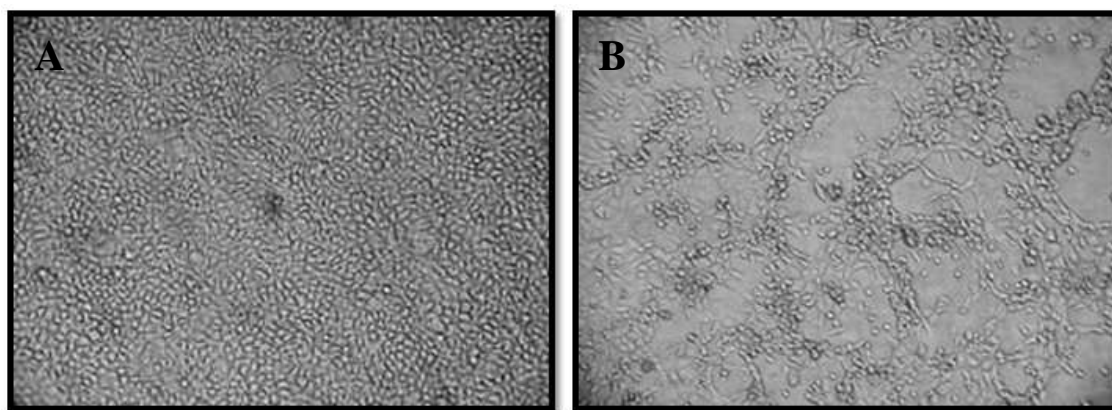


Figura 5. Linhagem celular LLC-MK2. A – Controle negativo, B – Amostra inoculada com o vírus – efeitos citopáticos.

A quantificação da reação de nested PCR dos isolados de hMPV demonstrou que foi possível obter aproximadamente 80 ng do fragmento de 616nt de cada amostra, o que possibilitou o seqüenciamento direto das oito amostras (Quadro 3).

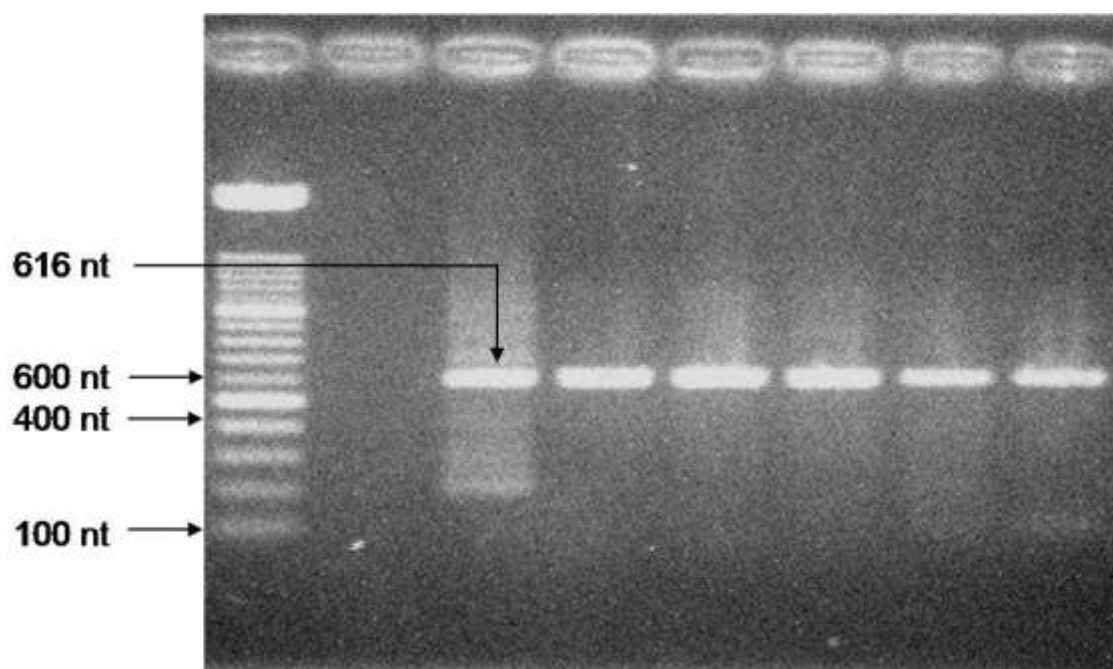


Figura 6. Produtos da reação de nested PCR 1 – Marcador de peso molecular – 100bp; 2 – H<sub>2</sub>O; 3 a 8 - Amostras clínica com resultado positivo. Produtos pós-purificação.



Quadro 3. Identificação e caracterização molecular das amostras de hMPV coletadas no período de 2001–2007.

Amostra	Data da coleta	Subtipo	Identidade	GenBank
1	19/03/2003	A1	99%	NED01-30 CAN99-81 JPS03-180
2	12/05/2003	A1	97%	NED01-30 CAN99-81 JPS03-180
3	22/05/2003	A2	97%	CAN97-83 NED01-17 CAN00-16
4	23/05/2003	A1	99%	NED01-30 CAN99-81 JPS03-180
5	22/03/2004	B1	99%	CS113 CAN00-13 BJ1816
6	23/03/2004	B2	99%	FIN01-10 BIR01-10 CAN97-82
7	03/04/2006	B2	99%	JPS03-194 FIN01-10 BIR01-10
8	27/04/2007	A2	98%	BJ1887 JPS03-240 NED01-22

Referente a árvore filogenética (Figura 5) construída utilizando-se de seqüências representativas de cada subtipo, obtidas no GenBank, observou-se que todos os quatro subtipos descritos dos hMPV circularam na região de Uberlândia, no período de 2001 a 2007. Além disto, as amostras deste estudo apresentaram alta similaridade (97-99%) com amostras que circularam em diferentes partes do mundo.

O subtipo A1 foi o mais frequente, sendo identificado em três (37,5% - 3/14) espécimes clínicos coletados em 2003, seguido pelo A2 e B2 (duas amostras cada, 25%) e B1 (uma amostra, 12,5%). Em termos do subtipo A2, foram identificadas duas amostras, uma em 2003 e a outra em 2007. Em relação ao subtipo B2, uma amostra foi detectada em 2004 e outra em 2006. O subtipo B1 foi identificado em 2004.

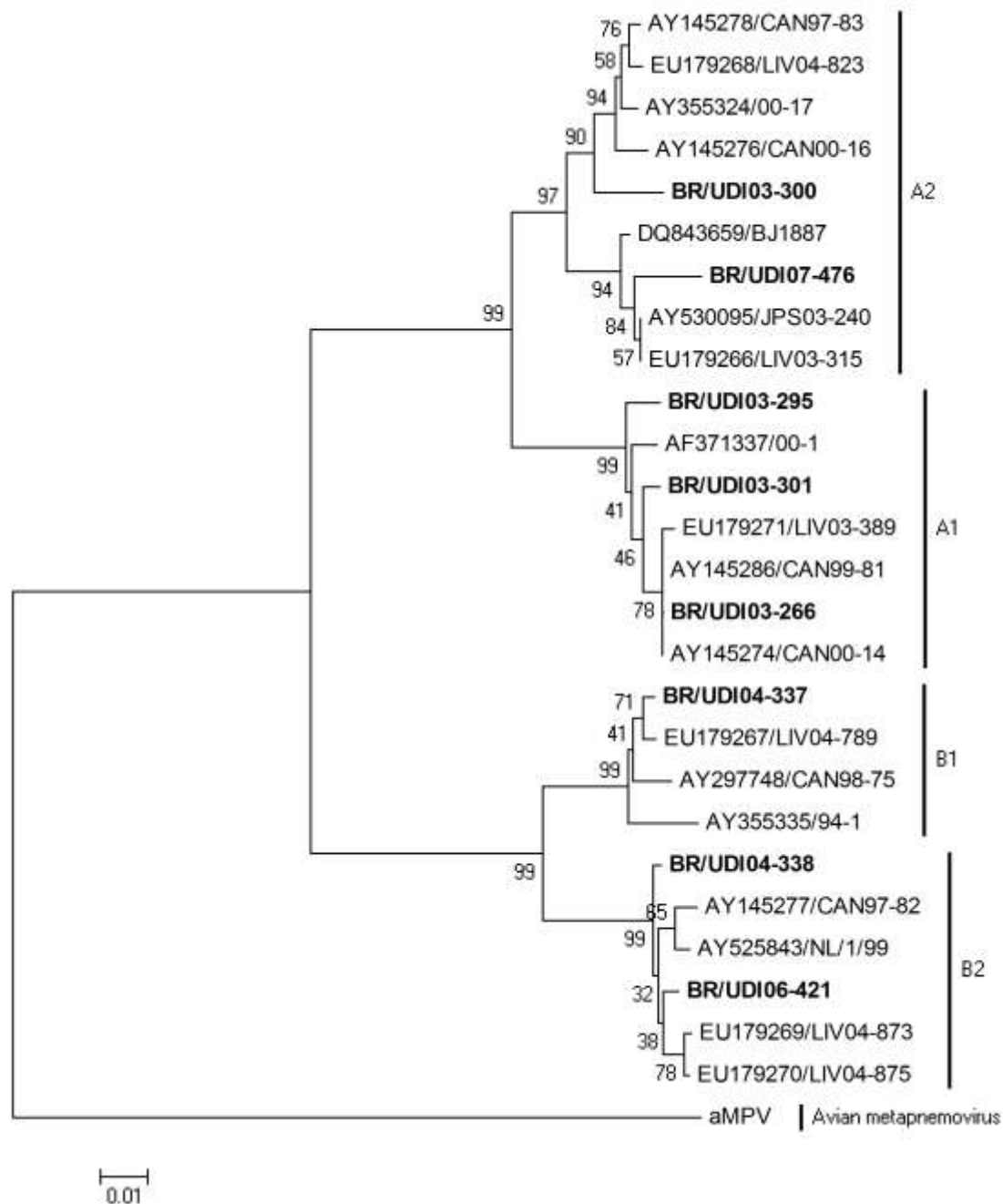


Figura 5. Árvore filogenética construída a partir de fragmentos de 616nt de extensão (posição dos nucleotídeos 404 à 1019) utilizando-se o algoritmo “neighbour-joining” e o modelo “Kimura-2-parameter”. Os quatro subtipos utilizados como referência são demonstrados pela identificação e os números de acesso dos isolados. O metapneumovírus aviário constitui um grupo externo (número de acesso DQ009484). Os valores de bootstrap (%) são indicados nas junções e as distâncias genéticas, por nucleotídeos, estão demonstrados na barra horizontal na parte de inferior. Os nomes das amostras de hMPV caracterizadas neste estudo estão iniciadas por BR/UDI (números de acesso: FJ554879-FJ554886)

## 5. Discussão

Neste estudo, os hMPV foram detectados pela RT-PCR em aproximadamente 2,8% dos casos de doença respiratória aguda, percentual semelhante aos encontrados na Argentina, Chile e Espanha (GALIANO et al., 2004; LUCHSINGER et al., 2005; VICENTE et al., 2003), onde os hMPV também foram detectados em amostras que apresentaram resultados negativos para a presença de outros vírus respiratórios. Por outro lado, três estudos desenvolvidos no Brasil com amostras clínicas, não testadas para outros vírus respiratórios, apresentaram resultado de 5,6-17,0% (DA SILVA et al., 2008; DEBUR et al., 2007; CUEVAS et al., 2003).

Chama a atenção o fato de que nenhuma amostra do hMPV ter sido identificada em 2001, apesar de 30,7% (35/114) das amostras investigadas terem sido coletadas neste ano. Na Argentina, Galiano et al. (2004) também não identificaram a circulação desse vírus em 2001 e no estudo de Debur et al. (2007) desenvolvido no Paraná a incidência dos hMPV em 2001 foi relativamente menor quando comparada aos outros anos do estudo. Estes resultados demonstram que a incidência dos hMPV podem variar consideravelmente de ano para ano, ao contrário de outros vírus que apresentam uma taxa de incidência anual bastante semelhante (COSTA et al., 2006, WILLIAMS et al., 2004)

A tentativa de isolamento dos hMPV em cultura de células para aumentar o número de partículas virais se mostrou um método pouco eficiente, já que apenas 66,6% (8/12) das amostras positivas pela RT-PCR puderam ser isoladas, sendo que metade delas (4/8) não causaram efeitos citopáticos. Boivin et al. (2002) também haviam reportado dificuldades no isolamento do hMPV. Essa dificuldade de isolamento acarretou na impossibilidade de seqüenciar mais amostras no estudo de Uberlândia.

De um modo geral, neste trabalho, o subtipo A foi predominante (63,0%) em relação ao B. Este fato está de acordo com Boivin et. al., (2004) que demonstraram que o subtipo A foi responsável por aproximadamente 70,0% dos casos de hMPV. Além disto, neste mesmo estudo, os autores sugerem que o subtipo B é mais comumente identificado em adultos.

A detecção dos hMPV, principalmente entre março e julho, coincide com os períodos de menor índice de umidade e de temperatura, no clima semi-tropical de Uberlândia. Isso já foi anteriormente observado para outros vírus respiratórios pelo nosso grupo (COSTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). Em outras regiões, alguns estudos demonstraram uma maior incidência nos meses finais do inverno ou primavera (DEBUR et al., 2007; THOMAZELLI et al., 2007; SLOOTS et. al., 2006; WILLIAMS et. al., 2005), sugerindo que os hMPV podem apresentar diferentes padrões sazonais.

A predominância da infecção pelos hMPV observada no gênero masculino está de acordo com outros trabalhos (BOIVIN et al., 2004; SAMRANSAMRUAJKIT, et. al., 2005) apesar dessa diferença não ter sido significativa. Em dois estudos sobre os VRS isso também foi observado (QUEIROZ, et al., 2002; OLIVEIRA, et al., 2008), sugerindo que os indivíduos do gênero feminino aparentam ser mais protegidos da infecção pelos vírus desta família.

A média de idade das crianças infectadas pelos hMPV em Uberlândia foi maior quando comparada com outros estudos, que analisaram amostras de crianças da mesma faixa etária (REGEV et al., 2006; THOMAZELLI et al., 2007). Williams et al. (2005), investigando somente casos de infecção do trato respiratório superior (ITRS) também encontraram resultados semelhantes, sugerindo uma possível correlação entre crianças mais velhas e ITRS por estes vírus. A maioria das amostras positivas para os hMPV de Uberlândia era de crianças apresentando quadro clínico de ITRS.

Apesar da descrição de frequências variando de 6,0% a 12,0% de co-infecções entre o VRS e os hMPV (WOLF et al, 2006; GERNA et al., 2005), dentre as 30 amostras positivas para o VRS, apenas uma foi positiva. Devido a este fato, não foi possível determinar a influência de co-infecções na sintomatologia do paciente. Não há um consenso em relação a isto, já que alguns estudos demonstram não haver um aumento na gravidade da doença (WOLF et al, 2006; GERNA et al., 2005), enquanto Semple et al. (2005) sugerem existir diferenças em relação aos sintomas.

Este é o primeiro estudo que reporta a circulação dos hMPV no estado de Minas Gerais e até onde se sabe é também o primeiro a detectar a presença dos quatro subtipos do vírus na América do Sul. O subtipo A1 foi descrito no estado do Paraná (DEBUR et al., 2007) e o subtipo B1 em São Paulo (DA SILVA et al., 2008). Apesar de o pequeno número de amostras positivas, nossos resultados parecem indicar uma mudança do genótipo A, que predominou em 2003, para o genótipo B - predominante em 2004. Essa mudança de genótipos em anos consecutivos, aparentemente é comum para este vírus (AGAPOV et al., 2006; GERNA et al., 2005) e também para outros vírus respiratórios como os VRS (OLIVEIRA et al., 2008) e os influenzavírus (Kuszevski, Brydak, 2000), constituindo possivelmente um mecanismo de evasão do sistema imune. Entretanto, mais estudos são necessários para a confirmação desta hipótese em nossa região.

Mais estudos também são necessários para se estabelecer a sazonalidade deste vírus no clima semi-tropical de Uberlândia. Além disto, a identificação da co-infecção dos hMPV com outros vírus respiratórios será necessária para investigar se há a possibilidade de uma maior gravidade da doença.

## 6. Conclusões

1. O RNA do metapneumovírus humano foi detectado pela RT-PCR em 12,3% (14/114) dos espécimes clínicos de crianças menores de cinco anos de idade, com doença respiratória aguda, que apresentaram resultados negativos ou inconclusivos para nove outros vírus respiratórios, no período de 2001-2007.
2. Os subtipos A1, A2, B1 e B2 do hMPV circularam em Uberlândia, MG no período de 2001-2007.
3. Em 30 amostras de secreção de nasofaringe de crianças infectadas pelo VRS, somente uma foi positiva pelo hMPV.
4. O subtipo A foi encontrado em cinco das oito amostras investigadas.

## 7. Referências bibliográficas

Agapov E, Sumino KC, Gaudreault-Keener M, Storch GA, Holtzman MJ. Genetic Variability of Human Metapneumovirus Infection: Evidence of a Shift in Viral Genotype without a Change in Illness. *J Infect Dis* 2006;**193**:396-403.

Arruda E, Hayden FG. Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR. *Mol Cell Probes*. 1993 Oct;**7**(5):373-9

Bach N, Cuvillon, D, Brouard J, Lafay F, Freymuth F, Legrand L, Guillois B, Duhamel JF. Acute respiratory tract infections due to a human metapneumovirus in children: descriptive study and comparison with respiratory syncytial virus infections. *Arch Pediatr*. 2004;**11**:212-5.

Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology*. 2003;**315**:1-9.

Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, Peret TCT, Erdman DD, Anderson LJ. 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*. 2002;**186**:1330-4.

Boivin G, De Serres G, Cote S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, Bergeron MG, Dery P. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis*. 2003;**9**:634-40.

Boivin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, et al. Global Genetic Diversity of Human Metapneumovirus Fusion Gene. *Emerg Infect Dis*. 2005;**10**:1154-7

Chan PKS, Tam JS, Lam CW, Chan E, Wu A, Li CK, et al. Human Metapneumovirus Detection in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *Emerg Infect Dis*. 2003;**9**:1058-62.

Cote S, Abed Y, Boivin G. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003;**41**(8):3631-5.

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, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;**101**:301-6.

Crowe MD. Human metapneumovirus as a major cause of human respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004;**23**:215-21.

Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RO, Grensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003;**12**:1626-8.

Da Silva LHA, Spilki FR, Riccetto AGL, De Almeida RS, Baracat, ECE, Arns CW. Variant isolates of human metapneumovirus subgroup B genotype 1 in Campinas, Brazil. *J Clin Virol* 2008;**42**: 78-81.

Debur MC, Bordignon J, Santos CND, Vidal LR, Nogueira MB, Almeida SM, et al. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol* 2007;**39**:59-62.

Deffrasnes C, Cote S, Boivin G. Analysis of Replication Kinetics of the Human Metapneumovirus in Different Cell Lines by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2005;**43**(1):488-90.

Domashowke JB. Human metapneumovirus: a newly described respiratory pathogen of humans. *Clin Microbiol Newslett.* 2003;**25**(3):17-20.

Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Ishiko H, Hara M, Takahashi Y, Kobayashi K. Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J Clin Microbiol.* 2004;**42**:126-32.



Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol*. 2006;**35**:46-50.

Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003;**5**:785-90.

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

Gerna, G., G. Campanini, F. Rovida, A. Sarasini, D. Lilleri, S. Paolucci, et al. Changing circulation rate of human metapneumovirus strains and types among hospitalized pediatric patients during three consecutive winter-spring seasons. Brief report. *Arch Virol* 2005;**150**:2365–75.

Gray GC, Capuano AW, Setterquist SF, Sánchez JL, Neville JS, Olson J, et al. Human metapneumovirus, Peru. *Emerg Infect Dis*. 2006;**12**:347-50.

Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis*. 2003;**9**:372–5.

Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Emerg Infect Dis* 2004;**38**: 983-90.

Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis*. 2006;**12**:147–50.

Kahn J. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbio*. 2006;**19**:546–57.

Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;**348**:47–58.

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci* 1994;**10**:189–91.

Kuszewski K, Brydak L. The epidemiology and history of influenza. *Biomed Pharmacother*. 2000 May;**54**(4):188-95

Lanciotti RS, Kerst AJ. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol*. 2001;**39**:4506-13.

Leung J, Esper F, Weibel C, Kahn JS. Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzymelinked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus. *J Clin Microbiol*. 2005;**43**:1213–9.

Luchsinger VF, Escobar CC, Avendaño LFC. Detection of human metapneumovirus in children hospitalized for acute lower respiratory infection in Santiago, Chile. *Rev Méd Chile* 2005;**133**:1059-64.

Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, Waller K, Syrnis MW, Whiley DM, Sierbert DJ, Nissen M, Sloots TP. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol*. 2003;**41**(1):100-5.

Maertzdorf J, Wang C, Brown J, Quinto J, Chu M, De Graaf M, et al. Real-Time reverse transcriptase PCR assay for detection of human Metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol*. 2004;**42**:981-6.

Mirazo S, Ruchansky D, Blanc A, Arbiza, J. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;**100**: 715-18.

Oliveira TFM, Freitas GRO, Ribeiro LZG, Yokosawa J, Siqueira MM, Portes SAR, et al. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;**103**:413-22.

Osterhaus A, Fouchier R. Human metapneumovirus in the community. *The Lancet*. 2003;**361**: 890-1.

Peret TCT, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus ADME, Erdman DD, Anderson LJ. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in north America. *J Infect Dis*. 2002;**185**:1660-3.

Queiroz DAO, Durigon EL, Botosso VF, Ejzember GB, Vieira SE, Mineo JR. Immune response to respiratory syncytial virus in young brazilian children. *Braz J Med Biol Res*. 2002;**35**(10):1183-93.

Regev L, Hindiyeh M, Shulman LM, Barak A, Levy V, Azar R, et al. Characterization of human metapneumovirus infections in Israel. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:1484-9.

Samransamruajkit R, Thanasugarn W, Prapphal N, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Human metapneumovirus in infants and young children in Thailand with lower respiratory tract infections; molecular characteristics and clinical presentations. *J Infect* 2006;**52**:254–63.

Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, Shears P, Smyth RL, Hart CA. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2005;**191**(3): 382-6.

Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JMI, Surman SR, Amaro-Carambot E. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol*. 2004;**78**:6927-37.

Sloots TP, Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Harnett GB, et al. Human metapneumovirus, Australia, 2001–2004. *Emerg Infect Dis* 2006;**12**:1263–6.

Thomazelli, LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DBL. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 2007;**83**:422-8.

Van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus DME, Fouchier RAM. Analysis of the Genomic Sequence of a Human Metapneumovirus. *Virology*. 2002;**295**:119-132.

Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier RAM, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;**7**:719–24.

Van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 2004;**10**:656–8.

Van den Hoogen BG, van Doornum GJJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WEP, De Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalised patients. *J Infect Dis* 2003;**188**:1571–7.

Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Trallero E. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:602–3.

Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. *Clin Infect Dis*. 2006;**42**(12):111-3.

Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DAO, Durigon EL, Trok TJ, Anderson LJ, et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2001;**43**(3):125-31.

Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004;**350**:443–50.

Williams JV, Tollefson SJ, Heymann PW, Carper HT, Patrie J, Crowe JE. Human metapneumovirus infection in children hospitalized for wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005;**6**: 1311-12.

Wolf DG, Greenberg D, Kalkestein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Goldberg MD, et al. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;**25**:320-4.

Wu SJ, Lee EM, Putvatana R, Shurtliff RN, Porter KR, Suharyono W, et al. Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2001;**39**:2794-8.

Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-adamidou G, Constantopoulos AG, Kafetzis D, Papadopoulos AG. Human metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Microbiol*. 2004;**30**: 267–70.

**Anexo A**

Termo de consentimento livre e esclarecido

**Pesquisa de vírus respiratórios e aspectos da resposta imune em espécimes clínicos obtidos de crianças de 0-5 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro, MG**

Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Sr. Pais/Responsáveis,

Os vírus respiratórios são os principais agentes causadores de doença respiratória aguda em crianças menores de cinco anos de idade, razão pela qual a equipe de Virologia da UFU vem desenvolvendo pesquisa nesse assunto.

A detecção do agente viral que está causando a infecção em seu filho, além de auxiliar o médico a tratá-lo, irá fornecer informações para trabalhos sobre mecanismos de infecção e sobre a circulação dos principais vírus respiratórios em nossa região.

É importante lembrar que a participação neste estudo é voluntária, que o nome de seu filho não será divulgado e que as amostras clínicas não serão utilizadas para nenhum outro estudo.

Se for do seu consentimento a coleta de secreção de nasofaringe (aspirado) e de 2-3mL de sangue de seu filho, favor assinar este documento.

Uberlândia: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome do pai/mãe ou responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Médicos responsáveis: \_\_\_\_\_

Profs. Drs. Orlando César Mantese e Hélio Lopes da Silveira

Coordenadora do Projeto:

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Divina A. O. Queiróz

(34) 3218-2664

Comitê de Ética em Pesquisa da UFU - (34) 3239-4131

## Anexo B

### Ficha Clínica – Projeto Vírus Respiratórios

Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Local atendimento: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: M F

Duração da gestação: \_\_\_\_\_ semanas (definir: pré-termo ou termo) Cor: \_\_\_\_\_

Aleitamento materno: não sim (duração: \_\_\_\_\_)

Pais fumantes: não sim Pais atópicos: não sim

#### **Doença de base presente (descrever qual patologia apresenta)**

Cardiopatia: não sim

Displasia broncopulmonar: não sim

Imunodeficiência: não sim

Outras (definir): não sim

#### **Descrição do quadro clínico**

• Início dos sintomas: \_\_\_\_\_ dias • Dor de garganta: não sim

• Febre: \_\_\_\_\_ dias • Dor no corpo: não sim

• Coriza: \_\_\_\_\_ dias • Mal estar: não sim

• Tosse: \_\_\_\_\_ dias • Secreção ocular: não sim

• Espirros: \_\_\_\_\_ dias • Hiperemia ocular: não sim

• Outros: \_\_\_\_\_

Frequência respiratória: \_\_\_\_\_ irpm

Murmúrio vesicular:

Chiados (sibilos): não sim

Retrações torácicas (tiragens): não sim

Apnéia ao atendimento (maior 20 seg com cianose ou bradicardia): não sim

Medicação em uso: \_\_\_\_\_

Rx de tórax: Hiperinsuflação não sim

Consolidação não sim

Atelectasia não sim

Gasometria arterial: pH= PaCO<sub>2</sub>= PaO<sub>2</sub>=  
HCO<sub>3</sub>= SatO<sub>2</sub>= BE=

Admissão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

Ventilação artificial: não sim ( \_\_\_\_\_ dias)

## Anexo C



Universidade Federal de Uberlândia  
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 250/05

**Registro CEP: 144/05**

**Projeto Pesquisa:** *"Detecção de metapneumovírus humano em amostras de crianças atendidas em hospital público de Minas Gerais, previamente testadas pela imunofluorescência indireta e RT-PCR pra outros vírus respiratórios"*

Pesquisador Responsável: Divina Aparecida Oliveira Queiróz

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Uberlândia, 06 de setembro de 2005.

Profª. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
 Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

*(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)*

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial ( Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.