

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE BIOMEDICINA

IZABELA LEITE GALAN

**DETECÇÃO DE VÍRUS PARAINFLUENZA EM AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS DE
INDIVÍDUOS COM SINTOMAS RESPIRATÓRIOS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-
GO**

GOIÂNIA

2024

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Izabela Leite Galan/ Menira Borges de Lima Dias e Souza

Título do trabalho: Detecção de vírus Parainfluenza em amostras respiratórias de indivíduos com sintomas respiratórios no município de Goiânia-GO

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [] NÃO?

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a)(s) autor(a)(es)(as) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Izabela Leite Galan, Discente**, em 06/08/2024, às 17:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Menira Borges De Lima Dias E Souza, Professora do Magistério Superior**, em 07/08/2024, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4724385** e o código CRC **486FD3FE**.

IZABELA LEITE GALAN

**DETECÇÃO DE VÍRUS PARAINFLUENZA EM AMOSTRAS RESPIRATÓRIAS DE
INDIVÍDUOS COM SINTOMAS RESPIRATÓRIOS NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-
GO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Biomedicina da Universidade Federal
de Goiás como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Menira Borges de Lima Dias e Souza

GOIÂNIA

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Galan, Izabela Leite
DETECÇÃO DE VÍRUS PARAINFLUENZA EM AMOSTRAS
RESPIRATÓRIAS DE INDIVÍDUOS COM SINTOMAS RESPIRATÓRIOS
NO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GO [manuscrito] / Izabela Leite Galan. -
2024.
XLVI, 46 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Biomedicina,
Goiânia, 2024.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Vírus respiratórios. 2. HPIV. 3. Epidemiologia. 4. RT-qPCR. 5.
Infecções respiratórias agudas. I. Souza, Menira Borges de Lima Dias e ,
orient. II. Título.

CDU 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao dois dias do mês de agosto do ano de 2024 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "Detecção de vírus Parainfluenza em amostras respiratórias de indivíduos com sintomas respiratórios no município de Goiânia-GO" de autoria de Izabela Leite Galan, do curso de Biomedicina, do(a) ICB da UFG. Os trabalhos foram instalados pela Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dra. Fernanda Craveiro Franco - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG e Dra. Juliana Lamaro Cardoso - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /UFG. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de (8,9, oito vírgula nove) , tendo sido o TCC considerado (aprovado).

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Menira Borges De Lima Dias E Souza**, Professora do Magistério Superior, em 02/08/2024, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Craveiro Franco**, Técnico, em 02/08/2024, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Lamaro Cardoso**, Professora do Magistério Superior, em 02/08/2024, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Megmar Aparecida Dos Santos Carneiro**, Professora do Magistério Superior, em 02/08/2024, às 13:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4686741** e o código CRC **FC38CDC8**.

À minha família, minha fonte de
inspiração, cujo carinho, suporte e paciência
foram fundamentais para minha jornada
acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Universidade, que durante quatro anos de graduação, me conferiu alicerces para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À minha orientadora, Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza, pelo incentivo e suporte a elaboração desse projeto, mas também, pela oportunidade de refletir a respeito do meu papel como pesquisadora.

À Dra. Fernanda Craveiro Franco, pelo acompanhamento e auxílio na execução desse trabalho.

À minha mãe, Rosângela, pelo carinho e apoio, mesmo que a distância, diante dos desafios e conquistas da minha vida acadêmica e pessoal.

Ao meu pai, Luís Carlos Galan, por me ensinar como a dedicação e a persistência refletem sobre nossos objetivos, sejam, profissionais, como pessoais.

Ao meu irmão, Luís Carlos, e minha cunhada, Fernanda, por acreditarem em mim nos momentos mais desafiadores.

À minha irmã, Patrícia, que experienciei o seu trabalho de conclusão de curso, e, hoje, estou concluindo o meu, graças ao seus valiosos conselhos e encorajamento.

Às minhas amigas, Ana Roberta, Brunna Heloisy, Pamela e Maria Raiani, com as quais pude contar e compartilhar tantos momentos nesses últimos quatro anos de graduação.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Ester, Geovana, Mayumi e Arthur, pela colaboração e parceria em etapas essenciais desse trabalho.

A todos, que contribuíram para que esse projeto tomasse forma, seja por meio de palavras de incentivo, críticas construtivas e apoio constante.

RESUMO

As infecções do trato respiratório superior e inferior podem ser causadas por diferentes vírus, entre os quais os vírus parainfluenza humanos (HPIV). Esses agentes são associados a essas síndromes de forma considerável em pacientes pediátricos e adultos com apresentações clínicas em formas mais brandas, com sintomas similares a resfriado, entre eles rinorreia, tosse e dor de garganta, bem como a quadros mais severos que podem resultar em óbito. Nesse contexto, foi realizada a detecção de HPIV em 217 amostras de *swab* nasofaríngeos de pacientes com sintomas respiratórios, atendidos em unidades ambulatoriais e de pronto atendimento entre setembro de 2023 a janeiro de 2024, no município de Goiânia-GO, por RT-PCR em tempo real. A população de estudo consistiu em sua maioria de pacientes do sexo feminino, entre 18 e 44 anos. O HPIV foi detectado em 2,89 % (6/ 207) das amostras consideradas válidas para a análise, entre os meses de novembro e dezembro. As principais faixas etárias, dentre os casos positivos, foram de crianças entre 5-14 anos, adolescentes entre 15-17 anos, adultos entre 45-64 anos e idosos com idade superior ou igual a 65 anos. O sinal e os sintomas respiratórios predominantes foram febre, calafrios, tosse, dor de garganta, dor de cabeça e dor no corpo. O estudo contribuiu com dados sobre a circulação de HPIV no município que pode subsidiar um melhor monitoramento e planejamento de políticas públicas para controle e prevenção dos vírus respiratórios.

Palavras-chaves: Virus respiratórios; HPIV; RT-qPCR; Epidemiologia; Infecções respiratórias agudas.

ABSTRACT

Upper and lower respiratory tract infections can be caused by a variety of viruses, including human parainfluenza viruses (HPIV). These pathogens are significantly associated with these syndromes in both paediatric and adult patients, presenting clinically in milder forms with cold-like symptoms such as rhinorrhea, cough and sore throat, and in more severe forms that can lead to death. In this context, HPIV was detected by real-time RT-PCR in 217 nasopharyngeal swabs from patients with respiratory symptoms who were treated in outpatient and emergency units in Goiânia-GO between September 2023 and January 2024. The study population was predominantly female and aged between 18 and 44 years. HPIV was detected in 2.89% (6/207) of the samples considered valid for analysis between November and December. The main age groups among positive cases were children aged 5-14 years, adolescents aged 15-17 years, adults aged 45-64 years and elderly patients aged 65 years and older. The most common respiratory signs and symptoms were fever, chills, cough, sore throat, headache and body aches. The study provided data on the circulation of HPIV in the municipality, which can support better monitoring and planning of public policies for the control and prevention of respiratory viruses.

Key-words: Respiratory viruses; HPIV; RT-qPCR; Epidemiology; Acute respiratory infections.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Foto de microscopia óptica das células VERO normais (quadro superior) e dos efeitos citopáticos de HPIV sobre elas (quadro inferior).	13
Figura 2- Diagrama esquemático da estrutura das partículas virais de Parainfluenza.	16
Figura 3- Representação esquemática do genoma de HPIV.	16
Figura 4- Representação esquemática linear da estrutura da proteína de fusão de HPIV.	17
Figura 5- Representação esquemática da organização dos genomas dos gêneros Respirovirus e Orthorubulavirus.	18
Figura 6- Fotos de micrografias eletrônicas (quadros superiores) e representação por cartoons (quadros inferiores) da interação entre as glicoproteínas HN e F para a entrada de HPIV-3 na célula hospedeira.	19
Figura 7- Cartoon da ligação entre as glicoproteínas HN e F para a fusão pH-independente..	19
Figura 8- Ciclo replicativo dos vírus parainfluenza humanos.	20
Figura 9- Fluxograma representativo da patogênese e progressão da doença causada por HPIV associado a crupe.	22
Figura 10- Esquematização do princípio da RT-qPCR baseado em sondas comerciais Taqman	25
Figura 11- Fluxo de trabalho das reações de RT-qPCR.	33
Figura 12- Representação de uma curva de amplificação RT-qPCR dada pelo QuantStudio™.	34
Figura 13. Curva de amplificação de uma amostra positiva (à esquerda) e válida pela RNaseP (à direita) dada pelo QuantStudio™.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Funções das proteínas estruturais de HPIV.....	17
Tabela 2-Relação dos reagentes de cada reação de RT-qPCR para Parainfluenza.	32
Tabela 3-Relação dos reagentes de cada reação de RT-qPCR para RNase P (RP).....	32
Tabela 4- Resultados da frequência de HPIV em associação com a faixa etária da população.	38
Tabela 5- Resultados da detecção de HPIV pelas características demográficas, sexo e sua associação com a idade, da população.....	39
Tabela 6- Manifestações clínicas dos pacientes na população estudada.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA vírus	Vírus crupe associado
COVID-19	Doença por coronavírus 2019
F	Proteína de fusão
HA-1	Vírus da hemadsorção tipo 1
HA-2	Vírus da hemadsorção tipo 2
HN	Glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase
HPIV	Vírus parainfluenza humano
L	Proteína “ <i>large</i> ”
NP	Proteína do nucleocapsídeo
P	Fosfoproteína
RP	RNAse P humana
RT-qPCR	Transcrição reversa- reação em cadeia da polimerase em tempo real
RT- PCR	Reação em cadeia da polimerase pós-transcrição reversa

SUMÁRIO

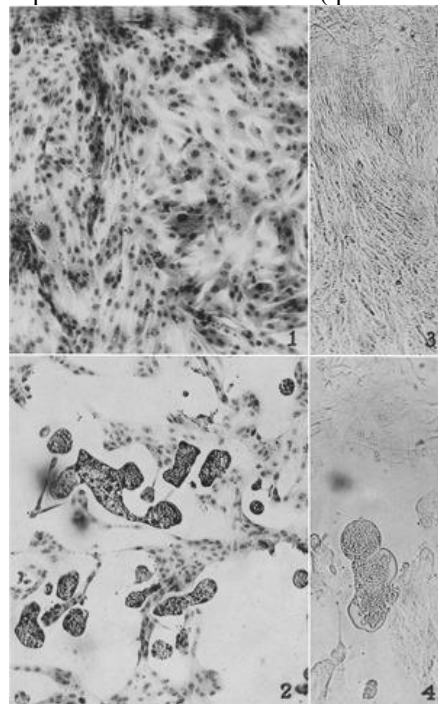
1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Breve Histórico	13
1.2	Taxonomia	15
1.3	Estrutura viral	15
1.4	Ciclo replicativo	18
1.5	Patogênese da infecção e manifestações clínicas	20
1.6	Métodos de diagnóstico e caracterização viral	23
1.7	Epidemiologia	25
1.8	Controle, tratamento e prevenção	27
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Aspectos éticos	31
4.2	Delineamento do estudo e da população	31
4.3	Extração de ácido nucleico	31
4.4	Otimização dos reagentes de RT-qPCR para detecção viral	32
4.5	Detecção dos produtos amplificados	33
4.6	Validação das reações de RT- qPCR	34
4.7	Análise Estatística	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve Histórico

O acometimento infantil pela laringotraqueobronquite, comumente referida como crupe, impulsionou diversos estudos envolvidos com a identificação dos principais agentes associados à essa condição. Um dos estudos realizado, incluiu o cultivo viral, em cultura celular de linhagem vero, ou seja, células epiteliais de rim de primatas cynomolgus (*Macaca fascicularis*), a partir de amostras de *swabs* de garganta de doze bebês diagnosticados com a forma aguda dessa doença, sendo observado aparência esponjosa (Figura 1) nas células como efeito citopático, caracterizada pelo aparecimento de diversos pequenos vacúolos no citoplasma acompanhado do aumento da granularidade com perda do limite e da estrutura celular, sugestivo de um novo patógeno ainda não descrito. Este agente foi incluído no grupo dos mixovírus, com a nomenclatura inicial de CA vírus ou “crupe associado”, dada algumas de suas propriedades, entre elas hemaglutinação de eritrócitos aviários, sensibilidade ao éter e estabilidade a -70°C . Esse, portanto, correspondia ao primeiro isolado do vírus Parainfluenza Humano (Chanock, 1956).

Figura 1- Foto de microscopia óptica das células VERO normais (quadro superior) e dos efeitos citopáticos de HPIV sobre elas (quadro inferior).



Fonte: Chanock (1956)

À medida que as metodologias de identificação viral se desenvolveram, os vírus pertencentes às outras duas linhagens de parainfluenza puderam ser isolados e caracterizados. Nesse sentido, Chanock e colaboradores (1958) combinaram, em amostras de *swab* de garganta de crianças e bebês com doenças respiratórias, o uso das técnicas de hemadsorção de Vogel e Shelokov, empregada para identificação sobretudo de influenza A asiática, em cultura de células Vero e, obtiveram o isolamento de dois novos mixovírus, designados vírus da Hemadsorção tipo I (HA-1) e tipo 2 (HA-2) em decorrência da capacidade de cada um em aglutinar eritrócitos de determinadas espécies de animais.

A inclusão dos isolados CA vírus, HA-1 e HA-2 como membros do grupo dos mixovírus, fundamentou-se na estreita relação com vírus Influenza A quanto morfologia e propriedades físico-químicas, tais como material genético RNA, simetria interna helicoidal, presença de membrana envolvente e capacidade de hemaglutinação, dada afinidade por mucoproteínas (mucinas), que ocasiona a adsorção à superfície de eritrócitos de aves e outros vertebrados. No entanto, eles não possuíam similaridade antigênica com esse vírus, desse modo, em 1959 foi proposto ao subcomitê de vírus do *International Nomenclature Committee*, nomeá-los parainfluenza. Sendo assim, esses vírus recém isolados foram nomeados respectivamente, parainfluenza 2, 3 e 1, pois apesar de compartilharem características morfológicas, são geneticamente e antigenicamente distintos (Andrewes; Bang; Burnet, 1955; Andrewes *et al.*, 1959).

O quarto tipo do vírus parainfluenza, foi isolado e caracterizado primeiramente como um mixovírus, em 1959, através de ensaios experimentais de Johnson e outros pesquisadores, devido a sua sensibilidade ao éter, tamanho, capacidade de hemadsorção, hemaglutinação e armazenamento a baixas temperaturas. Entretanto, demonstrou-se que esse agente apresentava padrões de antigenicidade diferente do grupo dos mixovírus, mas também, diversas características biológicas similares aos tipos 1, 2 e 3 de parainfluenza, portanto sofreu reclassificação conforme as recomendações de Andrewes *et al.* (1959). Em contrapartida, Canchola e colaboradores, em 1963, identificaram duas variantes antigênicas para o vírus parainfluenza tipo 4, as quais foram designadas como subtipos: 4a e 4b, pela percepção de diferenças em testes de inibição de hemadsorção (HI) e reatividade de anticorpos monoclonais. Esses vírus demonstraram proximidade entre si, visto que, por exemplo apresentam identidade de 87% e 95%, respectivamente, para os aminoácidos das proteínas hemaglutinina-neuraminidase e de fusão (Knipe *et al.*, 2007).

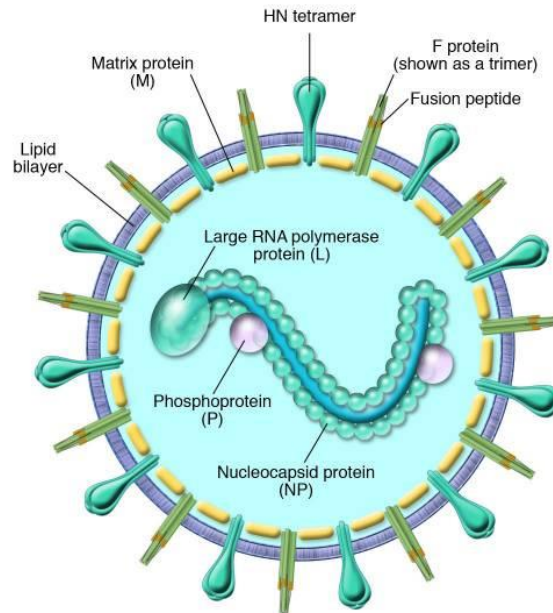
1.2 Taxonomia

A classificação taxonômica, dos vírus parainfluenza, segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2023) está sistematizada em domínio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Haploviricotina*, classe *Monjiviricetes*, ordem *Mononegavirales* e família *Paramyxoviridae*. Os táxons subfamília e gênero são determinados conforme os tipos de parainfluenza, devido aos seguintes critérios, respectivamente, a análise filogenética da sequência completa de aminoácidos da proteína L (*large protein*) e as diferenças estruturais existentes entre eles, desse modo, 1 e 3 pertencem a subfamília *Orthoparamyxovirinae* e ao gênero *Respirovirus*, enquanto, 2 e 4, a *Rubulavirinae* e ao *Orthorubulavirus*, respectivamente.

1.3 Estrutura viral

As partículas virais de parainfluenza (Figura 2) possuem diâmetro de 150 a 250 nm, são envelopadas, pleomórficas, variando de formato esférico a filamentoso como descrito para HPIV-2. O nucleocapsídeo tem simetria helicoidal, com aproximadamente 18 nm de diâmetro, contendo o genoma RNA polaridade negativa, não segmentado e fita simples com 15.400 a 17.000 nucleotídeos, mas também, as proteínas do nucleocapsídeo (NP), fosfoproteína (P) e a “*large*” (L). Na superfície dos vírions, estão projetadas a hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a proteína de fusão (F), duas glicoproteínas transmembranas, que medeiam, respectivamente, a ligação aos resíduos de ácido siálico na superfície das células-alvo do hospedeiro e a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, portanto, participam dos eventos envolvidos com a infecção viral e correspondem aos principais alvos de anticorpos neutralizantes. A HN tem ainda a função de favorecer a liberação de novos vírions pela clivagem dos resíduos de ácido siálico localizados na membrana celular (Adderson, 2021; Branche; Falsey, 2016)

Figura 2- Diagrama esquemático da estrutura das partículas virais de Parainfluenza.



Fonte: Branche, Falsey (2016)

O material genético viral (Figura 3) codifica para seis proteínas estruturais (Tabela 1) comuns aos quatro tipos de vírus Parainfluenza, são elas, proteína do nucleocapsídeo (NP), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína de fusão (F), glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) e RNA polimerase (L). A proteína NP se liga e reveste o RNA viral, constituindo um molde para a RNA polimerase RNA-dependente, a qual é composta pelas proteínas P e L, de modo a otimizar a transcrição, enquanto a M reveste a região interna do envelope participando dos processos de montagem, brotamento e liberação de novos vírions (Branche; Falsey, 2016; Knipe *et al.*, 2007).

Figura 3- Representação esquemática do genoma de HPIV.



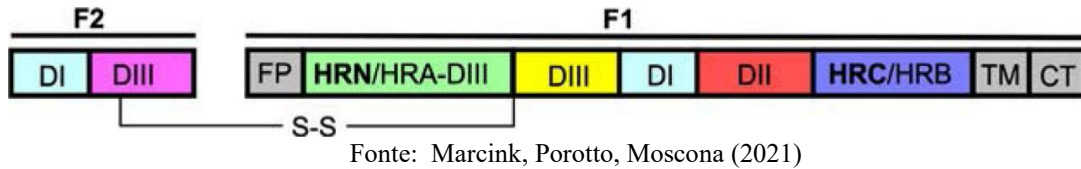
Fonte: Adderson (2021)

A hemaglutinina-neuraminidase (HN) é uma glicoproteína transmembrana tipo II organizada em homotetrâmeros, onde cada monômero compreende um único domínio transmembrana com peptídeo curto citoplasmático N-terminal ligado a haste helicoidal flexível e um domínio globular formado pela região C-terminal (Chibanga *et al.*, 2019).

A glicoproteína F (Figura 4), constitui-se em trímeros contendo uma região similar a uma haste curta com cabeça globular grande, os quais juntos formam um domínio semelhante a uma árvore, consiste uma proteína transmembrana do tipo I, cuja região N-terminal está projetada externamente nas partículas virais. Essa, é sintetizada como precursor inativo F0, que demanda clivagem por proteases do hospedeiro, suspeita-se ser desempenhada pela furina

intracelular, para sua forma ativa formada por duas subunidades, F1 e F2, ligadas por pontes de dissulfeto entre os domínios N-terminais repetidos (Marcink, Porotto, Moscona, 2021).

Figura 4-Representação esquemática linear da estrutura da proteína de fusão de HPIV.



As proteínas NP, P e L atuam a nível de transcrição e replicação do RNA viral. A primeira delas, considerada uma das mais conservadas, que se encontra como complexo solúvel com a proteína P, mas também, combinada a outros monômeros N e ao RNA para montar o nucleocapsídeo. A segunda, por sua vez, não se apresenta altamente conservada dentro de membros do mesmo gênero, enquanto, entre membros de diferentes gêneros dos vírus parainfluenza existe baixa homologia nas sequências de aminoácidos e está organizada como homotetrâmetro expressivamente fosforilado constituído pelas extremidades N- e C-terminal das quais somente a última é fundamental a transcrição. A terceira, por fim, caracteriza-se por multifuncionalidade responsável por atuar sobre a polimerização de nucleotídeos e os mecanismos de edição de RNA mensageiro (mRNA), o *capping* e metilação, além de formar com a proteína P um complexo que parece funcionar como RNA polimerase (Knipe *et al.*, 2013).

Tabela 1- Funções das proteínas estruturais de HPIV.

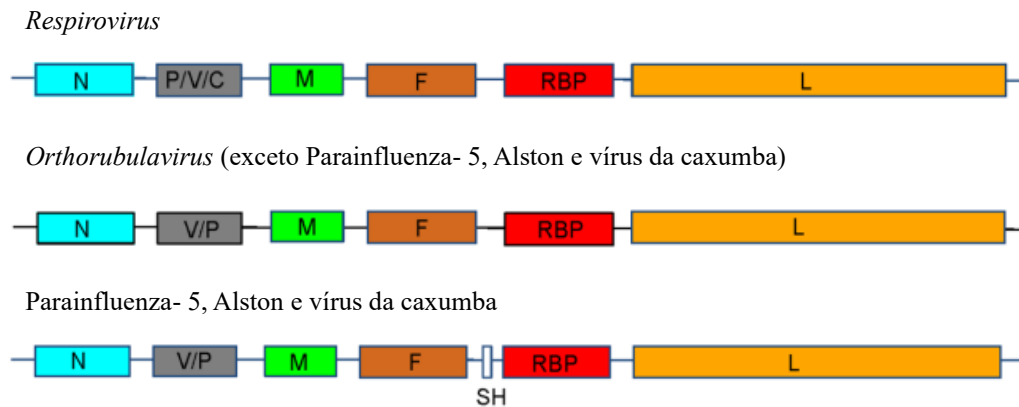
Proteínas	Função
NP	Estrutura, ligação ao RNA
P	RNA polimerase RNA-dependente
M	Estrutural e montagem dos vírions
F	Fusão do envelope viral com membrana celular do hospedeiro
HN	Ligação viral e entrada na célula hospedeira, sialidase
L	RNA polimerase RNA-dependente

Fonte: Adaptado de Anderson (2021)

Os gêneros respectivos a cada linhagem dos vírus parainfluenza exibem particularidades quanto as proteínas codificadas pelo genoma (Figura 5). Nesse sentido, os *Respirovírus* produzem uma proteína não-estrutural (C), a qual aumenta a eficiência da replicação viral,

enquanto, os *Orthorubulavirus* originam uma fosfoproteína (P) menor do que a dos respirovírus e algumas das espécies, uma pequena proteína integral de membrana (SH), devido à presença de um elemento transcricional extra. No entanto, compartilham a presença, em proteína de ligação ao receptor (RBP), de atividade de hemaglutinina e neuraminidase, também conhecida como HN (Rima *et al.*, 2019).

Figura 5- Representação esquemática da organização dos genomas dos gêneros Respirovirus e Orthorubulavirus.

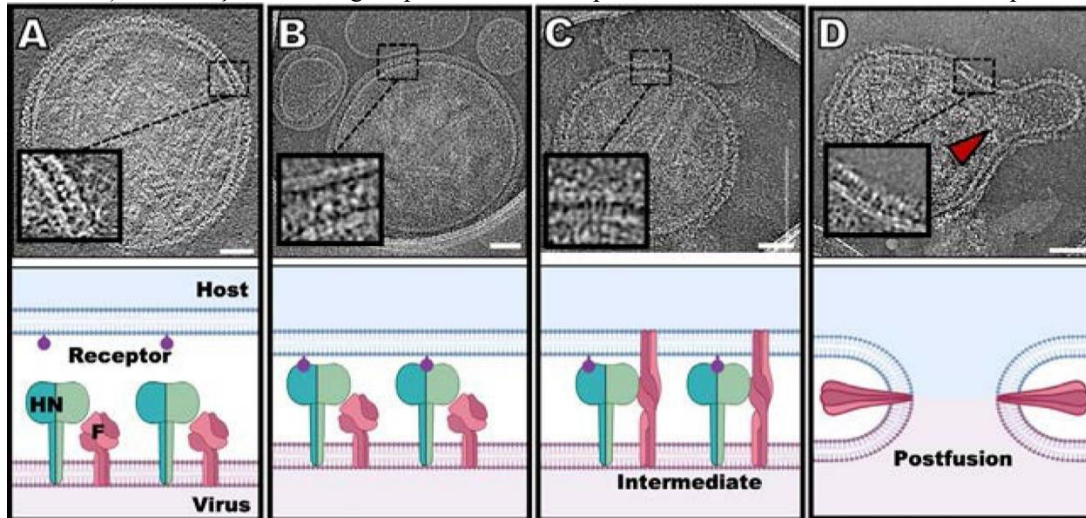


Fonte: Adaptado de Rima *et al.* (2019)

1.4 Ciclo replicativo

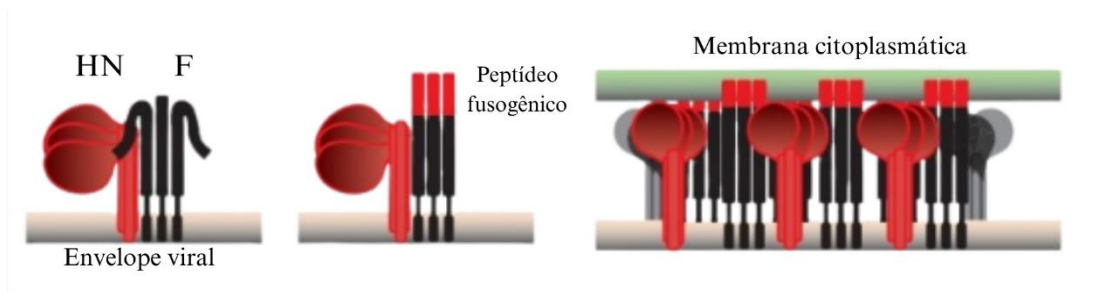
A origem de novos vírions de parainfluenza acontece por uma sequência de eventos coordenados (Figura 8). Inicialmente as duas glicoproteínas de superfície virais, HN e F, cooperam entre si para a adsorção e posterior fusão entre o envelope viral com a membrana citoplasmática das células hospedeiras, de modo que a primeira proporciona estabilidade e induz mudança conformacional da segunda (Figura 6), a partir de um dos seus sítios presentes em seu domínio globular, formando *clusters* HN-F, e, por consequência ativando-a. Os rearranjos estruturais de F expõem seu peptídeo fusogênico hidrofóbico, encontrado na subunidade aminoterminal F₁, o qual se insere na membrana plasmática (Figura 7), possibilitando a entrada dos vírus nas células-alvo (Marcink, Porotto, Moscona, 2021).

Figura 6- Fotos de micrografias eletrônicas (quadros superiores) e representação por *cartoons* (quadros inferiores) da interação entre as glicoproteínas HN e F para a entrada de HPIV-3 na célula hospedeira.



Fonte: Marcink, Porotto, Moscona (2021)

Figura 7- *Cartoon* da ligação entre as glicoproteínas HN e F para a fusão pH-independente.

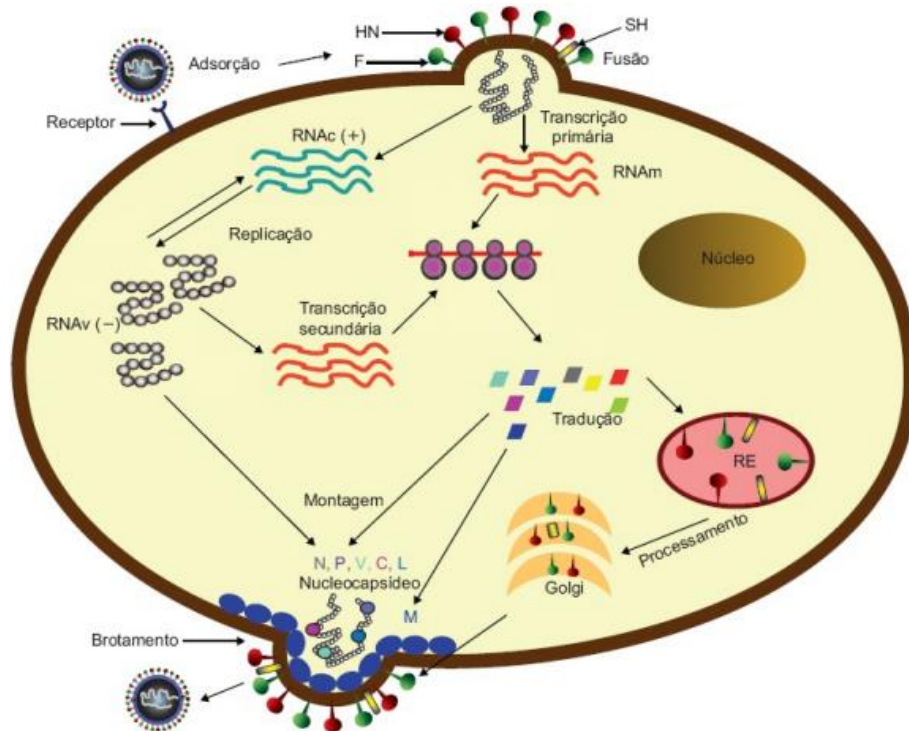


Fonte: Adaptado de Santos, Romanos, Wigg (2015)

Após o processo de fusão, o capsídeo é liberado para o citoplasma celular, onde ocorre a transcrição primária e replicação do genoma RNA viral polaridade negativa (RNA_v⁻) com participação de dois complexos proteicos, o P-L e N-P-L. Os genes são transcritos, continuamente, um a um, de forma que o fim da transcrição de um ORF sinaliza para o próximo, produzindo RNA mensageiros subgenômicos (RNA_m). Ao mesmo tempo, cadeias complementares de RNA polaridade positiva (RNA_c⁺) ou antigenoma, que funcionam como moldes para novos RNA_v⁻, são sintetizados na presença de proteína N recém-sintetizada. Em seguida, acontece uma transcrição secundária de responsabilidade de P-L, com posterior tradução de novas proteínas, as quais passam por processamento no retículo endoplasmático e glicosilação no aparelho de Golgi. Após esses processos, têm-se início a montagem dos novos vírions, quando as proteínas estruturais codificadas pelo genoma interagem entre si. A fase final desse procedimento depende da clivagem do precursor de F e de ácidos siálicos, para que haja a liberação das partículas virais por brotamento, fenômeno esse que nos respirovírus conta com

a proteína C. Em ambas essas duas últimas etapas da biossíntese viral, as proteínas do complexo endossomal e ubiquitina dos hospedeiros, estão presentes (Santos, Romanos, Wigg, 2015).

Figura 8- Ciclo replicativo dos vírus parainfluenza humanos.



Fonte: Santos, Romanos, Wigg (2015)

1.5 Patogênese da infecção e manifestações clínicas

Os HPIV são transmitidos via pessoa a pessoa por gotículas de saliva ou perdigotos e pelo contato com mãos e superfícies contaminadas com secreções respiratórias, contendo partículas virais viáveis. O período de incubação é estimado entre 2-6 dias e o de excreção entre 4 a 21 dias (Adderson, 2021).

Os sítios de infecção dos vírus parainfluenza se concentram nas células epiteliais ciliadas do trato respiratório tanto superior quanto inferior, ligando-se a receptores específicos contendo ácido siálico, com pico de taxa replicativa entre 2 a 5 dias após a infecção inicial. As regiões de acometimento primário consistem na naso e orofaringe, com consequente disseminação para as vias aéreas inferiores. O comportamento e severidade das infecções dependem do local de replicação viral, sendo assim, quando restritas a vias aéreas superiores resultam em sintomas de resfriado, tais como tosse, rinorreia e dor de garganta, porém, se estendidas a laringe e traqueia, a crupe e a bronquiolite se apresentam clinicamente, enquanto, nas áreas distais ou no trato respiratório inferior têm-se a pneumonia (Branche, Falsey, 2016).

A patogênese das doenças ocasionadas pelos vírus parainfluenza humanos compreende a combinação entre as estratégias virais, entre elas as proteínas de fusão (F) e hemaglutinina-neuraminidase (HN), com os fatores do hospedeiro, tais como susceptibilidade genética, proteases celulares, imunocompetência e infecção prévia. Os HPIV, sob essa perspectiva, ao infectarem a célula, promovem uma série de alterações morfológicas, o aumento no tamanho do citoplasma e núcleo, diminuição da atividade mitótica celular, aparecimento de inclusões basofílicas ou eosinofílicas, formação de células gigantes multinucleadas com dois a sete núcleos e de vacúolos citoplasmáticos, visto que são membros dos paramixovírus, uma família conhecida por ocasionar apoptose em cultura de tecidos (Elboukari, Ashraf, 2023).

A influência das respostas imunes do hospedeiro sobre a patogênese das infecções por HPIV, quanto ao curso de sinais e sintomas clínicos se manifesta pela participação dos componentes da resposta imune inata, de células TCD8⁺ e TCD4⁺ com atividade citotóxica direcionada as proteínas estruturais HN, NP e P, respostas locais e sistêmicas de imunoglobulinas IgA, IgE e IgG, que se responsabilizam em conter a infecção, e, por conseguinte, contribuem para o *clearance* viral. Sob essa perspectiva, as falhas nessas respostas têm sido relacionadas a doenças progressivas e fatais, essencialmente em receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas (Ison, Lee, 2017; Pawelczyk, Kowalski, 2017). Somado a isso, diversos HPIV podem inibir as respostas de interferon do tipo I (IFN-1), por meio, da proteína C acessória, por exemplo (Aderson, 2021).

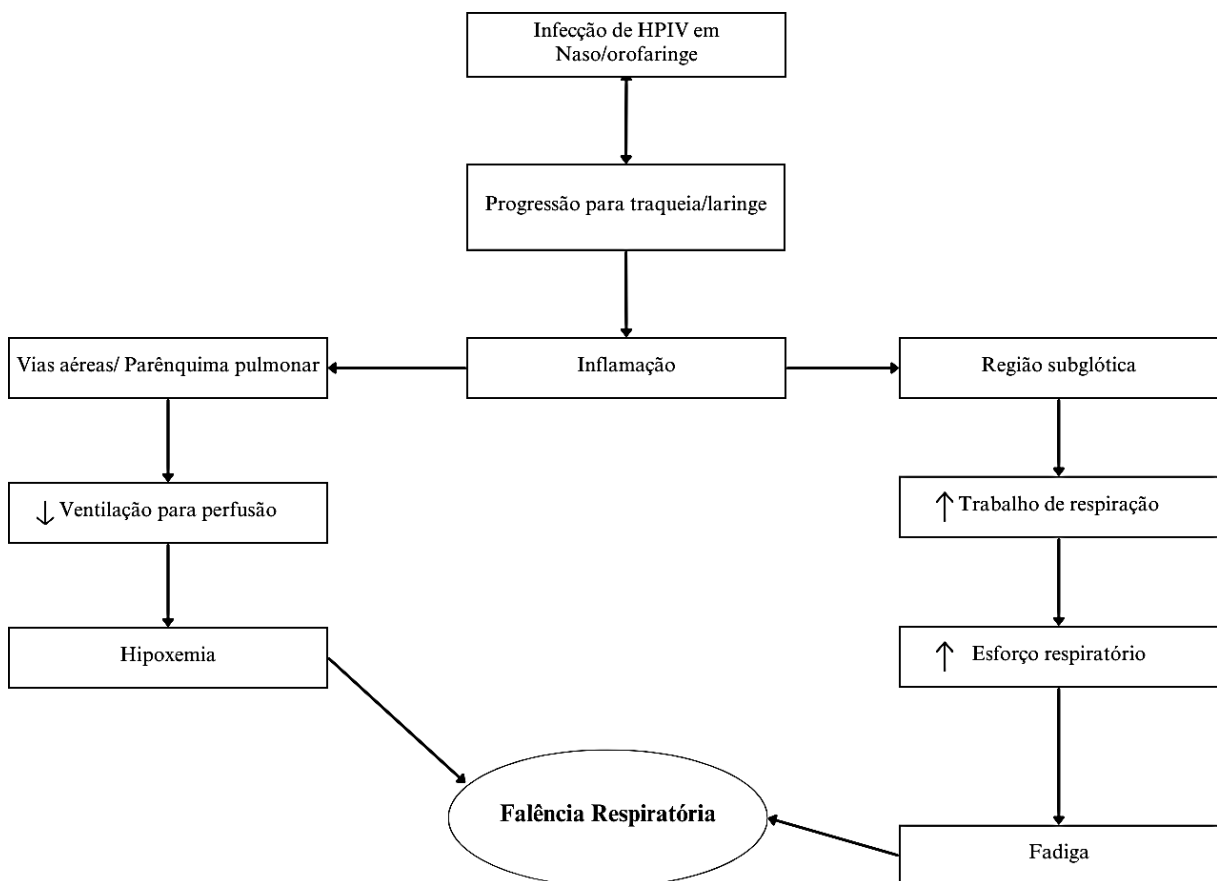
Os indivíduos imunocompetentes, em geral, manifestam infecções leves e autolimitadas, enquanto, crianças, idosos e imunocomprometidos podem apresentar complicações que ocasionem a necessidade de ventilação mecânica ou até mesmo ao óbito (Indumathi *et al.*, 2015). A asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), por exemplo, estão associadas as infecções precoces na infância por esses vírus (Garcia *et. al.*, 2020).

Com menor frequência, as infecções pelos vírus HPIV podem estar associados a uma série de outras características clínicas, tais como rinite, faringite, otite média, sinusite, bronquiolite, apneia, e complicações extrapulmonares (Adderson, 2021). Na parotidite, que apesar de frequentemente associada ao vírus da caxumba, os HPIV também aparecem como agentes etiológicos. As manifestações neurológicas, onde esses vírus podem se comportar como fator causal ou associativo, incluem meningite asséptica, convulsões febris, com incidência global de 16% dos casos de hospitalizações infantis, síndrome de Guillain-Barré, dada recuperação de parainfluenza em líquido cefalorraquidiano (LCR), e encefalite. O comprometimento do coração e miocárdio, na forma de pericardite e miocardite, é raro, com poucos casos na literatura, porém relatam-se casos de miocardite em neonatos a partir de

diagnóstico sorológico. A viremia ou disseminação sistêmica podem ocorrer, em geral, associada com a presença de alguma condição clínica preexistente. Entretanto, os mecanismos pelos quais esses vírus replicam-se nesses outros sítios e associam-se a essas condições não estão bem demonstradas (Farahmand *et al.*, 2020).

A sintomatologia clássica de laringotraqueobronquite ou crupe, umas das apresentações clínicas bastante elucidadas aos vírus parainfluenza, inclui rouquidão, tosse e estridor, como consequência de obstrução pela inflamação de uma região pouco distensível da traqueia circundada por cartilagem cricóide, a subglótica. Conseqüentemente, essa lesão provoca uma cascata de eventos (Figura 9), são eles, o aumento do trabalho respiratório, maior esforço respiratório, hipóxia e fadiga, que pode evoluir para falência respiratória (Branche, Falsey, 2016).

Figura 9- Fluxograma representativo da patogênese e progressão da doença causada por HPIV associado a crupe.



Fonte: Adaptado de Branche, Falsey (2016)

De acordo com alguns estudos, os sorotipos de parainfluenza humano, embora compartilhem morfologia e as mesmas estratégias replicativas, podem provocar manifestações clínicas e respostas imunes específicas. O HPIV tipo 1, replica-se com títulos elevados no trato respiratório superior, sem induzir a secreção de citocinas até o final da infecção, logo

indetectável por vários dias, e leva a doenças do trato respiratório superior e crupe. O HPIV-2 se assemelha a HPIV-1, porém, apresenta uma taxa de replicação menos eficiente e induz um pico precoce de citocinas. O HPIV-3 prevalece em casos de bronquiolite e pneumonia por se replicarem, sobretudo, no trato respiratório inferior, induzindo um lento aumento na secreção de citocinas (Pawelczyk, Kowalski, 2017).

A significância clínica de HPIV-4 exibe controvérsias, pois essa linhagem é pouco menos caracterizada, com impacto variando entre mínimo a doenças significativas, apesar de consistir em um agente com considerável morbidade em pacientes pediátricos. Alguns autores, como Frost *et al* (2014), observaram que esse não causava a crupe, entretanto, infectava as vias respiratórias superiores e inferiores de crianças e se associava a convulsões com presença de febre naquelas saudáveis, a hipóxia, achados anormais pulmonares, de radiografia e comprometimento neurológico. Portanto, sugere-se que os sintomas provocados por esse vírus sejam similares aos de HPIV-3 (Elboukari, Ashraf, 2023).

1.6 Métodos de diagnóstico e caracterização viral

A correspondência de padrões clínicos entre diversos vírus respiratórios suscitou o desenvolvimento de ensaios específicos para o diagnóstico de parainfluenza humano. Para o diagnóstico laboratorial da infecção por HPIV, pode-se utilizar entre os métodos, a imunofluorescência indireta e direta para a detecção de anticorpos em amostras clínicas, como também, metodologias moleculares (Terlizzi *et al.*, 2009). Dentre esses testes, o padrão-ouro consiste em cultura viral, onde os vírus são isolados em cultura de células primárias do rim de primatas (LLCMK2), células renais embrionárias humanas (HEK293) ou células de carcinoma pulmonar humano (A549), pois eles produzem hemadsorção (HAD) e efeitos citopáticos (CPE) como o dano ciliar, a necrose epitelial e o recrutamento de resposta inflamatória mononuclear, contudo, esse procedimento requer incubação, em média, de 4 a 7 dias, além de experiência laboratorial, logo, exibe limitação a aplicabilidade a prática clínica em diagnóstico (Adderson 2021).

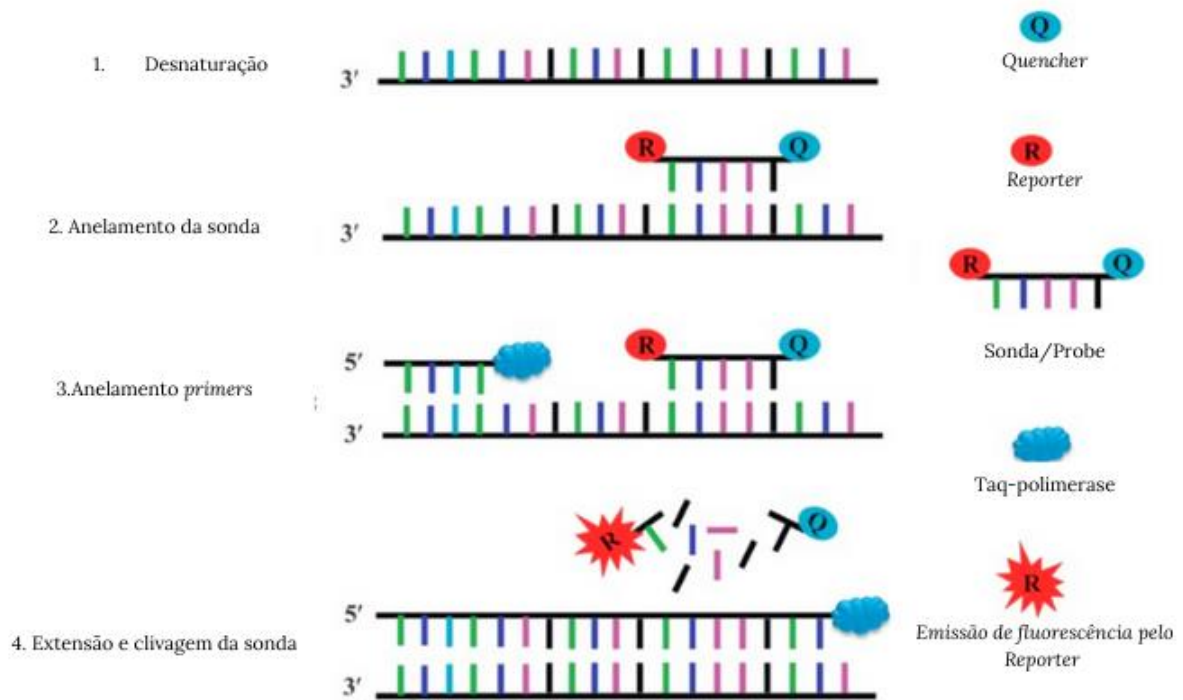
A detecção direta de antígenos com imunoenaios enzimáticos colorimétricos (EIAs), empregada como método de diagnóstico rápido desde a década de 1970, está indisponível para parainfluenza, visto que ainda não foram desenvolvidos testes comerciais. Em compensação, a pesquisa de anticorpos pela imunofluorescência (IFA) em amostras clínicas demonstra uma sensibilidade de 63 a 95% para os sorotipos 1 a 3, sendo assim, uma opção viável quando os recursos clínicos são limitados. Por outro lado, a fixação de complemento e os ensaios de EIA compreendem o diagnóstico sorológico, entretanto, necessitam da coleta de soro convalescentes

de modo a evidenciar o aumento de quatro vezes ou mais o título de anticorpos e confirmar a infecção aguda, além disso, não existem no mercado ensaios comerciais para identificar anticorpos da classe IgM específicos para o vírus (Branche, Falsey, 2016; Elboukari, Ashraf, 2023).

A sensibilidade, rapidez, especificidade e precisão dos resultados, mesmo em baixas cargas virais, justificam a importância das metodologias moleculares, entre elas reação em cadeia da polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR) para a identificação dos quatro tipos de HPIV. A RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), fundamentada na detecção do material genético amplificado por meio da emissão de sinal luminescente proporcional à quantidade de alvo, apresenta-se mais sensível quando comparada a RT-PCR convencional. Os genes alvos que têm sido empregados para o desenho de primers a fim de identificar esses vírus respiratórios com RT-PCR, correspondem aos genes para HN, fosfoproteína proteína de fusão e nucleoproteína. Dentre esses, o gene HN é o considerado como escolha mais adequada, dada as suas maiores diferenças genéticas e antigênicas entre as quatro linhagens de HPIV (Ghelichkhan *et al.*, 2017; Buller, 2013).

O aumento da sensibilidade dos ensaios de RT-qPCR é consequência do emprego de pares de iniciadores e sondas fluorescentes desenhadas para serem complementares a sequência de interesse e, sendo assim, a detecção dos produtos de PCR amplificados depende da complementariedade da região alvo com a sonda. As sondas de hidrólise *Taqman* (Figura 10), por exemplo, correspondem a oligonucleotídeos projetados para uma sequência específica que comportam duas extremidades, uma 5' marcada com o corante fluoróforo denominada *reporter* e outra 3', a *quencher*, onde está fixado um corante supressor não fluorescente bloqueador da emissão de fluorescência e, localizam-se entre os dois primers de PCR. O sinal fluorescente é emitido, durante o processo de extensão de novas cadeias, quando a *Taq* polimerase, uma enzima que também apresenta atividade de exonuclease na direção 5' → 3' cliva a porção 5' da sonda, separando a região *reporter* da *quencher* (Shen, 2019).

Figura 10- Esquematisação do princípio da RT-qPCR baseado em sondas comerciais *Taqman*



Fonte: Adaptado de Roy *et. al.* (2019)

Os ensaios de RT-qPCR, para a pesquisa dos vírus HPIV variam de monoespecíficos ou monoplex, os quais amplificam cada alvo em reações separadas, a multiplex, que detectam simultaneamente diversos vírus respiratórios, entre eles outros paramixovírus, em uma única reação, e, portanto, otimizam o tempo de diagnóstico, bem como, minimizam os custos (Liu *et al.*, 2019; Rheem *et. al.* 2012).

1.7 Epidemiologia

A prevalência dos vírus parainfluenza humanos como agentes das infecções respiratórias agudas em pacientes pediátricos varia entre 3% a 17%, em diversos países do mundo (Swamy *et.al.*, 2016; Rafeek *et. al.*, 2021). As internações em UTI, entre as hospitalizações pelas infecções por HPIV, estão, aproximadamente, em 14-15,5% dos casos, enquanto, os óbitos em 1,7- 8,9% (Pai *et al.* 2024). As populações mais jovens com idade inferior a cinco anos são as principais acometidas, visto que pelas estimativas globais, correspondem a 43 – 87% dos casos de infecção aguda das vias aéreas inferiores atribuídas por HPIV laboratorialmente confirmados, com taxa de internações hospitalares em intervalo de 6 a 20% e 7% de mortalidade (Wang *et al.*, 2021).

As taxas de infecções por parainfluenza em adultos, responsáveis pelas doenças respiratórias agudas, estão no intervalo de 1 a 15%. O diagnóstico molecular tem o demonstrado

como o segundo ou terceiro vírus mais comum isolado em adultos hospitalizados, entre 16 e 64 anos de idade (Ison, Lee, 2017). Estima-se que em torno de 2 a 11,5% das hospitalizações por doenças respiratórias desse perfil de pacientes sejam causadas por HPIV, com mortalidade associada ao período de internação, presença de fatores de risco e idade (Russell *et al.*, 2019). Em contrapartida, outras instituições de longa permanência, tais como lares de idosos, registram anualmente 4 a 14 % de residentes infectados (Branche, Falsey, 2016).

A incidência de infecções de HPIV é maior em pacientes jovens do sexo masculino, alguns autores contabilizaram mais de 50% de casos positivos, porém esse comportamento não acompanha a progressão da idade. Apesar disso, frequentemente, predomina-se o acometimento de homens por infecções agudas respiratórias, assim, quando observadas eventuais diferenças entre os sexos, deve-se considerar maior morbidade e a susceptibilidade deles em manifestar sintomas típicos de doenças respiratórias virais (Gregianini *et. al.*, 2019).

A distribuição etária dos vírus HPIV, entre adultos, em diferentes regiões, incluindo as Américas e, sobretudo o Brasil, demonstra prevalência em faixas etárias mais elevadas, ≥ 65 anos, com taxa de 1,38 %. Os adultos jovens de 18-44 anos, são o segundo grupo mais prevalente com 0,55 %, seguido, da faixa etária entre 45-64 anos, sendo a menos prevalente com 0,43 % (Schüz *et al.*, 2023).

No Brasil, o estudo epidemiológico conduzido por Menezes *et al.* (2024) revela que HPIV esteve presente em 2% das infecções respiratórias agudas se concentrando nas regiões sudeste (42,4%), sul (22,7%) e centro-oeste (18,4%), entre fevereiro de 2020 e agosto de 2022. As crianças menores de 1 ano e entre 1- 4 anos, são os grupos predominantemente acometidos, representando, respectivamente, 44,2% e 42,8% dos casos, enquanto, os indivíduos entre 15-19 anos, correspondem a 1,4%. Com predomínio dos seguintes sintomas, febre (70,1%), tosse (83,1%), dispneia (70%), dessaturação (44,6%), vômito (12,9%), dor de garganta (7,2 %) diarreia (7,2%), dor abdominal (2,8%) e dor de cabeça (1,1%).

As particularidades climáticas de país ou região podem influenciar sobre a incidência das infecções respiratórias. O sul do Brasil, concentra as altas incidências, dada a maior susceptibilidade às infecções provocada pela exposição ao frio, pois pode induzir a vasoconstrição da mucosa do trato respiratório e supressão das respostas imunes. O Rio Grande do Sul, por exemplo, registrou uma prevalência de HPIV variando de 2,14% a 27% (Gregianini *et. al.* 2019).

Os vírus HPIV estão dentre os principais agentes responsáveis por infecções agudas respiratórias em pacientes pediátricos, no estado de Goiás, especialmente no município de Goiânia. Costa *et. al.* (2020) detectaram em crianças asmáticas, entre 4 a 14 anos, 7,19 %

(11/136) amostras positivas para HPIV, das quais sete eram HPIV-2 (4,6%), quatro, HPIV-1 (2,6%) e nenhum HPIV-3. Em contrapartida, Silva *et al.* (2022) identificaram 8,80 % (36/409) de positividade para HPIV, dos quais, 4,64 % (19/36) eram HPIV-2; 2,44% (10/36), HPIV-1 e 1,71% (7/36), HPIV-3.

A circulação dos vírus parainfluenza descreve, normalmente, um padrão sazonal, ou seja, distribuem-se, desigualmente, ao longo das estações do ano, a depender das condições climáticas das regiões onde se encontram. As epidemias de HPIV ocorrem na primavera, em março-maio no hemisfério norte e setembro-novembro hemisfério sul, e no início do verão, em junho-agosto no hemisfério norte e dezembro-fevereiro no hemisfério sul, e, quando comparadas a outros vírus respiratórios, tais como influenza, sincicial respiratório e metapneumovírus, apresentam maior duração, devido a diferentes momentos de circulação de cada subtipo de HPIV (Li *et al.*, 2019).

1.8 Controle, tratamento e prevenção

Os surtos de infecção por parainfluenza, quando detectados, requerem mecanismos de controle da propagação viral, tais como isolamento do contato entre pacientes, distanciamento físico, limites de visitas, uso de máscaras e medidas de higiene e limpeza de superfícies, especialmente nos locais de cuidados de imunocomprometidos, neonatais e idosos. A triagem de pacientes assintomáticos, funcionários e profissionais da saúde, também é uma opção viável, visto que podem eliminar de modo prolongado o vírus em baixos níveis (Elboukari, Ashraf, 2023).

A abordagem terapêutica para os casos positivo está restrita aos sintomas manifestados pelos pacientes pediátricos e adultos, pois, ainda, não estão disponíveis antivirais específicos. Os corticosteroides são empregados no tratamento primário da crupe com resultados para as formas mais brandas e moderadas a graves, bem como redução de hospitalizações associadas a HPIV-1 e, em pacientes hospitalizados com complicações severas, tal como epinefrina nebulizada. A ribavirina aerossolizada, apesar de também administrada, não é muito recomendada devido aos desfechos clínicos controversos e à falta de evidências que justifiquem a sua eficácia (Trawally *et. al*, 2024).

Em modelos experimentais, alguns fármacos e moléculas, comportam-se como potenciais antivirais ao interferir em determinado estágio do ciclo replicativo de HPIV. Dentre esses, uma proteína recombinante de fusão com atividade de sialidase, a DAS181, utilizada para o tratamento de influenza, está sendo estudada em virtude de similaridade entre os receptores específicos de ambos os vírus, e em ensaios clínicos, demonstrou sucesso em interferir na

atividade na proteína hemaglutinina-neuraminidase (HN), por meio da remoção de seu sítio de ligação em receptores das células hospedeiras, o ácido siálico, e, por conseguinte, impedindo a entrada viral (Chibanga *et al.*, 2019 ; Pawelczyk, Kowalski, 2017).

Outros agentes, em alternativa, que induzem a glicoproteína HN a ativarem precoce a proteína de fusão (F), ocasionando a perda de infectividade de HPIV, sem modificar suas funções de ligação ao receptor ou clivar o receptor (neuraminidase), e são conhecidos como compostos pré-desencadeantes ou pré-ativadores, estão em fase de estudo. Um deles, por exemplo, corresponde ao composto ativador prematuro 3066 ou PAC-3066, que revelou eficácia em interagir com o sítio do domínio globular de HN, o possível local responsável por ativar F (Marcink *et al.*, 2020).

As vacinas contra HPIV, permanecem indisponíveis, apesar do empenho em desenvolvê-las e licenciá-las (Adderson, 2021). Os ensaios pré-clínicos e clínicos mais promissores são aqueles voltados ao desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas para duas linhagens de parainfluenza, HPIV-2 e HPIV-3, que atendam crianças e adultos, dentre elas, a *HPIV3cp45*, desenvolvida por meio da passagem a frio de HPIV-3 em cultura de células que se demonstrou segura, tolerada e imunogênica em crianças entre 6 a 18 meses e a vacina recombinante contra HPIV-2, a rHPIV2-15C/948L/ Δ 1724, a qual está sendo explorada em pacientes pediátricos e adultos (Karron *et al.* 2023; Russell, Ison, 2017).

A bPIV-3, uma vacina atenuada desenvolvida com o parainfluenza tipo 3 bovino, um vírus que foi capaz de ocasionar resposta imune significativa em crianças e adultos soronegativos, em condições experimentais evidenciou segurança e imunogenicidade quando administrada por via intranasal em bebês aos 2, 4 e 6 meses de idade, bem como resposta imune humoral de anticorpos, a qual reagiu de forma cruzada com HPIV-3. Uma outra vacina também atenuada potencialmente candidata a HPIV-1, por outro lado, designada como rHPIV-1/84/del170/942A não apresentou bons resultados em estudo clínico de fase I, pois foi superatenuada em crianças soronegativas (Pawelczyk, Kowalski, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

A pandemia de COVID-19, reconhecida pela OMS em março de 2020, propiciou uma crescente preocupação com vírus respiratórios de mesmas vias de transmissão, incluindo HPIV. Nesse sentido, houve um estímulo a busca por compreender os padrões de suas infecções, mas também, os impactos das medidas de controle adotadas durante esse período, tais como a utilização de máscaras e o isolamento social, sobre a dinâmica de circulação desses outros vírus, em virtude da maior disponibilidade de painéis respiratórios para diagnóstico molecular via RT-qPCR.

Os HPIV são importantes agentes com infecções consideráveis em pacientes pediátricos menores de cinco, idosos com 65 anos ou mais e imunocomprometidos, que ocasionam impactos socioeconômicos e sobre a dinâmica familiar. Contudo, quanto as populações adultas, as quais compõem majoritariamente essa presente pesquisa, os estudos sobre as suas apresentações clínicas, desfechos e efeitos são escassos, apesar da epidemiologia, tal como taxas de detecção e hospitalizações, e evidências de infecções recorrentes caracterizadas na literatura.

No Brasil, o monitoramento de infecções respiratórias agudas, desde 2009, corresponde a uma política de saúde pública. Entretanto, ocorre uma negligência, frequente, aos HPIV na comunidade, sobretudo em vista dos adultos e adolescentes, tornando-se imprescindível as investigações epidemiológicas voltadas a sua caracterização e impactos da sua dinâmica de circulação, para orientar o planejamento dos serviços de saúde, mas também, das estratégias de controle e prevenção. O presente estudo, sob essa lógica, pretende detectar HPIV, no município de Goiânia, Goiás, em população de adultos e adolescentes, em associação com as características demográficas, assim como, sinais e sintomas apresentados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar a detecção de vírus parainfluenza, em amostras clínicas de pacientes admitidos em unidades de pronto atendimento e ambulatoriais com sintomas respiratórios em Goiânia, Goiás, no período de setembro de 2023 a janeiro de 2024.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Detectar HPIV nas amostras respiratórias em estudo;
- ✓ Identificar a frequência de HPIV por sexo e faixa etária, em associação com os sintomas apresentados pelos participantes;
- ✓ Avaliar a presença de um padrão de circulação sazonal de HPIV entre o período de setembro 2023 a janeiro de 2024.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo compõe o projeto de vigilância de vírus respiratórios do Laboratório de Virologia Humana e Cultivo Celular, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás em parceria com a Prefeitura Municipal de Goiânia, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFG) sob parecer CAAE: 45029421.0.0000.5083.

4.2 Delineamento do estudo e da população

Foram incluídas as amostras de 217 *swabs* nasofaríngeos, coletados de setembro de 2023 a janeiro de 2024, de pacientes pertencentes a diferentes faixas etárias, sendo pediátricos entre 4-14 anos, adolescentes entre 15-17 anos, adultos, distribuídos nos seguintes intervalos, 18-44 anos e 45-64 anos, mas também, idosos com idade igual ou superior a 65 anos. Os participantes foram atendidos com sinais e sintomas respiratórios (febre, dor de cabeça, dor de garganta, calafrios, falta de ar, dor no corpo, diarreia, perda de olfato e paladar), em unidades de pronto atendimento e ambulatoriais de diferentes regionais de saúde em Goiânia, Goiás.

4.3 Extração de ácido nucleico

O RNA viral das amostras respiratórias foi extraído com o Kit *Biopur Fast DNA/RNA*, conforme as recomendações do produto com modificações, sendo assim foi utilizado 10 µL de amostra e adicionado a 10 µL do tampão de lise em placa de PCR 0,2 mL, que seguiu para o processamento em termociclador *Bio-Rad T100*, a 95°C por 8 minutos e resfriamento por 4 minutos.

O kit comercial *QIAamp® Viral RNA Mini Kit Qiagen*, seguindo as instruções do fabricante, também foi empregado para a re-extração, apenas, de amostras que amplificaram pelo método de lise, com a finalidade de confirmar a presença de RNA viral. Desse modo, as amostras foram submetidas aos procedimentos de lise, com a pipetagem de 560 µL de tampão AVL; 5,6 µL do RNA carreador e 140 µL de amostra em *ependorf* 1,5 mL e incubação por 10 minutos. Após a centrifugação, o material do lisado foi transferido para coluna *QIAamp Mini* de membrana sílica, duas lavagens, com 500 µL de cada tampão (AW1 e AW2), acompanhadas cada uma por centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto e 13.400 rpm por 3 minutos, respectivamente, seguido de eluição do RNA viral com 60 µL de tampão AVE.

4.4 Otimização dos reagentes de RT-qPCR para detecção viral

A triagem das amostras clínicas foi efetuada por meio da RT-qPCR direcionada a amplificação do material genético viral alvo e do gene da RNaseP humana (RP), como controle interno indicativo de presença de ácido nucleico na amostras extraída, com o kit *Promega GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR* (Figura 11). Os reagentes foram otimizados para utilização em uma mistura de reação de volume final de 10 µL, sendo 3 µL de amostra e 7 µL de mix dos reagentes para RT-qPCR em devidas proporções (Tabela 2 e 3).

Tabela 2-Relação dos reagentes de cada reação de RT-qPCR para Parainfluenza.

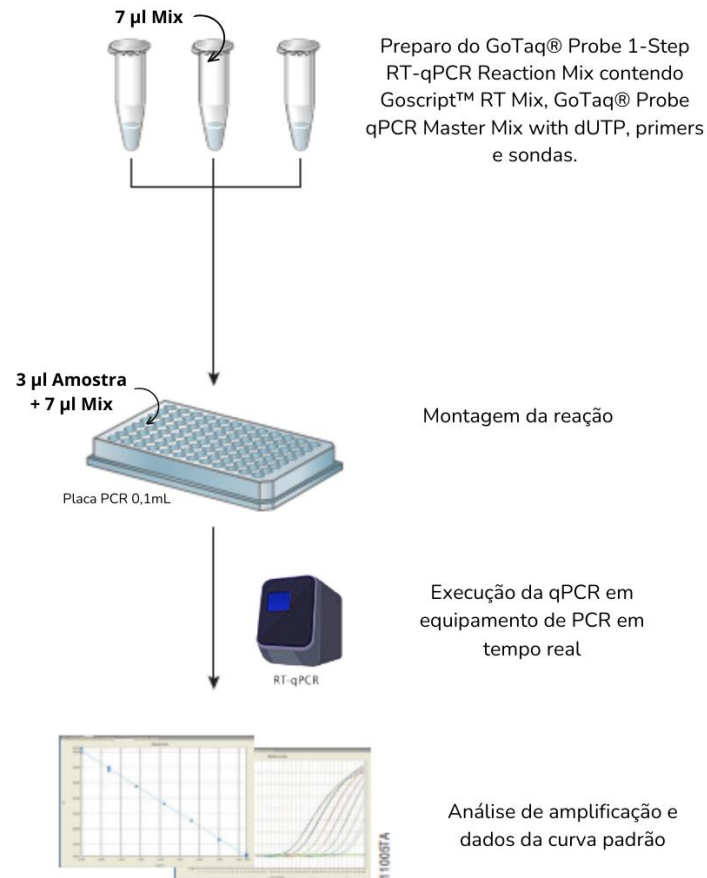
Reagentes	Volume (µL)
Master Mix with dUTP	5,0
GoScript™ RT	0,2
Nuclease-Free Water	1,55
Taqman™ Microbe Assay Type 1(Assay ID Vi99990005_po)	0,25
Total	7,0

Tabela 3-Relação dos reagentes de cada reação de RT-qPCR para RNase P (RP).

Reagentes	Volume (µL)
Master Mix com dUTP	5,0
GoScript™ RT	0,2
Nuclease-Free Water	1,05
Hs_RPP30 Positive Control IDT	0,75
Total	7,0

As amplificações foram realizadas no equipamento de RT-qPCR *QuantStudio™ 5* bloco de 0,1 mL com condições de ciclagem recomendadas pelo fabricante do kit *Promega GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR*, um ciclo de transcrição reversa, em 45°C por 15 minutos, um ciclo de inativação da transcriptase reversa e ativação da GoTaq® DNA polimerase, a 95°C por 2 minutos e quarenta ciclos compostos por 15 segundos de desnaturação a 95°C e 1 minuto de anelamento e extensão das novas cadeias a 60°C.

Figura 11- Fluxo de trabalho das reações de RT-qPCR.

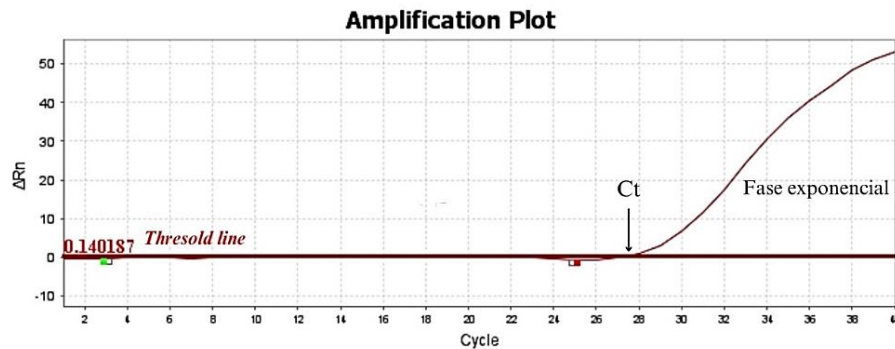


Fonte: Adaptado de Promega (2024) e Da Silva *et. al.* (2020)

4.5 Detecção dos produtos amplificados

As curvas representativas de amplificação da RT-qPCR foram geradas pelo software *QuantStudio™ Design & Analysis v.1.5.2*. Os gráficos (Figura 12) descreveram um padrão sigmoide contemplando as fases linear, exponencial e platô, cujo eixo x, representa o número de ciclos e o eixo y, a intensidade de fluorescência (ΔRn). Outros dois elementos também são importantes, a *threshold line*, linha horizontal definida durante a fase exponencial que intercepta o gráfico acima da linha de base (ou baseline) e, pode ser ajustada de forma manual, porém, normalmente é calculada pelo *software* do equipamento de RT-qPCR; e o C_t (*cycle threshold*) ou limiar de ciclo, que corresponde ao número mínimo de ciclos de RT-qPCR em que o sinal de fluorescência intercepta a *threshold line*, ou seja, ultrapassa o valor dessa linha.

Figura 12- Representação de uma curva de amplificação RT-qPCR dada pelo *QuantStudio*TM.

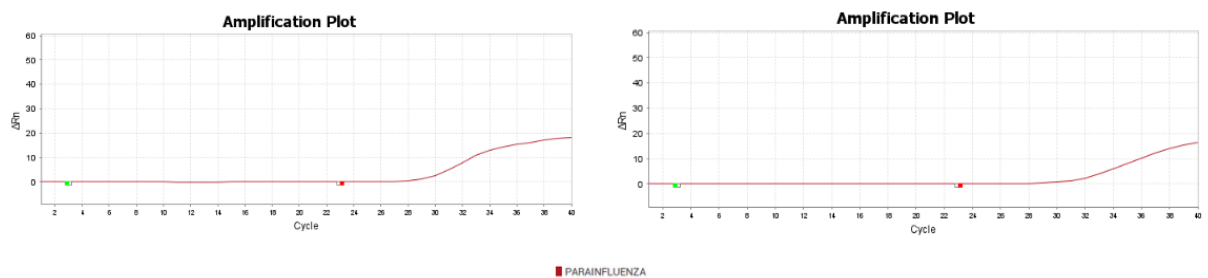


A primeira fase da curva de amplificação, representa o início da reação quando o produto amplificado ainda é insuficiente para emitir sinal detectável acima da fluorescência de fundo ou ruído (linha de base ou *baseline*). Assim, à medida que os ciclos de RT-qPCR ocorrem, a quantidade de produto amplificado aumenta exponencialmente, acompanhado do aumento da fluorescência, proporcional a quantidade do ácido nucleico alvo presente na amostra. No entanto, como longo das reações, os reagentes são consumidos, e, portanto, o sistema estabelece a fase de platô, onde o sinal de fluorescência se estabiliza sem aumentar significativamente com novos ciclos.

4.6 Validação das reações de RT- qPCR

As reações de RT-qPCR de cada uma das amostras clínicas foram consideradas válidas mediante a amplificação do gene de referência humano da RNaseP, e positivas, com as curvas de amplificação apresentando os valores de C_t menores ou iguais a 38 (Figura 13). Quando as amostras não amplificaram a RNaseP humana, as reações foram repetidas para confirmar o comportamento, e, aquelas que continuaram sem amplificá-la foram excluídas do estudo.

Figura 13. Curva de amplificação de uma amostra positiva (à esquerda) e válida pela RNaseP (à direita) dada pelo *QuantStudio*TM.



4.7 Análise Estatística

A análise estatística descritiva foi empregada para descrever as variáveis: sexo, idade e sintomas observados dentre os casos positivos de HPIV. Para essas variáveis, foram calculadas as frequências relativas e a absoluta pelo Software Microsoft® Excel® 2019 MSO (Versão 2024).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população do estudo, inicialmente, compreendia 217 pacientes pertencentes a diferentes faixas etárias, porém dez amostras foram consideradas inválidas por não amplificaram o gene da RNaseP humana, em duas reações consecutivas, que pode indicar a ocorrência de degradação das amostras ou presença de inibidores de PCR e, portanto, excluídas, sendo que uma pertencia a um paciente pediátrico de 4 anos, logo não houveram participantes entre 0-4 anos. Dessa forma, foi obtido o resultado de apenas 207 participantes, dentre os quais 5 eram crianças (5-14 anos), dois deles com 8 anos, um com 13 anos e dois de 14 anos; 8 eram adolescentes (15-17 anos), enquanto, os 194 restantes se distribuíram entre adultos e idosos, sendo 113 entre 18-44 anos, 56 entre 45-64 anos e, por fim, 25 com idade igual ou superior a 65 anos.

A frequência de detecção de HPIV foi de 2,89% (6/207), que está em conformidade com a epidemiologia, especialmente, a dos adultos, de 1-15% (Russell *et. al.*, 2019), que eram maioria em nosso estudo. Contudo, carecem estudos que incluam, tanto pacientes adultos quanto adolescentes, e, portanto, achados semelhantes, uma vez que as taxas de detecção desses vírus são influenciadas pelas faixas etárias.

As diferenças entre os estudos de vigilância epidemiológica, se devem ao perfil da população, duração, época em que foi realizado e pelas metodologias empregadas. Um estudo realizado por Álvarez- Argüelles e colaboradores, na Espanha, em 2018, por exemplo, identificando a incidência de HPIV por meio de RT-qPCR, obtiveram 4,37% (268/ 2326) de amostras positivas para esse vírus, achado esse distinto da taxa de detecção desse estudo, provavelmente pela inclusão de um número maior de crianças e adultos com comprometimento do sistema imune, que representam os principais grupos acometidos como descritos na literatura (Swamy *et al.*, 2016; Rafeek *e. al.*, 2021).

No Brasil, as estimativas de casos positivos de HPIV variam 3,3% a 10,3% a depender do delineamento de cada estudo. Parmezan *et al.* (2016), visando a detecção de HPIV em pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes atendidos em um hospital terciário na cidade de São Paulo, encontraram com RT-qPCR, o vírus em 6,93% (74/1067) das amostras clínicas, potencialmente, pelos critérios de inclusão de um perfil de pacientes considerados de risco as infecções por HPIV, tais como crianças e adultos com comorbidades associadas, mas também imunossuprimidos hospitalizados.

Em Goiânia, Goiás, foram conduzidos dois estudos com populações pediátricas, onde se obtiveram índices mais elevados de detecção quando comparados ao presente estudo. No

primeiro deles, foram detectados 7,2 % de positividade em crianças asmáticas de 4 a 14 anos, distribuídos por entre dois tipos de HPIV (HPIV-1 e HPIV-2) com emprego de imunofluorescência indireta, um ensaio menos sensível quando comparado a RT-qPCR (Costa *et al.*, 2018). No outro estudo, foi observado uma frequência de 8,8% entre crianças internadas em hospitais do município, com suspeita de infecções respiratórias agudas por vírus respiratórios, também, dentre os tipos HPIV, incluindo HPIV-3, com RT-qPCR (Silva *et al.*, 2022).

Os dados epidemiológicos a respeito de HPIV, frequentemente, aparecem secundários em estudos com outros vírus respiratórios, sobretudo influenza (IAV e IVB), SARS-CoV e vírus sincicial respiratório (RSV). As mesmas amostras de *swab* nasofaríngeos desse presente estudo, sob essa perspectiva, também foram submetidas a RT-qPCR para a detecção desses vírus, como parte da extensão do projeto de vigilância epidemiológica do LABVICC, em parceria com a Prefeitura Municipal de Goiânia. Fundamentado -se em diferentes estudos, entre eles de Sanz *et al.* (2022) que relatam a possibilidade de coinfeções entre os vírus respiratórios, sobretudo com influenza, quando o diagnóstico se processa por meio de painéis virais moleculares multiplex, bem como de Lam *et al.* (2019), onde foi feita comparação entre a incidência de HPIV com RSV e influenza, e relatou-se que maior predomínio de HPIV em áreas com maior frequência de casos para RSV, provavelmente pela tendência de ambos infectarem populações mais jovens.

Dentre as faixas etárias avaliadas, em nosso estudo, em ao menos uma amostra o HPIV foi detectado. As populações mais jovens entre 5-14 anos e 15-17 anos, registraram taxas expressivas de HPIV, com 20% (1/5) e 12,5% (1/8) de casos (Tabela 4). Resultado esse, que se comporta como a tendência estimada por um estudo de coorte brasileiro, com registros do Ministério da Saúde, para pacientes dos grupos etários, entre 5-9 anos, 10-14 anos e 15-19 anos, com as frequências de detecção para HPIV, respectivamente, de 7,8%; 3,8% e 0,9% (Menezes *et al.*, 2024).

Quanto aos adultos, houve predomínio de casos positivos, entre idosos com idade superior ou igual a 65 anos, com 4% (1/25), seguido dos adultos entre 45-64 anos, com 3,6% (2/56) e daqueles, com 18-44 anos, 0,9% (1/113), conforme Tabela 4. Esse achado, por sua vez, se aproximou dos dados de prevalência global das infecções por vírus respiratórios entre adultos em cenário da pandemia de COVID-19, de uma revisão sistemática e meta-análise, realizada em 2023 por Schüz e outros colaboradores, que descreveram a distribuição por faixa etária, sendo 1,38%, para 65+ anos; 0,55% para 18-44 anos; e 0,43% para 45-64 anos. No entanto,

como nosso estudo se constituíam em participantes em sua maioria entre 45-64 anos, esse fator pode ter contribuído para uma frequência relativamente maior.

Tabela 4- Resultados da frequência de HPIV em associação com a faixa etária da população.

Variáveis	Amostras para detecção de HPIV (n= 207)	Amostras positivas para HPIV (n=6)
Idade, N (%)		
5-14 anos	5 (2,4%)	1 (20%)
15-17 anos	8 (3,9%)	1 (12,5%)
18- 44 anos	113 (54,6%)	1 (0,9%)
45-64 anos	56 (27,0%)	2 (3,6%)
≥ 65 anos	25(12,1%)	1 (4%)

Entre os pacientes infectados com HPIV, a maioria pertencia ao sexo feminino (Tabela 5), porém não foi possível inferir que as infecções sofram influência pelo fator sexual, pois nesse estudo a proporção de mulheres incluídas foi maior quando comparadas aos homens (130:77), e, potencialmente, esperava-se um número de casos para elas, ligeiramente, maior (3,1%:2,6%), assim como observaram Gregianini e colaboradores (2019), em um estudo retrospectivo de 28 anos, realizado no Rio Grande do Sul, quando analisaram a proporção de casos positivos por sexo em casos de infecções respiratórias aguda, onde 53,24% (1083/2034) representavam mulheres enquanto os homens, 46,76% (951/2034).

Em contrapartida, avaliando o sexo em associação a idade, alguns autores demonstraram uma proporção maior de jovens, do sexo masculino, como Han, J., Suh, W. e Han, S. (2022), que identificaram entre os 12 meses (1 ano) a idade superior ou igual 36 meses (3 anos) até < 19 anos; 58,8% de casos de pacientes do sexo masculino infectados por HPIV (302/514), enquanto, do feminino, 41,2% (212/514), no entanto nesse estudo, esse comportamento não foi evidenciado, uma vez que a nossa população pediátrica (5-14 anos) era composta em sua maioria por mulheres (Tabela 5), com 1,9 % (4/5) e, sendo o único paciente positivo desse grupo nesse sexo (1/5 [25%]).

Tabela 5- Resultados da detecção de HPIV pelas características demográficas, sexo e sua associação com a idade, da população.

Variáveis	Amostras para detecção de HPIV (N=207)	Amostras positivas para HPIV (N=6)
Sexo, N (%)		
Masculino	77(37,2%)	2(2,6%)
Feminino	130 (62,8%)	4(3,1%)
Sexo em associação com idade, N (%)		
Masculino		
5-14 anos	1(0,5%)	-
15-17 anos	6 (2,9%)	1(16,6%)
18-44 anos	46(22,2%)	-
45-64 anos	16 (59,2%)	-
≥ 65 anos	8(3,9%)	1(12,5%)
Feminino		
5-14 anos	4 (1,9%)	1 (25%)
15-17 anos	2 (0,9 %)	-
18-44 anos	67(32,4%)	1 (1,5%)
45-64 anos	40(19,3%)	2(5%)
≥ 65 anos	17 (8,2%)	-

A febre, como um sinal de resposta imunológica para combate de processo infeccioso inespecífico, esteve presente em todas as amostras positivas para HPIV, acompanhada de manifestações típicas de infecções respiratórias, como calafrios (66,7%), dor de garganta (50%), tosse (33,3%), dor de cabeça (33,3%) e dor no corpo (16,6%), como descritos na Tabela 6. Essas apresentações clínicas estão dentre as mais frequentes para HPIV, como demonstraram Gao e colaboradores (2024), com pacientes infectados por HPIV manifestando febre (87,39%), tosse (83,47%), dor de garganta (33,3%), dor de cabeça (14,57%); mas também, Gregianini *et al.* (2019), que entre participantes com infecções respiratórias agudas causadas por HPIV, observaram mais expressivamente, considerando os três tipos de HPIV (HPIV-1, HPIV-2 e HPIV-3), febre (77,9%) e tosse (83,2%). Entretanto, alguns sintomas tendem a prevalecer uns sobre os outros a depender do tipo de HPIV, em questão.

Tabela 6- Manifestações clínicas dos pacientes na população estudada.

Sinais/Sintomas	Amostras para detecção de HPIV (N=207)	Amostras positivas para HPIV (n=6)
Febre	146 (70,5%)	6 (100 %)
Calafrios	62 (29,9%)	4 (66,7%)
Falta de ar	36 (17,4%)	-
Tosse	82 (39,6%)	2 (33,3%)
Dor de Garganta	65 (31,4%)	3(50%)
Dor de cabeça	63 (30,5%)	2 (33,3%)
Dor no corpo	30 (14,5%)	1 (16,6%)
Perda Olfato/Paladar	13 (6,3%)	-
Diarreia	1 (0,5%)	-

A avaliação dos resultados positivos por período de tempo, das amostras de *swab* nasofaríngeos coletadas entre o período de setembro de 2023 a janeiro de 2024, demonstrou que se concentraram dois em novembro, e o restante em dezembro de 2023, que correspondem no Brasil, a primavera e verão. Entretanto, não foi possível definir nenhum padrão de circulação de HPIV, porém como município de Goiânia, compõe o estado de Goiás cujo clima nesses meses se caracteriza por menores temperaturas e maior umidade, que pode contribuir para susceptibilidade a infecções respiratórias e, portanto, propiciaram os resultados positivos. Sob essa lógica, segundo o balanço do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) de novembro de 2023, as médias de temperaturas mínimas foram de 21,8°C, com registro de uma menor temperatura mínima de 18,8 °C e máxima de 25,1°C, e de 157,4 milímetros (mm) de chuva, enquanto, no mês de dezembro, a média foi de 26°C, sendo a menor temperatura mínima 19,5°C e maior 23,9°C, e índice pluviométrico de 708,2 mm (INMET, 2024).

A compreensão da sazonalidade dos vírus parainfluenza, contudo, exibem obstáculos em decorrência do efeito sobre a dinâmica de transmissão desse vírus, provocada por interações entre os sorotipos, as quais não são bem compreendidas, mas também de outros fatores, entre eles epidemiologia (idade média nas infecções, por exemplo) e imunidade (Herauld, Razanajatovo, Viboud, 2019).

Além disso, os relatórios globais de sazonalidade de HPIV, ainda são escassos, contudo, Li *et al.* (2019) descreveram epidemias desses vírus com maior frequência nos meses de primavera e início do verão no hemisfério norte (primavera: março-maio; verão: junho-agosto) e sul (primavera: setembro-novembro; verão: dezembro-fevereiro) e com maior duração

quando comparada as de influenza (IAV e IBV), vírus sincicial respiratório (RSV) e metapneumovírus.

6 CONCLUSÃO

A crescente preocupação com vírus respiratórios, como reflexo de pandemias, entre elas de influenza e COVID-19, permitiu o reconhecimento dos vírus parainfluenza humanos (HPIV) como importantes agentes de infecções respiratórias agudas, em diferentes faixas etárias e países, incluindo o Brasil.

A presente pesquisa de HPIV com 207 swabs nasofaríngeos de pacientes atendidos com sintomas respiratórios no município de Goiânia, Goiás, entre setembro de 2023 e janeiro de 2024, demonstrou um índice de positividade de 2,89%, com predomínio de casos positivos em participantes do sexo feminino, e pelo menos um amostra positiva entre as faixas etárias avaliadas, independentemente do sexo. A febre como sinal de processo infeccioso esteve presente entre todos resultados positivos, e foi acompanhada dos sintomas respiratórios, calafrios (66,7%), dor de garganta (50%), tosse (33,3%), dor de cabeça (33,3%) e dor no corpo (16,6%).

O HPIV foi detectado entre os meses de novembro e dezembro, que representam, um clima no Cerrado com menores temperaturas, sendo menor quente e mais úmido, que pode ter contribuído para os resultados se concentrarem nesse período. No entanto, não foi possível inferir como um padrão de circulação sazonal.

Dessa forma, o estudo contribui com dados epidemiológicos sobre a circulação dos vírus parainfluenza combinada a faixa etária e manifestações clínicas dos pacientes, no município de Goiânia, no Estado de Goiás, os quais podem auxiliar o monitoramento pelos serviços de saúde e o planejamento de políticas públicas para controle e prevenção dos vírus respiratórios.

Outras abordagens em pesquisas epidemiológicas na região Centro-Oeste que incluam a caracterização de HPIV em seus quatro tipos nas variáveis, grupos etários, apresentações clínicas e distribuição por meses ou estações dos anos, e como critérios de inclusão de participantes, as comorbidades adjacentes, admissões hospitalares, desfechos clínicos e coinfeções, em vista das complicações consideráveis desses vírus em crianças pequenas, idosos e imunocomprometidos, são necessárias para compreender os impactos substanciais de HPIV sobre a população e a sua circulação a depender das macrorregiões do estado, mas também, orientar estratégias de prevenção e controle

REFERÊNCIAS

- ADDERSON, E. Human Parainfluenza Viruses (Paramyxoviridae). **Encyclopedia of Virology**. 4 ed. [s.l.]: Elsevier Science, p.4103, 2021.
- ANDREWES, C. H. et al. Para-influenza viruses 1, 2, and 3: Suggested names for recently described myxoviruses. **Virology**, v. 8, n. 1, p. 129–130, maio 1959.
- ANDREWES, C. H.; BANG, F. B.; BURNET, F. M. A short description of the Myxovirus group (Influenza and related viruses). **Virology**, v. 1, p.176-184, 1955.
- ÁLVAREZ-ARGÜELLES, M. E. et al. New clinical and seasonal evidence of infections by Human Parainfluenza Virus. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 11, p. 2211–2217, nov. 2018.
- BRANCHE, A.; FALSEY, A. Parainfluenza Virus Infection. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 37, n. 04, p. 538–554, 3 ago. 2016.
- CHANOCK, R. M. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 104, n. 4, p. 555–576, 1 out. 1956.
- CHANOCK, R. M. et al. Newly Recognized Myxoviruses from Children with Respiratory Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 258, n. 5, p. 207–213, 30 jan. 1958.
- CHIBANGA, V. P. *et al.* New antiviral approaches for human parainfluenza: Inhibiting the haemagglutinin-neuraminidase. **Antiviral Research**, v. 167, p. 89–97, jul. 2019.
- COSTA, L. D. C. et al. Asthma exacerbations in a subtropical area and the role of respiratory viruses: a cross-sectional study. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 18, n. 1, p. 109, dez. 2018.
- DA SILVA, S. J. R. et al. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 2319–2336, 11 set. 2020.
- ELBOUKARI, H.; ASHRAF, M. **Parainfluenza Virus**. [s.l.]: StatPearls, 17 jul., 2023.
- FARAHMAND, M. et al. The landscape of extrapulmonary manifestations of human parainfluenza viruses: A systematic narrative review. **Microbiology and Immunology**, v. 65, n. 1, p. 1–9, jan. 2021.
- GAO, Y. et al. Epidemiological Characteristics of Human Parainfluenza Viruses Infections — China, 2019–2023. **China CDC Wkly**, v. 6, n.12, p.235-241, 22 mar. 2024
- GHELICHKHAN, M. et al. Establishment of reverse transcription polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of human parainfluenza virus types 1 to 4 in children with influenza like illnesses. **Bratislava Medical Journal**, v. 118, n. 12, p. 772–776, 2018.
- GREGIANINI, T. S. et al. A 28-year study of human parainfluenza in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 91, n. 8, p. 1423–1431, ago. 2019.
- HAN, J. Y.; SUH, W.; HAN, S. B. Seasonal epidemiological and clinical characteristics of pediatric patients with human parainfluenza virus infection by serotype: a retrospective study. **Virology Journal**, v. 19, n. 1, p. 141, 6 set. 2022.
- HERAUD, J.-M.; RAZANAJATOVO, N. H.; VIBOUD, C. Global circulation of respiratory viruses: from local observations to global predictions. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 8, p. e982–e983, ago. 2019.

- INDUMATHI, C. et al. Isolation & molecular characterization of human parainfluenza virus in Chennai, India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 142, n. 5, p. 583, 2015.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA-INMET. **Balço do verão 2023/2024 em Goiânia (GO)**. Brasília-DF, 25 mar. 2024.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA-INMET. **Balço do mês de novembro de 2023 em Goiânia (GO)**. Brasília-DF, 08 dez. 2023.
- ISON, M.G.; NELSON, L. Noninfluenza Respiratory Viruses. **Infectious Diseases**. 4 ed. [s.l.]: Elsevier. v.2, p. 1472-1482.e5, 2017.
- KARRON, R. A. et al. Evaluation of a Live-Attenuated Human Parainfluenza Virus Type 2 Vaccine in Adults and Children. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 12, n. 3, p. 173–176, 18 abr. 2023.
- KNIPE, D.M. et al. **Fields Virology**. 6ed. [s.l.]: Wolters Kluwer Health, v.1, p.2664, 2013.
- KNIPE, D.M. et al. **Fields Virology**. 5ed. [s.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, p. 3177, 2007.
- LAM, T. T. et al. Comparative global epidemiology of influenza, respiratory syncytial and parainfluenza viruses, 2010–2015. **Journal of Infection**, v. 79, n. 4, p. 373–382, out. 2019.
- LI, Y. et al. Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 8, p. e1031–e1045, ago. 2019.
- LIU, G. et al. Detection of six common human paramyxoviruses in patients with acute febrile respiratory symptoms using a novel multiplex real-time RT-PCR assay. **Journal of Medical Virology**, v. 91, n. 4, p. 564–569, abr. 2019.
- MARCINK, T. C.; POROTTO, M.; MOSCONA, A. Parainfluenza virus entry at the onset of infection. **Advances in Virus Research**, v. 111, p. 1–29, 2021.
- MARCINK, T. C. et al. Hijacking the Fusion Complex of Human Parainfluenza Virus as an Antiviral Strategy. **mBio**, v. 11, n. 1, p. e03203-19, 25 fev. 2020.
- MENEZES, R. C. et al. Severe viral lower respiratory tract infections in Brazilian children: Clinical features of a national cohort. **Journal of Infection and Public Health**, v. 17, n. 1, p. 1–9, jan. 2024.
- PAI, M.-C. et al. Clinical characteristics and risk factors of severe human parainfluenza virus infection in hospitalized children. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. S1684118224000793, maio 2024.
- PARMEZAN, S. N. et al. Detection of parainfluenza virus in immunocompromised and immunocompetent patients in a tertiary hospital in Sao Paulo, Brazil. **Revista chilena de infectología**, v. 33, n. 5, p. 501–504, out. 2016.
- PAWELCZYK, M.; KOWALSKI, M. L. The Role of Human Parainfluenza Virus Infections in the Immunopathology of the Respiratory Tract. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 17, n. 3, p. 16, mar. 2017.
- PROMEGA CORPORATION. **GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System**. Technical manual: Instructions for Use of Products A6120 and A6121, jan. 2024.

- RAFEEK, R. et al. Epidemiological and clinical characteristics of children with human parainfluenza virus associated acute respiratory infection in a general hospital in Sri Lanka. **Journal of Clinical Virology Plus**, v. 1, n. 4, p. 100049, dez. 2021.
- RHEEM, I. et al. Evaluation of a Multiplex Real-time PCR Assay for the Detection of Respiratory Viruses in Clinical Specimens. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 32, n. 6, p. 399–406, 1 nov. 2012.
- RIMA, B. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Paramyxoviridae*. **Journal of General Virology**, v.100, n.12, p. 1593- 1594, 14 out. 2019.
- ROCHA-FILHO, C. R. et al. Economic burden of respiratory syncytial and parainfluenza viruses in children of upper-middle-income countries: a systematic review. **Jornal de Pediatria**, v. 99, n. 6, p. 537–545, nov. 2023.
- ROY, J. et al. Small RNA proteome as disease biomarker: an incognito treasure of clinical utility. **AGO-driven Non-Coding RNAs**. [s.l.]: Elsevier, p.101-136, 2019.
- RUSSELL, E. et al. Parainfluenza Virus in Hospitalized Adults: A 7-Year Retrospective Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 2, p. 298–305, 7 jan. 2019.
- SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Virologia Humana**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- SANZ, I. et al. Coinfections of influenza and other respiratory viruses are associated to children. **Anales de Pediatría (English Edition)**, v. 96, n. 4, p. 334–341, abr. 2022.
- SCHÜZ, M. L. et al. Global prevalence of respiratory virus infections in adults and adolescents during the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 137, p. 16–24, dez. 2023.
- SHEN, C.-H. Amplification of Nucleic Acids. **Diagnostic Molecular Biology**. [s.l.] Elsevier. p. 215–247, 2019.
- SILVA, P. A. N. et al. Influenza and other respiratory viruses in children: prevalence and clinical features. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 41, n. 12, p. 1445–1449, dez. 2022.
- SWAMY, M. A. et al. Distribution and Trends of Human Parainfluenza Viruses in Hospitalised Children. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 83, n. 10, p. 1109–1113, out. 2016.
- TERLIZZI, M. E. et al. Quantitative RT Real Time PCR and indirect immunofluorescence for the detection of human parainfluenza virus 1, 2, 3. **Journal of Virological Methods**, v. 160, n. 1–2, p. 172–177, set. 2009.
- TRAWALLY, M. et al. Antiviral Properties of 5-Sulfamoyl-1H-Indole-Linked Spirothiazolidinone Derivatives: A Study on Human Parainfluenza Virus-2. **Journal of Research in Pharmacy**, v. 28, n. 28, p. 213–224, 2024.
- WANG, X. et al. Global burden of acute lower respiratory infection associated with human parainfluenza virus in children younger than 5 years for 2018: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 9, n. 8, p. e1077–e1087, ago. 2021.