



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

ANNIELY CARVALHO REBOUÇAS OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM
POPULAÇÃO PEDIÁTRICA EM GOIÂNIA, GOIÁS**

**Goiânia
2016**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, 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.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):		Anniely Carvalho Rebouças Oliveira			
E-mail:		annielyreboucas@gmail.com			
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		☒ Sim		☐ Não	
Vínculo empregatício do autor		Bolsista			
Agência de fomento:		Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior		Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	00889834/0001-08
Título:		Investigação Molecular de Vírus Respiratórios em População Pediátrica em Goiânia, Goiás			
Palavras-chave:		Vírus respiratórios; População pediátrica; Multiplex-PCR			
Título em outra língua:		Molecular investigation of respiratory viruses in pediatric population in Goiânia, Goiás			
Palavras-chave em outra língua:		Respiratory viruses; Pediatric population; Multiplex PCR			
Área de concentração:		Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro			
Data defesa: (08/04/2016)					
Programa de Pós-Graduação:		Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro			
Orientador (a):		Fabiola Souza Fiaccadori			
E-mail:		fabiolasf@gmail.com			
Co-orientador (a):*					
E-mail:					

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

ANNIELY CARVALHO REBOUÇAS OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM
POPULAÇÃO PEDIÁTRICA EM GOIÂNIA, GOIÁS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Fabíola Souza Fiaccadori

**Goiânia
2016**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Oliveira, Anniely Carvalho Rebouças
Investigação Molecular de Vírus Respiratórios em População Pediátrica
em Goiânia, Goiás [manuscrito] / Anniely Carvalho Rebouças Oliveira.
2016.
xiv, 102 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Fabiola Souza Fiaccadori.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2016.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Vírus respiratórios. 2. População pediátrica. 3. Multiplex-PCR. I.
Fiaccadori, Fabiola Souza, orient. II. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Anniely Carvalho Rebouças Oliveira

Orientador (a): Fabíola Souza Fiaccadori

Membros:

1. Prof.^a. Dr.^a. Fabíola Souza Fiaccadori

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

3. Prof.^a. Dr.^a. Regina Maria Bringel Martins

Data: 08/04/2016

Aos meus pais **Valdeir Rebouças de Oliveira e Neomar Maria de Carvalho**, pelo cuidado, preocupação e amor a mim dedicados.

À minha orientadora **Fabíola Souza Fiaccadori**, pelos ensinamentos, amizade, confiança e oportunidade.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori. Obrigada pela oportunidade e convivência diária, por ser responsável por um grande crescimento meu (pessoal e acadêmico), pela paciência, amizade, dedicação e generosidade. Tenho muito orgulho de ter você como parte da minha história, sempre será um exemplo de professora, de profissional e de pessoa para mim.

À Prof. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza, Prof. Dra. Divina das Dôres de Paula Cardoso e Dra. Keili Maria Cardoso de Souza. Obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo aprendizado.

À todos aqueles colegas que passaram pelo Laboratório de Virologia Humana com os quais tive a oportunidade de conviver: Dayane, Charles, Pedro, Romário, Raíssa, Hugo, Kareem, Luciana, Vanessa, Thatielly, Elisa, Driele, Thainara Calixto, Terezinha, João Paulo, João Paulo Gomes, Ítalo, Thairiny e em especial ao Marieltom, Nathânia, Tâmera, Thaís Santana, Thaynara Nogueira, Francielly e Marina, obrigada a todos pela amizade, ensinamentos, experiências compartilhadas e companheirismo.

À toda minha família, especialmente aos meus pais pelo constante apoio, amor e ensinamentos a mim oferecidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro (PPGBRPH) pela oportunidade.

À Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	VI
FIGURAS.....	VIII
QUADROS E TABELAS.....	IX
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Infecções do trato respiratório.....	01
1.2 Principais vírus respiratórios.....	03
1.2.1 Família <i>Orthomyxoviridae</i>	03
1.2.2 Família <i>Paramyxoviridae</i>	08
1.2.3 Família <i>Coronaviridae</i>	13
1.2.4 Família <i>Picornaviridae</i>	16
1.2.5 Família <i>Parvoviridae</i>	19
1.2.6 Família <i>Adenoviridae</i>	21
1.3 Aspectos clínicos das infecções respiratórias virais.....	22
1.4 Diagnóstico laboratorial dos vírus respiratórios.....	25
1.5 Prevenção e Tratamento das ITRs virais.....	29
1.6 Epidemiologia das infecções por vírus respiratórios.....	31
2 JUSTIFICATIVA.....	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 Delineamento e População do Estudo.....	41
4.2 Coleta e Preparo das Amostras Clínicas.....	42
4.3 Triagem Molecular.....	44
4.3.1 Extração do Material Genético.....	44
4.3.2 Transcrição Reversa.....	44
4.3.3 Reação em Cadeia pela Polimerase.....	44
4.3.4 Eletroforese em Gel de Agarose.....	48
4.4 Análises Estatísticas.....	48
5 RESULTADOS.....	49
6 DISCUSSÃO.....	57
7 CONCLUSÕES.....	68

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXOS.....	96
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	96
Anexo B – Ficha de Investigação Clínica.....	99
Anexo C – Parecer do Comitê de Ética... ..	101

FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do trato respiratório.....	01
Figura 2	Pandemias causadas pelo vírus influenza nos últimos cem anos	06
Figura 3	Fatores que influenciam na infecção respiratória viral e impacto da infância.....	24
Figura 4	Fluxograma do estudo.....	43
Figura 5	Distribuição dos vírus respiratórios pesquisados.....	50
Figura 6	Distribuição dos vírus respiratórios identificados por faixa etária.....	51
Figura 7	Distribuição viral em relação aos grupos de estudo, grupo sintomático (A) e grupo assintomático (B).....	53
Figura 8	Variação do índice de detecção viral durante os meses de estudo em relação à precipitação pluviométrica (A), temperatura média mensal (B) e umidade relativa do ar (C).....	54
Figura 9	Distribuição dos vírus respiratórios identificados durante os meses de estudo.....	55

QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Propriedades gerais dos principais vírus respiratórios.....	03
Quadro 2	Principais genes alvos utilizados para detecção molecular dos vírus respiratórios.....	29
Quadro 3	Levantamento de estudos de detecção viral em amostras respiratórias.....	36
Quadro 4	Sequências dos Iniciadores utilizados na reação PCRMVR1	45
Quadro 5	Sequências dos Iniciadores utilizados na reação PCRMVR2	46
Quadro 6	Sequências dos Iniciadores utilizados na reação PCRMVR3	47
Tabela 1	Características da população e índice de positividade viral nas amostras pesquisadas.....	49
Tabela 2	Positividade viral em relação às características da população para os dois grupos de estudo.....	52
Tabela 3	Manifestações clínicas descritas no grupo sintomático e positividade viral.....	52
Tabela 4	Amostras positivas para mais de um vírus.....	56

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AS	Ácido siálico
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
E	Envelope
EV	Enterovírus
F	Proteína de fusão
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLU	Vírus influenza
GO	Goiás
HA	Hemaglutinina
HAdV	Adenovírus humanos
HBoV	Bocavírus humanos
HCoV	Coronavírus humanos
HE	Hemaglutinina-esterase
HN	Hemaglutinina-neuraminidase
HMI	Hospital Materno Infantil de Goiânia
hMPV	Metapneumovírus humanos
HRV	Rinovírus humanos
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IPTSP/UFG	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás
ITR	Infecção do trato respiratório
ITRI	Infecção do trato respiratório inferior
ITRS	Infecção do trato respiratório superior
Kb	<i>Kilobase</i>
M	Matriz
MEM	Meio essencial mínimo
MERS	<i>Middle East respiratory syndrome</i> – Síndrome respiratória do Oriente Médio

µg	Micrograma
µL	<i>Microlitro</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NA	Neuraminidase
nm	Nanômetro
NP	Nucleoproteína
NS	<i>Nonstructural protein</i> - Proteína não estrutural
NT	Nucleotídeo
ORF	<i>Open reading frame</i> – Região de leitura aberta
P	Fosfoproteína
PA	Polimerase ácida
Pb	Pares de base
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase básica 2
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia pela polimerase
PIV	Vírus parainfluenza
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RPM	Rotação por minuto
RSV	Vírus sincicial respiratório
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia pela polimerase via transcrição reversa
S	Espícula
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> – Síndrome respiratória aguda grave
TRI	Trato respiratório inferior
TRS	Trato respiratório superior
UR	Umidade relativa do ar
UTR	<i>Untranslated Region</i> – Região não traduzida

WHO

World Health Organization - Organização Mundial da Saúde

RESUMO

As infecções do trato respiratório (ITRs) representam importante causa de morbimortalidade em todo o mundo, sendo os vírus importantes agentes etiológicos. Estima-se que grande parte das crianças menores de cinco anos de idade tenha a cada ano de quatro a seis ITRs, sendo esta causa comum de hospitalização, especialmente em países em desenvolvimento. No Brasil, em particular na Região Centro-Oeste, estudos que avaliem a circulação de vírus respiratórios em população pediátrica são escassos. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de diferentes vírus respiratórios em população pediátrica de Goiânia-Goiás, apresentando ou não quadro sintomático respiratório. Durante o período de maio/2014 a maio/2015, foram coletadas amostras de *swab* respiratório de crianças entre zero e seis anos de idade, apresentando quadro de infecção respiratória ou assintomáticas para a mesma, atendidas no Hospital Materno Infantil, em Goiânia. As amostras foram submetidas à triagem molecular para 16 vírus respiratórios por meio de três protocolos de multiplex *nested*-PCR. No total, 251 amostras foram coletadas, das quais 90 (35,9%) apresentaram positividade para pelo menos um agente respiratório, sendo rinovírus (31%), vírus sincicial respiratório (27,4%) e parainfluenza (13,3%) os mais frequentes. Crianças com até dois anos de idade apresentaram maior positividade global, contudo sem diferença estatística. Índice de detecção semelhante foi observado entre os grupos sintomático (37%) e assintomático (34,5%). Para as crianças do grupo sintomático, foram mais afetadas aquelas cujas amostras foram coletadas durante período de seca ($p<0,05$) e aquelas com até dois anos de idade ($p<0,05$). No grupo assintomático, nenhuma diferença estatística foi observada. Foi observado índice de co-deteção de 6,4% (16/251), sendo a maioria de indivíduos sintomáticos (13/16) ($p<0,05$). A avaliação do perfil temporal demonstrou maior índice de detecção nos meses de seca, com menor precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperaturas mais frias. Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a importância dos vírus respiratórios na população pediátrica, auxiliando na compreensão dos fatores epidemiológicos e temporais associados aos diferentes patógenos em nossa região. Desta forma, abrem caminhos para novos estudos no estado de Goiás, fornecendo ainda informações que auxiliem na construção de medidas de controle e prevenção mais eficazes contra estas infecções.

Palavras Chave: Vírus respiratórios, População pediátrica, Multiplex-PCR.

ABSTRACT

The acute respiratory infections (ARIs) are an important cause of morbidity and mortality worldwide. Viruses have an important role in the etiology of the respiratory infections. Children less than five years of age have about four to six ARIs per year and this is a common cause of hospitalization, mainly in developing countries. In Brazil, particularly in the West-Central region, studies that evaluated the circulation of respiratory viruses in the pediatric population are scarce. Thus, this study aimed to investigate the occurrence of respiratory viruses in the pediatric population, from Goiânia-Goiás. Between May/2014 and May/2015, samples of nasal swabs were collected from children from zero to six years of age presenting or not respiratory symptoms, attended at the Materno Infantil hospital in Goiânia. For the molecular screening, 16 viruses were investigated using three Multiplex Nested-PCR protocols. It two hundred and fifty one samples were collected, of which 90 (35,9%) were positive for at least one respiratory agent, being rhinovirus (31%), respiratory syncytial virus (27,4%) and parainfluenza virus (13,3%) the most prevalent. Children under two years of age had greater overall positive, although not statistically significant. Similar detection rate was observed among the groups symptomatic (37%) and asymptomatic (34,5%). For the symptomatic group, children whose samples were collected during the dry period ($p<0,05$) and those with up to two years of age were most affected ($p<0,05$). In the asymptomatic group no statistical difference was observed. It was observed rate of co-detection of 6,4% (16/251), mostly in samples of symptomatic patients (13/16) ($p<0,05$). The evaluation of the temporal profile showed a higher detection rate during the dry season, less rainfall, relative humidity and cooler temperatures. The results reinforce the importance of respiratory viruses in children and contribute to further understanding of the epidemiological and temporal factors associated with different pathogens in our region. Thus, they open the way to new studies in the state of Goiás, also providing information to assist in the construction of control measures and more effective prevention of these infections.

Keywords: Respiratory viruses, Pediatric population, Multiplex-PCR

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções do trato respiratório

As infecções do trato respiratório (ITRs) representam importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo responsáveis por mais de quatro milhões de óbitos anualmente e afetam, principalmente, crianças e idosos (Ruuskanen et al. 2011, Falsey et al. 2014, WHO 2014a). Estudos relatam que crianças menores de cinco anos de idade têm a cada ano, em média, de quatro a seis infecções do trato respiratório. As ITRs têm sido consideradas a causa mais comum de hospitalização infantil em países em desenvolvimento (Nair et al. 2013, Niederman & Krilov 2013).

De acordo com o sítio anatômico, as ITRs são divididas em infecções do trato respiratório superior (ITRS) ou infecções do trato respiratório inferior (ITRI). As ITRSs incluem infecções que afetam nasofaringe, laringe e tonsila, enquanto as ITRIs se referem às infecções que atingem traqueia, brônquio, bronquíolos e alvéolos (Figura 1). De maneira geral, em indivíduos imunocompetentes, a maioria das infecções se restringe ao trato respiratório superior e tem caráter autolimitado (Tregoning & Schwarze 2010, Pavia 2011).

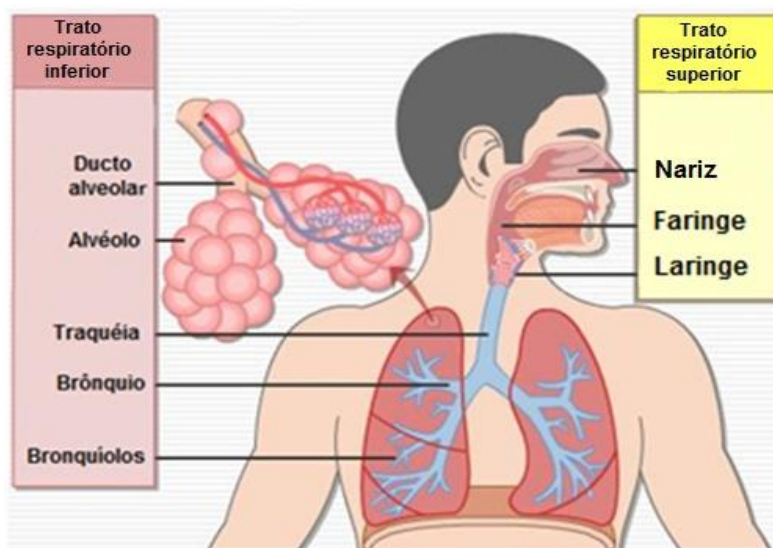


Figura 1. Representação esquemática do trato respiratório.

Fonte: <http://www.iaquk.org.uk/ResourcesRespiratory.html> (Adaptado).

As ITRSs abrangem manifestações como tosse, coriza, rinite, sinusite, laringite e faringite, podendo ocorrer dores de ouvido no caso de otite média

(Chonmaitree et al. 2008, Stover & Litwin 2014). Com relação às ITRIs, geralmente são mais graves e estão relacionadas com a região afetada. As síndromes associadas incluem pneumonia, bronquite, bronquiolite e crupe, incluindo sintomas como falta de ar, sibilância e febre, podendo também estar relacionados com exacerbação de doenças crônicas, como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Pavia 2011).

Uma grande variedade de agentes tem sido encontrada em associação a quadros respiratórios, tais como vírus, bactérias e fungos (Zumla et al. 2014, WHO 2014a). Neste contexto, os vírus possuem grande relevância, sendo responsáveis por grande parte das infecções respiratórias em todos os grupos etários, com impacto substancial em população pediátrica, idosos e indivíduos imunocomprometidos (Seo et al. 2014, WHO 2015).

As infecções respiratórias em geral possuem sintomatologia pouco variável, não sendo possível a definição do agente etiológico considerando apenas os sinais clínicos (Nichols et al. 2008, Pavia 2011). Dessa forma, o diagnóstico laboratorial torna-se importante no contexto das ITRs, uma vez que a identificação do patógeno auxilia no direcionamento do tratamento e manejo da infecção. Fatores como a pouca disponibilidade de antivirais e o desconhecimento dos eventos adversos em consequência do uso inadequado de medicamentos contribuem para uma realidade onde a prescrição inadequada de antibióticos é frequente (Del Fiol et al. 2010, Zaas et al. 2014, Sharma et al. 2015). O uso excessivo de antibióticos e a duração prolongada destes tratamentos estão associados com a resistência bacteriana, com impacto direto à comunidade gerando elevados custos econômicos e acarretando riscos ao indivíduo, por ocorrência de reações adversas (Kronman et al. 2014, Schroeck et al. 2015).

Visto que os vírus estão presentes em até 80% das ITRs em população pediátrica (Niederman & Krilov 2013), torna-se necessária uma revisão das práticas e critérios estabelecidos para avaliação e diagnóstico destes quadros, considerando a realização de testes laboratoriais, essenciais para o direcionamento mais preciso de terapias, com reflexo na diminuição do uso de antibióticos (Gilani et al. 2012). Ademais, o estudo da circulação de tais patógenos é importante, em termos de comunidade ou ambiente hospitalar, para a otimização de medidas de controle e prevenção destas infecções (Zaas et al. 2014, Sharma et al. 2015).

1.2 Principais vírus respiratórios

No contexto das infecções respiratórias virais, a maioria apresenta evolução aguda e os principais agentes estão agrupados em seis famílias (Quadro 1). Os vírus com maior relevância são: vírus influenza (FLU A, B e C), vírus parainfluenza (PIV-1, PIV-2, PIV-3 e PIV-4), vírus sincicial respiratório (RSV), adenovírus (HAdV), rinovírus (HRV), coronavírus (HCoV) e enterovírus (EV), além dos mais recentemente descritos bocavírus (HBoV) e metapneumovírus (hMPV) (van den Hoogen et al. 2001, Allander et al. 2005, Tregoning & Schwarze 2010, Walker et al. 2013).

Quadro 1 – Propriedades gerais dos principais vírus respiratórios.

Família	Vírus	Material Genético	Partícula Viral
<i>Orthomyxoviridae</i>	Vírus Influenza	ssRNA (-) segmentado (890pb – 2,3kb)	~100nm Envelopado
<i>Paramyxoviridae</i>	Vírus Parainfluenza Vírus Sincicial Respiratório Metapneumovírus	ssRNA (-) (13,2 – 17,4kb)	150 – 600nm Envelopado
<i>Coronaviridae</i>	Coronavírus	ssRNA (+) (27 – 32kb)	100-160nm Envelopado
<i>Picornaviridae</i>	Enterovírus Rinovírus	ssRNA (+) (7,2 – 8,5kb)	~30nm Desnudo
<i>Parvoviridae</i>	Bocavírus	ssDNA (~5kb)	~25nm Desnudo
<i>Adenoviridae</i>	Adenovírus	dsDNA (~36kb)	70-90nm Desnudo

1.2.1 Família *Orthomyxoviridae*

A família *Orthomyxoviridae* compreende seis gêneros, sendo os agentes etiológicos de infecção em humanos classificados nos gêneros *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C* (ICTV 2014). O vírus influenza humano foi isolado inicialmente em 1933 a partir de lavados de nasofaringe inoculados em furões, e por ser o primeiro influenza humano isolado, foi nomeado influenza A (FLU A) (Smith et al.

1933). Em 1940, um vírus antigenicamente distinto foi descrito e denominado influenza B (FLU B), e o influenza C (FLU C) foi isolado em 1947 (Francis 1940, Taylor 1951).

Os vírus influenza (FLU A, B e C) são envelopados, possuem estrutura pleomórfica e diâmetro médio de 100 nanômetros (nm). Do envelope viral dos vírus FLU A se projetam as proteínas hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA) e proteína de canal iônico M2 (Schulze 1970, Taubenberger & Kash 2010). O FLU B possui quatro proteínas inseridas no seu envelope (HA, NA, NB e BM2) e as proteínas HEF e CM2 estão presentes no envelope dos vírus FLU C (Nakada et al. 1984, Brassard et al. 1996, Pekosz & Lamb 1997, Odagiri et al. 1999). Internamente, o envelope dos vírus influenza é revestido pela proteína M1, que compõe a matriz. O *core* dos vírus é composto pelo complexo RNP (ribonucleoproteína), que compreende o material genético associado à nucleoproteína (NP) e proteínas polimerase (polimerase básica 1 – PB1, polimerase básica 2 – PB2, polimerase ácida – PA) (Compans et al. 1972, Bouvier & Palese 2008). A proteína não-estrutural NEP/NS2 também está presente no interior da partícula viral (Richardson & Akkina 1991). A proteína NS1 apesar de não compor estruturalmente a partícula viral é produzida em altos níveis em células infectadas (Hale et al. 2008).

O material genético é composto por ácido ribonucleico (RNA) unifilamentar, segmentado e polaridade negativa. O genoma dos vírus FLU A e FLU B possui oito segmentos de RNA, onde os três segmentos maiores (2,3kb - kilobases, 2,3 kb e 2,2 kb respectivamente) codificam as proteínas polimerase, o quarto (1,7 kb), quinto (1,5 kb) e sexto (1,4 kb) codificam HA, NP e NA/NB respectivamente. O sétimo segmento, de 1,0 kb, codifica as proteínas M1 e M2 (e BM2 para FLU B), o último segmento (890 pb - pares de bases) codifica as proteínas NS1 e NEP/NS2 (Palese 1977, Racaniello & Palese 1979, Tsai & Chen 2011). O genoma do FLU C possui sete segmentos, com os três maiores também codificando as proteínas polimerases. O quarto, quinto e sexto segmentos codificam as proteínas HEF, NP e CM2, respectivamente. Por fim, o sétimo segmento codifica NS1 e NEP/NS2 (Muraki & Hongo 2010).

Todos os segmentos genômicos possuem nas extremidades 3' e 5' sequências não codificantes (*Untranslated Region*- UTR) altamente conservadas (Desselberger et al. 1980). A região codificante dos genes das glicoproteínas de superfície virais, HA e NA, possuem sequências altamente variáveis, que refletem a rápida taxa de mutação pontual. Entretanto, a proteína HA possui estrutura e função notavelmente conservadas entre os subtipos. As sequências das proteínas NS1, NS2 e

em menor medida M2, também apresentam elevada variabilidade. Em contraste, as proteínas da polimerase (PB2, PB1 e PA), assim como NP e M1, possuem regiões altamente conservadas (Heiny et al. 2007, Mahony 2008).

Os vírus influenza A apresentam maior variabilidade comparados ao vírus influenza B e C, sendo, portanto, divididos em diferentes subtipos e caracterizados segundo as glicoproteínas de superfície, HA e NA (Webster 1992, Webster & Gorvokova 2014). Embora tenham sido identificados 18 subtipos antigênicos para a hemaglutinina (H1-18) e 11 subtipos diferentes da neuraminidase (N1-11), apenas alguns subtipos têm circulado amplamente na população humana, destacando-se H1N1, H1N2, H2N2 e H3N2 (WHO 2014b, Wu et al. 2014).

Um fator que contribui para a variabilidade do vírus FLUA é a existência de amostras circulantes em outras espécies animais, as quais, por meio de frequentes mutações pontuais podem eventualmente romper barreiras interespecies, se adaptando a novos hospedeiros (Taubenberger & Kash 2010). FLUA tem sido isolado de diversos animais, como aves aquáticas, consideradas reservatórios naturais de todos os subtipos, com exceção dos subtipos H17N10 e H18N11 que foram encontrados somente em morcegos (Tong et al. 2013, Neumann & Kawaoka 2015). Outros animais como aves domésticas, suínos, equinos e cachorros também são considerados hospedeiros de determinadas variantes (Parrish et al. 2015).

Os eventos associados a mutações e aqueles que conferem a alta variabilidade de amostras virais e a possibilidade de combinações entre HA e NA são denominados *drift* e *shift*. O *drift* é caracterizado por mutações pontuais ao longo do genoma, que ocorrem durante a replicação viral, e que podem garantir vantagens sobre o sistema imune do hospedeiro, entre outros benefícios, sendo responsáveis por epidemias sazonais de menor gravidade (Schweiger et al. 2002). Por outro lado, o *shift* se refere a variações mais significativas resultantes do rearranjo genético de um segmento inteiro do genoma entre diferentes variantes virais que se encontram em uma mesma célula, podendo gerar novas combinações de segmentos, sendo mais frequentes para HA/NA. Este mecanismo permite a ocorrência de variantes para as quais, muitas vezes, a população humana tem pouca ou nenhuma imunidade e ocasionalmente resulta em uma pandemia (Carrat & Flahault 2007, Webster & Gorvokova 2014).

Nos últimos 500 anos, acredita-se que tenham ocorrido pelo menos 14 pandemias, das quais cinco ocorreram nos últimos 100 anos (Figura 2) (Taubenberger & Morens 2010, Webster & Gorvokova 2014). Em 1918 ocorreu a considerada pior

pandemia da história, responsável por mais de 50 milhões de mortes em todo o mundo. O vírus responsável por esta pandemia se originou de um hospedeiro aviário e resultou em uma nova variante (H1N1) circulante entre hospedeiros humanos até 1957, quando foi substituída por um novo subtipo (H2N2) derivado do rearranjo de vírus aviários e o H1N1 previamente circulante (Taubenberger et al. 2012). O H2N2 causou a pandemia asiática e circulou entre humanos por aproximadamente dez anos, sendo substituído em 1968 por um novo vírus resultante da combinação entre o H2N2 e outro influenza aviário, gerando o pandêmico H3N2 (Taubenberger & Kash 2010). A pandemia de 1968 resultou em mais de um milhão de mortes e o H3N2 ainda circula em humanos (Horimoto & Kawaoka 2005). Em 1977 a re-emergência do H1N1 de 1918 foi responsável por uma pandemia de menor escala e o vírus se tornou sazonal, sendo substituído pelo H1N1 pandêmico de 2009 (Neumann & Kawaoka 2015).

O novo vírus H1N1 pandêmico emergiu no México e Califórnia em abril de 2009 e disseminou-se rapidamente por todo o mundo causando a primeira pandemia do século XXI. Análises moleculares demonstraram que esse patógeno possuía segmentos advindos de vírus aviários (PA e PB2), humanos (PB1), suínos clássicos (HA, NP e NSP) e suínos da Eurásia (NA e M), sendo geneticamente relacionado com vírus que circulavam entre porcos (Girard et al. 2010). Este agente estabeleceu uma nova linhagem em humanos e atualmente cocircula com outros subtipos (Neumann & Kawaoka 2015). Nos últimos anos, os subtipos aviários H5N1 e H7N9 têm infectado centenas de pessoas, causando índices médios de mortalidade de 60% e 30%, respectivamente (Neumann & Kawaoka 2015).

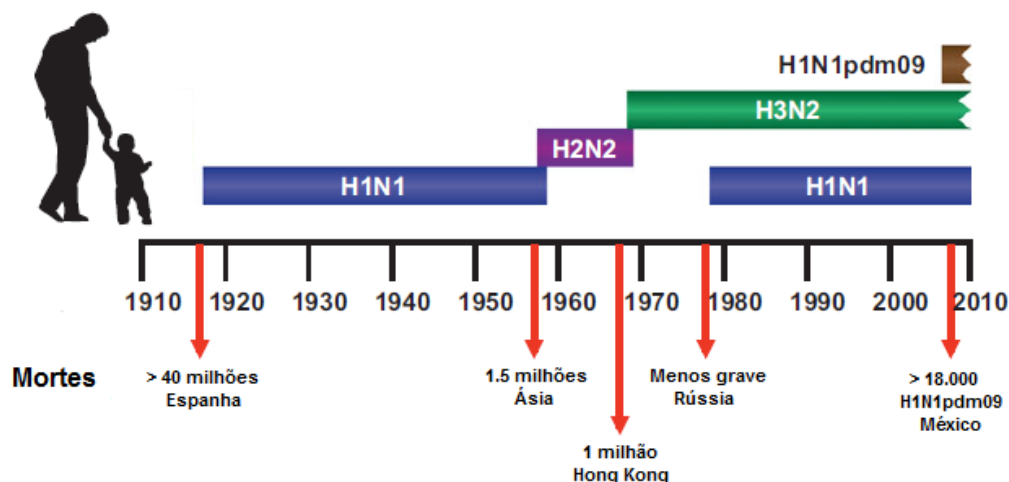


Figura 2. Pandemias causadas pelo vírus influenza nos últimos cem anos.
Fonte: Webster & Govorkova 2014 (Adaptado).

Para FLU A, após entrada no organismo por via respiratória, a adsorção e penetração na célula hospedeira são mediadas pela proteína hemaglutinina que se liga em resíduos de ácido siálico (AS) presentes em receptores da superfície celular (Connor et al. 1994, Raman et al. 2014). Enquanto vírus influenza humanos se ligam com maior afinidade ao AS com ligação α -2,6 a galactose subjacente, presentes em células da traqueia, vírus influenza aviários têm maior afinidade por AS com ligação α -2,3 presentes predominantemente em pneumócitos tipo II, macrófagos alveolares e células cubóides do epitélio brônquico (Matrosovich et al. 2004, Shinya et al. 2006). O desnudamento e liberação do complexo RNP são mediados pelas proteínas M1 e M2. Uma vez liberado no interior da célula, o complexo RNP é direcionado para o núcleo, onde ocorre o processo de replicação viral (Boulo et al. 2007, Bouvier & Palese 2008). A neuraminidase está relacionada com a clivagem dos resíduos de AS e liberação de novas partículas virais da célula infectada (Wagner et al. 2002). A proteína NS1, multifuncional, está relacionada com antagonismo à resposta imune do hospedeiro e a proteína NEP/NS2 possui atividade de exportação nuclear dos complexos RNP virais (Neumann et al. 2000, Hale et al. 2008, Marc 2014).

O vírus influenza B possui ciclo replicativo similar ao FLU A, com afinidade para os mesmos receptores e papel da proteína BM2 homólogo a proteína M2 (Mould et al. 2003). Para FLU C, a ligação ocorre em derivados de ácido siálico acetilados e a fusão é mediada por HEF, enquanto o papel da proteína CM2 é pouco esclarecido (Strasser et al. 2004, Furukawa et al. 2011).

Os vírus se replicam tanto no trato respiratório superior quanto inferior e o pico da replicação viral ocorre em média após 48 horas do início da infecção, a qual apresenta curto período de incubação, de dois a quatro dias (Taubenberger & Morens 2008). Os vírus influenza são responsáveis pela gripe e a sintomatologia da infecção, especialmente por FLU A, é caracterizada por febre alta, tosse, coriza, mialgia, prostração, que podem persistir por até 10 dias, além de casos mais graves com replicação no trato respiratório inferior e possibilidade de evolução para pneumonia e bronquiolite (Thangavel & Bouvier 2014). O aspecto clínico da infecção por FLU B é semelhante, porém geralmente com menor gravidade. A infecção pelo vírus influenza C é em geral assintomática, e quando sintomática, apresenta-se de forma branda (Wright et al. 2013). Entretanto, estudos recentes têm associado FLU C com casos de infecções do trato respiratório inferior (Calvo et al. 2013, Principi et al. 2013, Shimizu et al. 2015).

A circulação dos vírus influenza é mundial, FLU A e B circulam concomitantemente com picos de prevalência alternados e causam epidemias (Hampson & Mackenzie 2006). Casos de FLU C são considerados menos frequentes, esporádicos ou em pequenos surtos localizados, embora tenha sido demonstrado a circulação simultânea dos três vírus influenza, ocasionalmente com maior prevalência de FLU B ou C em comparação a FLU A (Muraki & Hongo 2010, Akinloye et al. 2011, Gardinassi et al. 2012). Ademais, devido ao padrão de circulação e patogenia, apenas FLU A e B são inclusos em vacinas sazonais de influenza. Em climas temperados, epidemias sazonais tendem a ocorrer nos meses de inverno, enquanto em climas tropicais as epidemias predominam em estações chuvosas ou períodos de temperaturas mais baixas (Tamerius et al. 2012, WHO 2014b).

1.2.2 Família *Paramyxoviridae*

A família *Paramyxoviridae* é dividida em duas subfamílias: *Pneumovirinae* (sete gêneros) e *Paramyxovirinae* (dois gêneros). Os vírus relacionados a infecções respiratórias em humanos pertencem aos gêneros *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Pneumovirus* e *Metapneumovirus* (ICTV 2014).

Os vírus parainfluenza humanos (PIV), descritos na década de 1950, são classificados em quatro espécies, PIV-1, PIV-2, PIV-3 e PIV-4 (subdivido em 4A e 4B), e pertencem à subfamília *Paramyxovirinae*, gêneros *Respirovirus* (PIV-1 e PIV-3) e *Rubulavirus* (PIV-2 e PIV-4) (Chanock 1956, ICTV 2014).

A partícula viral pode apresentar formato esférico, filamentososo ou pleomórfico, com diâmetro médio de 150-200nm e capsídeo de simetria helicoidal. Na superfície do envelope viral estão adsorvidas as glicoproteínas de fusão (F) e hemaglutinina – neuraminidase (HN), ambas relacionadas com adsorção e entrada do vírus na célula hospedeira, assim como clivagem dos resíduos de ácido siálico por HN na etapa de liberação do vírus. Internamente, o envelope é revestido pela proteína que compõe a matriz (M), relacionada com a arquitetura da partícula e a qual é liberada após entrada na célula. O nucleocapsídeo é composto pelas proteínas N (nucleoproteína), fosfoproteína (P) e a proteína polimerase viral (L - *large*) (Henrickson 2003, Schomacker et al. 2012). Vírus do gênero *Rubulavirus* possuem, associados ao nucleocapsídeo, a proteína acessória V, enquanto o gênero *Respirovirus* possui a proteína C (Yamada et al. 1990, Paterson et al. 1995). Estas proteínas acessórias não são

essenciais para replicação viral *in vitro* e possuem, *in vivo*, função relacionada com inibição da resposta imune ao vírus (Gotoh et al. 2003, Nishio et al. 2005).

O material genético é composto por RNA fita simples polaridade negativa não segmentado. Os genomas de PIV-1, PIV-2 e PIV-3 possuem tamanho médio de 15,5-15,7 kb, enquanto do PIV-4 possui cerca de 17,4 kb (Hall 2001, Yea et al. 2009). Todos os subtipos compartilham a mesma ordem de seis genes em comum (3'-N-P-M-F-HN-L), que são transcritos sequencialmente em mRNAs separados, além de possuírem regiões extragênicas em ambas extremidades do genoma. Adicionalmente o gene P codifica as proteínas acessórias C ou V, que são específicas para cada gênero, como referido anteriormente (Vainionpaa & Hyypia 1994). O gênero *Respirovirus* possui ainda regiões intergênicas conservadas formadas por trinucleotídeos, enquanto para vírus do gênero *Rubulavirus* as regiões intergênicas são de tamanho variável e não-conservadas (Lamb & Parks 2013). Os genes das proteínas L são altamente conservados, enquanto a proteína P é variável. As proteínas virais F e HN também possuem regiões altamente conservadas em cada sorotipo, tornando-as alvo de testes moleculares para detecção e identificação viral (Vainionpaa & Hyypia 1994, Beck et al. 2012).

Os PIV possuem tropismo para as células que revestem o trato respiratório e assim como os vírus influenza, utilizam como receptores glicoproteínas ou glicolipídios de superfície celular que possuam resíduos de ácido siálico (Suzuki et al. 2001, Zhang et al. 2005). Após adsorção e fusão do vírus na membrana celular, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma da célula. Os processos de transcrição e replicação do RNA ocorrem no citoplasma. As novas partículas virais formadas são liberadas com auxílio da proteína HN a partir de brotamento na membrana celular (Henrickson 2003).

Os vírus parainfluenza circulam em todo o mundo, além de acometer todas as faixas etárias. PIV-3 e PIV-1 possuem maior prevalência, seguidos pelo PIV-2, além de resultarem em maiores taxas de hospitalização quando comparados com PIV-4, que possui menor importância clínica. Os sorotipos estão relacionados com similar espectro de manifestações clínicas, incluindo resfriado, crupe, bronquite, bronquiolite e pneumonia, entretanto, PIV-1 e 2 estão mais frequentemente associados à crupe, enquanto PIV-3 está mais ligado à casos de pneumonia e bronquiolite (Rihkanen et al. 2008, Weinberg et al. 2009, Liu et al. 2013, Frost et al. 2014). Ademais, reinfecções com o mesmo sorotipo podem ocorrer ao longo da vida. Contudo, acredita-se que em

caso de infecção recorrente, a mesma é menos grave e se mantém no trato respiratório superior (Glezen et al. 1984, Schomacker et al. 2012).

O vírus sincicial respiratório (RSV), isolado inicialmente de chimpanzés em 1955, pertence à subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Pneumovirus* (Morris et al. 1956, ICTV 2014). Divide-se em dois subgrupos antigênicos baseado inicialmente em reações com anticorpos monoclonais contra a glicoproteína G e posteriores análises genéticas: RSV-A, considerado mais virulento, e RSV-B, ainda subdividido em duas variantes, B1 e B2 (Mufson et al. 1985, Melero et al. 1997). O grupo RSV-A está dividido em 12 genótipos (GA1 – GA7, SAA1, NA1, NA2, ON1 e ON2), e o grupo RSV-B 24 genótipos (BA1-BA12, GB1-GB5 e SAB1-SAB4, URU1-URU2 e THB) (Eshaghi et al. 2012, Khor et al. 2013, Auksornkitti et al. 2014, Hirano et al. 2014, Duvvuri et al. 2015, Ren et al. 2015).

A partícula viral é formada por um nucleocapsídeo de simetria helicoidal envolto por envelope lipídico com diâmetro variando entre 100-350nm; o genoma, RNA unifilamentar polaridade negativa, possui cerca de 15,2 kb. O envelope viral, envolto internamente pela matriz (M), possui três glicoproteínas em sua superfície: proteína de adsorção G, proteína de fusão F e pequena proteína hidrofóbica SH, que se projetam como espículas virais. O nucleocapsídeo é composto pelo RNA associado à nucleoproteína (N), fosfoproteína P, fator de transcrição M2-1 e polimerase L (Ruuskanen & Ogra 1993, Hacking & Hull 2002).

O vírus possui ainda as proteínas não-estruturais NS1 e NS2, as quais foram identificadas como antagonistas multifuncionais das vias de sinalização celular envolvendo interferon (Lo et al. 2005). A proteína NS2 também tem sido associada à liberação de novas partículas virais de células infectadas, bem como a obstrução de vias aéreas devido maior destruição celular e produção de muco (Liesman et al. 2014). Por fim, a proteína M2-2, possui função relacionada com a replicação do RNA viral (Collins & Karron 2013). As onze proteínas são codificadas por dez genes (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L), que são transcritos sequencialmente da extremidade 3' para 5' em RNAs mensageiros (mRNAs) distintos (Dickens et al. 1984, Collins & Karron 2013). Os genes das proteínas G, SH e M2-2 demonstram alta variação, sendo a glicoproteína G a que possui maior variabilidade (Jhonson et al. 1987, Collins et al. 1990), enquanto as proteínas F e N possuem regiões altamente conservadas (Feldman et al. 2000, Venter et al. 2003).

Para entrada na célula, o vírus utiliza como receptor moléculas de glicosaminoglicanos presentes na superfície celular. A glicoproteína G é responsável pela ligação aos receptores celulares e a proteína F está relacionada com a fusão do envelope viral com a membrana celular e penetração da partícula no interior da célula (Levine et al. 1987, Feldman et al. 2000). A transcrição e replicação do genoma ocorrem no citoplasma, e a montagem e estabilidade das novas partículas virais são mediadas pela proteína da matriz (Henderson et al. 2002). A proteína SH é uma proteína transmembrana cuja função ainda não está bem estabelecida, entretanto acredita-se que desempenha papel na liberação das partículas virais e apoptose celular (O'Donnell 2008).

A partícula viral é altamente infecciosa e os principais sítios de entrada do vírus são as mucosas, conjuntiva ou nasal. Possui tropismo por células epiteliais do trato respiratório, macrófagos alveolares e células dendríticas (Vandini et al. 2015). O período de incubação é curto, em média de três a cinco dias (Hall & Douglas Jr. 1981, Karron et al. 1997).

O RSV é um dos agentes virais mais frequentemente associado à infecção aguda do trato respiratório em crianças, especialmente recém-nascidos, mas também representa importante agente epidemiológico de ITRs em adultos e idosos (Mejias et al. 2013, Falsey et al. 2014, Velling et al. 2014). A infecção pode ser assintomática ou acompanhada de sintomas como rinorreia, congestão nasal, faringite e tosse, acomete principalmente adultos e crianças maiores de cinco anos. Em casos de crianças menores, idosos, indivíduos portadores de doenças crônicas, transplantados ou imunossuprimidos existe um risco de evolução para quadros com maior gravidade e infecção do TRI (Nair et al. 2012, Walsh & Falsey 2012, Falsey et al. 2014). Acredita-se que a alta carga viral esteja associada com a gravidade da doença na infância (Hall et al. 2013). A infecção primária é normalmente mais grave, principalmente em lactentes, com obstrução de vias aéreas, necrose epitelial, edema e aumento na produção de muco, além disso, a imunidade ao vírus é considerada incompleta e de curta duração, não conferindo proteção para uma posterior reinfecção (Ohuma et al. 2012, Vandini et al. 2015). No geral, os dois subgrupos (RSV-A e B) circulam durante epidemias, com predominância alternada entre eles a cada um ou dois anos (Collins & Graham 2008).

O metapneumovírus humano (hMPV) foi inicialmente descrito na Holanda, em 2001, e posteriormente classificado como membro da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gênero *Metapneumovirus* (van den Hoogen et al. 2001, ICTV 2014).

O hMPV é um vírus de RNA cadeia simples polaridade negativa, com envelope lipoprotéico e diâmetro variando de 150-600 nm (van den Hoogen et al. 2001). A partícula viral se assemelha em diversos aspectos com o vírus sincicial respiratório, como pela estrutura, podendo ser vista nas formas esférica ou filamentosa assim como pela especificidade celular, utilizando também moléculas de glicosaminoglicanas como receptores (Thammawat et al. 2008).

Com relação ao genoma, de aproximadamente 13,2 kb, observa-se cerca de 50% de homologia entre RSV e hMPV. Os genes estão na seguinte sequência: 3' N-P-M-F-M2-SH-G-L e codificam, respectivamente, as proteínas nucleoproteína, fosfoproteína, matriz, fusão, M2-1/M2-2, pequena proteína hidrofóbica, glicoproteína de adsorção G e proteína polimerase L. Diferente do RSV, os metapneumovírus não codificam as proteínas não estruturais NS1 e NS2 (Feuillet et al. 2012).

As proteínas G e F estão relacionadas com a adsorção e entrada do vírus nas células do trato respiratório e, além disso, são os principais alvos do sistema imune (Chang et al. 2012, Panda et al. 2014). Ademais, enquanto os genes da proteína F e N possuem regiões altamente conservadas, o da proteína G possui uma alta diversidade genética (Piyaratna et al. 2011). Tal variabilidade genética resultou na identificação e classificação do hMPV em dois genótipos (A e B) e seus subgrupos (A1, A2, B1 e B2). O grupo A2 ainda é subdividido em duas linhagens (A2a e A2b) (van den Hoogen et al. 2004, Huck et al. 2006).

Os metapneumovírus causam infecções respiratórias em todas as faixas etárias, mas são comumente observados em população pediátrica, com maiores taxas de suscetibilidade até os dois anos de idade (Pitoiset et al. 2010, Edwards et al. 2013). Os sinais clínicos da infecção pelo hMPV são similares aos sintomas causados por outros vírus respiratórios e incluem febre, tosse, congestão nasal, dispnéia, além de bronquiolite e pneumonia em casos mais graves (Kahn 2006, Broor et al. 2008, Feuillet et al. 2012). Em adultos, no geral a infecção é de leve a moderada; contudo, idosos e indivíduos imunocomprometidos podem apresentar complicações (Falsey et al. 2003).

O vírus possui distribuição global, com circulação sazonal que predomina nos períodos de inverno e primavera; entretanto a incidência do vírus pode variar ao longo do tempo em uma mesma região. Os dois genótipos podem cocircular em uma mesma época e casos de reinfecções podem ocorrer ao longo da vida, seja por genótipos diferentes ou um mesmo genótipo, devido uma resposta imune ineficiente durante uma infecção prévia (Kahn 2006, Papenburg et al. 2013).

1.2.3 Família *Coronaviridae*

A família *Coronaviridae* é dividida em duas subfamílias, *Coronavirinae* e *Torovirinae*. Dentre os quatro gêneros da subfamília *Coronavirinae*, apenas dois (*Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*) agrupam vírus que causam infecções em humanos, os *Human coronavirus* (HCoV) (ICTV 2014). Até o momento, seis coronavírus têm sido reconhecidos como agentes causadores de infecções respiratórias em humanos: HCoV-229E e HCoV-NL63 (*Alphacoronavirus*); HCoV-HKU1 e HCoV-OC43 (*Betacoronavirus* grupo A); SARS-CoV (*Betacoronavirus* grupo B) e MERS-CoV (*Betacoronavirus* grupo C) (van der Hoek et al. 2005, Pyrc et al. 2007, Hui & Chan 2010, Al-Tawfiq 2013, Yang & Leibowitz 2015).

Os primeiros coronavírus humanos, HCoV-229E e HCoV-OC43, foram descritos inicialmente na década de 1960 (Becker et al. 1967). Em 2003, um novo coronavírus foi identificado como agente etiológico da síndrome respiratória aguda grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome* - SARS), responsável por uma epidemia em diversos países do mundo, especialmente na Ásia, mas que foi controlada e nenhum caso tem sido descrito pela Organização Mundial de Saúde desde 2004 (Drosten et al. 2003, Ksiazek et al. 2003, WHO 2016). Posteriormente, em 2004 e 2005, foram descritos HCoV-NL63 e HKU1, respectivamente (van der Hoek et al. 2004, Woo et al. 2005). Por fim, mais recente, em 2012 foi identificado no Oriente Médio o MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*), a partir de onde se disseminou e permanecem sendo notificados diversos casos da doença (Zaki et al. 2012, Groot et al. 2013, WHO 2016).

Diversos fatores contribuem para a variabilidade dos coronavírus; dentre eles, o tamanho do genoma, a baixa fidelidade da RNA polimerase viral, altas taxas de recombinação e mutações genéticas, além da vasta gama de hospedeiros, como pássaros e diversos mamíferos (Geng & Tan 2013). Acredita-se que todos os coronavírus humanos tenham se originado de reservatórios animais, sendo os SARS-CoV e MERS-CoV exemplos mais recentes que emergiram de morcegos para jaguatiricas ou dromedários, respectivamente, e destes para humanos (van den Brand et al. 2015). A transmissão zoonótica pode se originar do contanto contínuo entre o homem e o animal ou um novo contanto, que se torna sustentado, resultante de alterações climáticas e geográficas que afetam a distribuição do animal ou vetor previamente restrito a outra

região. Vírus restritos a uma espécie animal também podem emergir a partir da evolução molecular, adquirindo a capacidade de infectar células humanas (Coleman e Frieman 2014, Cotten et al. 2014).

Os HCoV são partículas esféricas, com diâmetro médio de 100-160 nm e envelope lipoprotéico. As espículas ancoradas no envelope são formadas pela glicoproteína S (espícula), presente em todos os coronavírus e a glicoproteína HE (hemaglutinina-esterase) que está presente apenas nos betacoronavírus do grupo A (Pyrce et al. 2010, Huang et al. 2015). Ademais, as proteínas M (transmembrana) e E (envelope) também compõem o envelope viral (Neuman et al. 2011). O RNA viral, fita simples polaridade positiva, possui cerca de 27-32 kb, considerado o maior genoma de todos os vírus RNA conhecidos, e está intimamente ligado a fosfoproteína N formando um nucleocapsídeo de simetria helicoidal (Sturman et al. 1980, Masters & Perlman 2013).

O genoma dos HCoV é poliadenilado na extremidade 3' e possui, na extremidade 5', a estrutura *cap*, mimetizando o mRNA celular. Tais regiões contêm uma UTR de tamanho variável entre 200-500 nucleotídeos (nt) com função ligada a replicação e transcrição do material genético (Masters 2006). A extremidade 5' possui ainda, após a UTR, uma região denominada *ladder RNA*, composta por 65-98 nucleotídeos e que também está presente em mRNAs subgenômicos (Hagemeijer et al. 2012). Dois terços do genoma são compostos por duas regiões de leitura aberta (*Open Reading Frame* – ORF), ORF1a e ORF1b, que quando traduzidas geram duas poliproteínas, posteriormente clivadas por proteases virais, dando origem a 16 proteínas não estruturais, nsp1-nsp16, as quais formam a replicase viral, responsável pela replicação do genoma. A proteína nsp3 é a maior do complexo e possui domínios altamente conservados entre os coronavírus (Neuman et al. 2008). O terço restante do genoma (próximo à extremidade 3') possui ORFs sobrepostas que codificam para as proteínas estruturais intercaladas por regiões codificantes de proteínas acessórias, todas expressas a partir de mRNAs subgenômicos. As proteínas acessórias variam em número e posição dentro de cada espécie, enquanto as proteínas estruturais são codificadas, em geral, numa mesma ordem para todos os coronavírus (S, E, M e N) (Haan et al. 2002, Woo et al. 2005, Pyrc et al. 2007).

A proteína S é dividida em duas porções, região S1 responsável pela adsorção ao receptor celular e região S2 relacionada à fusão do envelope com a membrana da célula. A porção S1 ou N-terminal é extremamente variável, enquanto S2 ou C-terminal

é conservada (Hofmann et al. 2004, Masters & Perlman 2013). A proteína M, transmembrana, é a glicoproteína estrutural mais abundante dos coronavírus, responsável pela forma e estabilidade do envelope, além de participar na montagem de novas partículas virais, sendo considerada bastante conservada dentro de um mesmo gênero, mas variável entre gêneros distintos (Sturman et al. 1980). A proteína E, presente em menor quantidade, é uma proteína altamente divergente, mesmo dentro de um mesmo grupo, sua função não está totalmente esclarecida, mas sabe-se que tem relação com a montagem e liberação da progênie viral (Kuo et al. 2007). A proteína N, também estrutural, é responsável por se ligar ao RNA e formar o nucleocapsídeo viral. Ela é uma fosfoproteína com moderado grau de conservação entre os gêneros, a não ser por uma porção de 30 aminoácidos extremamente conservados dentro de todos os coronavírus (Masters et al. 1994).

Os coronavírus utilizam diferentes receptores para fusão e entrada na célula. O HCoV-229E utiliza a aminopeptidase N como receptor celular, presente na superfície apical de células do epitélio respiratório, enquanto o HCoV-OC43 reconhece ácido N-acetil-9-O-acetilneuramínico (Yeager et al. 1992, Kunkel & Herrler 1993, Wang et al. 2000). Os SARS-CoVs, assim como HCoV-NL63, utilizam a enzima convertora de angiotensina (ACE2 – *angiotensin-converting enzyme 2*), que é encontrada em pneumócitos, e MERS-CoV se liga a molécula CD26 presente em células do trato respiratório inferior, rins, parótida, intestino, entre outros (Li et al. 2003, Hofmann et al. 2005, Lu et al. 2013). O receptor do HCoV-HKU1 ainda não foi totalmente elucidado, mas estudo recente sugere que a proteína S do vírus se liga a resíduos de ácido N-acetil-9-O-acetilneuramínico para entrada na célula, assim como HCoV-OC43 (Huang et al. 2015). Os HCoV possuem distribuição mundial e causam surtos sazonais, principalmente no inverno e primavera (Jevsnik et al. 2012, Cabeça et al. 2013). As espécies OC43 e 229E são as mais comumente encontradas. No geral, crianças entre dois e quatro anos de idade são as mais afetadas, mas a infecção pode ocorrer em qualquer idade, além de reinfecções recorrentes. Estão associados com doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas (Stadler et al. 2003, Weiss & Leibowitz 2007). Com relação às manifestações clínicas nas infecções respiratórias, os vírus 229E e OC43 estão relacionadas com resfriado comum, enquanto NL63 está associado com casos de crupe e bronquiolite e os HCoV-HKU1 estão associados com sintomas como febre, rinorreia, sibilância e tosse (van der Hoek et al. 2005, Pyrc et al. 2007, Wu et al. 2008, Lee & Storch 2014). SARS-CoV causam pneumonia atípica, caracterizada por

tosse, febre, mialgia, dores de cabeça, mal-estar, dispneia e menos comumente vômitos e diarreia (Hui & Chan 2010, van den Brand et al. 2014). As infecções por MERS-CoV possuem sintomatologia semelhante ao SARS, contudo consideradas mais graves e com maiores taxas de mortalidade, ademais incluem aspectos clínicos como retenção urinária e falência renal (Al-Tawfiq 2013, Groot et al. 2013, van den Brand et al. 2015).

1.2.4 Família *Picornaviridae*

A família *Picornaviridae* é dividida em 29 gêneros, com destaque para o gênero *Enterovirus*, que comporta os Rinovírus (HRV A, B e C), agentes de infecções respiratórias e os Enterovírus (EV A-H e J), relacionados a um amplo espectro de infecções (Racaniello 2013, ICTV 2014).

Os rinovírus, espécies A e B, foram descritos inicialmente na década de 50 em estudos sobre a etiologia do resfriado comum e mais recentemente, em 2006, foi descrita a espécie Rinovírus C (Price 1956, Pelon et al. 1957, Lau et al. 2007). A partícula viral é esférica, de tamanho pequeno, capsídeo icosaédrico com diâmetro médio de 30nm e não possui envelope. O capsídeo é formado por 60 cópias de cada uma das proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4. Externamente, a proteína VP1 forma um tipo de “canyon” na superfície cuja função é adsorção nos receptores celulares. A proteína VP4 encontra-se ancorando o material genético viral à parte interna do capsídeo (Jacobs et al. 2013).

O genoma é composto por uma única molécula linear de RNA polaridade positiva contendo cerca de 7,2 kb e possui única ORF, a qual codifica para uma poliproteína precursora que é posteriormente clivada por proteases virais. Esta clivagem dá origem a 11 proteínas específicas do vírus, sendo quatro estruturais (VP1-4) e as proteínas restantes (2A – 2C e 3A – 3D), de caráter não estrutural, atuam na replicação e formação de novas partículas virais (Palmenberg et al. 2009, Jacobs et al. 2013). A extremidade 5' é composta por uma região não codificante (5'UTR) altamente conservada, que possui sequências relacionadas com o controle da tradução/replicação do genoma e sítios internos de entrada ribossomal. Ligada covalentemente a esta região encontra-se uma proteína viral denominada VPg (*viral protein, genome linked*), com função relacionada à replicação do RNA viral. A extremidade 3' do RNA possui uma pequena região não codificante (3'UTR), que apresenta uma cauda poliA (Palmenberg et al. 2010).

A classificação dos rinovírus é baseada nas características do capsídeo, organização genômica, e conservação das sequências, principalmente das proteínas VP1 ou VP4/VP2, que são variáveis (Palmenberg et al. 2010). As espécies de HRV são subdivididas em sorotipos, sendo descritos até o momento 80 sorotipos HRV-A, 32 HRV-B e 55 de HRV-C (McIntyre et al. 2013, Farsani et al. 2015, Picornaviridae 2015).

A maioria dos sorotipos utiliza como receptor a molécula de superfície celular ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) e por isso são denominados *major group*, enquanto o grupo denominado *minor group* utiliza para adesão e entrada na célula a molécula LDLR (*low-density lipoprotein receptor*) (Uncapher et al. 1991, Fuchs & Blaas 2010, Gern 2010). Para a espécie HRV-C, permanece incerto o receptor celular o qual os sorotipos pertencentes ao grupo se ligam, contudo Bochkov e colaboradores, em estudo recente, demonstraram que a molécula 3 da família das caderinas humanas pode atuar como receptor para entrada do HRV-C na célula (Bochkov et al. 2015).

A entrada do vírus no hospedeiro se dá pela via respiratória ou conjuntiva e, apesar do grande número de sorotipos, todos têm um tropismo restrito ao trato respiratório. A replicação ocorre no citoplasma de células do epitélio respiratório nas regiões nasal e nasofaríngea, podendo ainda ocorrer em células do trato respiratório inferior (Hendley & Gwaltney 1988, Papadopoulos et al. 2000, Fuchs & Blaas 2010). Durante a infecção, o epitélio respiratório permanece relativamente intacto, o que sugere que os efeitos patogênicos relacionados à infecção são resultantes, principalmente, da ação de citocinas e quimiocinas liberadas durante a resposta imune do hospedeiro (Heikkinen & Jarvinen 2003)

Os rinovírus constituem o agente etiológico mais comum de infecções do trato respiratório superior, tipicamente o resfriado comum, que inclui sintomas como espirros, obstrução e corrimento nasal, dor de garganta, dor de cabeça, tosse e mal-estar. Entretanto, após avanço de técnicas de biologia molecular, o vírus também vem sendo associado a infecções assintomáticas e infecções do trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquiolite (Peltola et al. 2009, Gern 2010, Tapparel et al. 2011). Também tem sido descrita a associação com casos de otites média e sinusite, além da relação com a exacerbação de doenças pulmonares crônicas, como asma, fibrose cística e DPOC (Gern 2002, Wark et al. 2005, Almeida et al. 2010, Bochkov & Gern 2012, Dimopoulos et al. 2012).

Apesar do rinovírus circular durante todo o ano, a ocorrência de infecção é mais comum nos meses do outono, verão e primavera. Recém-nascidos e crianças menores são os grupos mais afetados. No geral a incidência diminui com a idade, mas também é maior em indivíduos imunocomprometidos. Estudos epidemiológicos relatam maior prevalência de infecções pelo HRV-A (45-65%), seguido por HRV-C (30-50%) e HRV-B (2-13%) (Arakawa et al. 2012, Onyango et al. 2012, Garcia et al. 2013, Chen et al. 2015).

Assim como os rinovírus, os enterovírus humanos (EV) podem causar infecções respiratórias, porém, diferente dos primeiros, podem estar associados a diversas síndromes clínicas, incluindo infecções assintomáticas e subclínicas, doenças respiratórias, gastroenterites, miocardites e meningites. Os enterovírus estão divididos em nove espécies (EV A-H e J) e 149 sorotipos com base nas propriedades biológicas e moleculares. As espécies de EV A-D incluem vírus capazes de causar infecções em humanos, enquanto as outras espécies comportam vírus que infectam primatas, suínos e bovinos (Tapparel et al. 2013, ICTV 2014, Picornaviridae 2015). As sequências do genoma que codificam para as proteínas do capsídeo, especialmente VP1, são as utilizadas para classificação dos enterovírus, devido sua maior variabilidade, enquanto a região 5'UTR é a região mais conservada do genoma e, portanto, extensamente utilizada em protocolos para detecção viral (Nasri et al. 2007).

A estrutura da partícula viral é semelhante a do HRV. Por outro lado, as principais diferenças estão relacionadas às características físico-químicas, visto que os enterovírus são estáveis em diversos ambientes, como por exemplo em meio ácido ou em temperatura ambiente. Além disso, são resistentes a solventes orgânicos, como clorofórmio e álcool, além de congelamento, podendo ser inativados por radiação ultravioleta e temperaturas acima de 56°C (Solomon et al. 2010).

Diferente dos HRV, os enterovírus podem ser transmitidos, além da via respiratória, também pela via fecal-oral. Assim sendo, o sítio primário de infecção dos EVs é constituído pelas células epiteliais dos tratos respiratório e gastrointestinal. Viremia pode ou não ocorrer e alguns enterovírus apresentam tropismo por tecidos específicos, podendo infectar diversos tipos celulares, como neurônios, cardiomiócitos e células epiteliais (Cheng et al. 2014, Muehlenbachs et al. 2015).

A maioria das infecções por EV ocorre no final do verão e outono, e atingem principalmente crianças com menos de 10 anos de idade e indivíduos imunocomprometidos. No geral, a apresentação clínica das infecções está relacionada

com a idade: doenças do sistema nervoso central são comuns em recém-nascidos e indivíduos de cinco a 15 anos de idade; miocardites são mais frequentes, além de recém-nascidos, em adultos de 20-40 anos de idade; doenças de mão e pé e infecções respiratórias apresentam-se comuns em crianças menores de cinco anos (Muehlenbachs et al. 2015). As infecções respiratórias por enterovírus podem variar desde assintomática até sintomáticas do trato respiratório superior (resfriado, faringite) ou inferior (pneumonia, bronquiolite ou exacerbação de asma na infância) (Chang 2008, Tapparel et al. 2013).

1.2.5 Família *Parvoviridae*

A família *Parvoviridae* compreende duas subfamílias, *Parvovirinae* e *Densovirinae*. A primeira inclui o gênero *Bocaparvovirus*, o qual comporta o Bocavírus humano (HBoV), descrito na Suécia em 2005, e inicialmente identificado como agente de infecções respiratórias a partir de aspirados de nasofaringe de pacientes com infecções do trato respiratório inferior (Allander et al. 2005, ICTV 2014). Posteriormente, em 2009-2010, estudos descreveram a presença do bocavírus em amostras fecais provenientes de pacientes com gastroenterite, sugerindo tropismo do vírus pelo trato gastrointestinal para pelo menos algumas espécies (Arthur et al. 2009, Kapoor et al. 2009, Kapoor et al. 2010).

Os bocavírus possuem capsídeo não envelopado com simetria icosaédrica e diâmetro médio de 25nm. O genoma é composto por ácido desoxirribonucléico (DNA) fita simples com cerca de 5,0 kb com três ORFs que codificam para duas formas da proteína não estrutural NS1, a fosfoproteína NP1 e as proteínas estruturais que compõem o capsídeo, VP1 e VP2 (Chen et al. 2010). A proteína NS1 está relacionada com a replicação e empacotamento do material genético, NP1 possui função associada à localização nuclear do vírus na célula, bloqueio da produção de interferon e indução de apoptose celular (Li et al. 2013, Sun et al. 2013, Tewary et al. 2013). As proteínas VP1 e VP2, além de promoverem a adsorção e penetração na célula, transportam o genoma viral para o núcleo e também são alvo da resposta imune humoral (Chiu et al. 2014, Deng et al. 2014). Como não codificam uma enzima DNA-polimerase, são altamente dependentes da maquinaria celular para replicação (Allander et al. 2005, Jartii et al. 2012).

Os HBoV possuem baixa variabilidade genética e, com base na análise filogenética dos genomas, são divididos em quatro espécies (HBoV 1-4), sendo a ORF 3, que codifica as proteínas estruturais, a região com maior variabilidade entre as espécies, podendo ser utilizada ainda para diferenciação inter-espécie (Allander et al. 2005, Schildgen et al. 2008, Gurda et al. 2010). A região que codifica a proteína não estrutural NP1 é considerada a mais conservada do genoma e, portanto, bastante utilizada em ensaios moleculares para detecção do vírus. Adicionalmente, a espécie HBoV-2 subdividida em subtipos A e B com base em divergência superior a 5% na sequência das proteínas não estruturais (Arthur et al. 2009, Kapoor et al. 2009, Kapoor et al. 2010).

Os mecanismos de entrada na célula, replicação e patogenia de infecções por HBoV são ainda pouco elucidados. Embora já tenha sido cultivado em células do epitélio respiratório, o cultivo do vírus em células é difícil e nenhum modelo animal está disponível (Dijkman et al. 2009). Acredita-se que o sítio inicial de replicação do HBoV-1 seja o trato respiratório, onde partículas virais foram detectadas com mais frequência e maior número de cópias, em relação ao observado em fezes (Allander et al. 2007, Christensen et al. 2010). Entretanto, as espécies HBoV 2-4 têm sido detectadas predominantemente nas fezes de indivíduos apresentando ou não sintomas entéricos, sendo que HBoV 2 é considerado agente de gastroenterites, apesar das células hospedeiras não terem sido ainda identificadas (Chieochansin et al. 2009, Kantola et al. 2010).

Acredita-se que a transmissão do bocavírus, como no caso de outros parvovírus, ocorra por inalação ou contato direto com fezes, urina ou secreções respiratórias contaminadas (Jartti et al. 2012). Como referido, apenas HBoV-1 é considerado agente de infecções respiratórias, e ainda casos de reinfecções no trato respiratório com variantes do HBoV-1 têm sido relatados (Allander et al. 2007, Vicente et al. 2007, Kapoor et al. 2010, Xu et al. 2012, Martin et al. 2015). Co-deteções do HBoV-1 com outros vírus respiratórios são frequentemente descritos, contudo há divergências em relação a importância clínica desse achado (Christensen et al. 2010, Deng et al. 2012). Além disso, os bocavírus podem eventualmente ser detectados até seis meses após o fim dos sintomas da infecção. Fatores como a replicação por longo tempo e persistência do vírus podem explicar os casos de codeteções, bem como a frequente identificação do vírus em indivíduos assintomáticos (Martin et al. 2010, Schenk et al. 2011).

A distribuição do vírus é global e, no geral, circula durante todo o ano, sendo mais comum no inverno. A infecção por HBoV ocorre em taxas variadas entre grupos distintos de pacientes e atinge especialmente crianças de seis a 24 meses. As manifestações clínicas observadas em infecções respiratórias incluem tosse, dificuldade respiratória, febre, hipóxia e rinite, podendo gerar quadros graves de bronquiolite, otites média e pneumonia (Martin et al. 2010, Lehtoranta et al. 2012, Nokso-Koivisto et al. 2014). Em adultos, os sinais clínicos são observados principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Guido et al. 2011, Caccia et al. 2012).

1.2.6 Família *Adenoviridae*

A família *Adenoviridae* composta por cinco gêneros possui como destaque o gênero *Mastadenovirus*, o qual agrupa vírus que causam infecções no homem, os *Human mastadenovirus* (ICTV 2014). Os adenovírus foram isolados pela primeira vez por Rowe e colegas, enquanto estudavam o cultivo de vírus em tecidos adenóides (Rowe et al. 1953). Os HAdV são divididos em sete espécies, HAdV A-G, e ainda subtipos, somando até o momento 68 subtipos (HAdV-1 a HAdV-68) descritos com base em características sorológicas, sequenciamento do genoma completo e filogenia (Robinson et al. 2011, Huang et al. 2013, Ghebremedhin 2014).

A partícula viral, não-envelopada, possui 70-90 nm de diâmetro e capsídeo de simetria icosaédrica. O genoma, DNA linear de cadeia dupla, é composto por aproximadamente 36 kb (Rux & Burnett 2004, Nemerow et al. 2012). O vírus possui 11 proteínas estruturais, nomeadas II (Hexon), III (Penton), IIIa, IV (componente da fibra), VI, VIII e IX compondo o capsídeo viral e V, VII, X e TP (proteína terminal) presentes no *core*. O genoma contém cinco unidades transcricionais (E1A, E1B, E2, E3 e E4), onde a unidade E1A codifica proteínas que atuam na transcrição inicial e induzem a célula hospedeira a entrar na fase S do ciclo celular; a unidade E1B codifica proteínas que atuam bloqueando a apoptose celular; E2 codifica três proteínas que apresentam papel na replicação do DNA viral; E3 codifica moduladores da resposta celular; por fim, a unidade E4 codifica proteínas com diversas funções, incluindo regulação da transcrição e tradução dos mRNAs, além de modular a replicação do DNA viral (Davison et al. 2003, Rux & Burnett 2004, Ebner et al. 2005).

Para adsorção e entrada na célula, os adenovírus utilizam diferentes receptores. As espécies A, C, D, E e F utilizam como receptor a proteína celular CAR

(*Coxsackie and adenovirus receptor* – Receptor comum Coxsackievírus e Adenovírus), presente em diversos tecidos, incluindo pulmão, enquanto o grupo B utiliza a proteína de membrana CD46, presente em células hematopoiéticas e dendríticas (Roelvink et al. 1998, Segerman et al. 2003). Sorotipos da espécie D podem ainda utilizar resíduos de ácido siálico como receptores, e os sorotipos da espécie B a desmogleina-2 (Arnberg et al. 2000, Wang et al. 2011).

Os adenovírus podem causar um amplo espectro de infecções em humanos, dentre elas, patologias respiratórias, gastroentéricas, hepáticas e oculares. A maioria dessas infecções ocorre em população pediátrica e, em indivíduos imunocompetentes é geralmente autolimitada. No caso das ITRs, os sintomas variam desde um quadro clínico de resfriado comum até casos mais graves de pneumonias e bronquiolites (Kunz & Ottolini 2010).

A associação de sorotipos específicos com uma síndrome particular não está totalmente elucidada, embora as manifestações clínicas estejam predominantemente associadas ao sítio de entrada do vírus (Ampuero et al. 2012). Em geral, os adenovírus relacionados com infecções respiratórias são das espécies B, C e E. Os grupos A, F e G estão principalmente associados a gastroenterites, e o grupo D com infecções oculares, assim como alguns sorotipos das espécies B e E (Jin et al. 2013, Ghebremedhin 2014). A infecção por um sorotipo resulta em imunidade duradora, não ocorrendo reinfecções pelo mesmo, entretanto não é protetora contra outros sorotipos, mesmo dentro de uma mesma espécie (Kunz & Ottolini 2010). Ademais, os adenovírus são responsáveis por 1% - 5% de todas as infecções respiratórias e por até 10% das pneumonias na infância (Ampuero et al. 2012, Wold & Ison 2013).

1.3 Aspectos clínicos das infecções respiratórias virais

Os vírus respiratórios podem ser transmitidos por mecanismos como o contato direto com aerossóis contaminados resultantes da fala, tosse e espirros (transmissão direta), além do contato com superfícies e objetos contaminados (transmissão indireta) (Boone & Gerba 2007). A transmissão do vírus de um indivíduo infectado para um hospedeiro suscetível depende de fatores como o número de partículas virais eliminadas pela pessoa infectada, a estabilidade viral no ambiente, em aerossóis ou em superfícies e o potencial de propagação no interior de um ambiente fechado (Pica & Bouvier 2012). Os vírus que estimulam um aumento na secreção de

fluidos ou a irritação do epitélio respiratório induzindo à tosse e espirros favorecem a excreção e transmissão de partículas virais (Goldmann 2000, Barker et al. 2001).

Fatores climáticos como temperatura e umidade do ar têm sido relacionados com a transmissão viral (McDevitt et al. 2010). A umidade pode influenciar a quantidade de gotículas que permanecem em forma de aerossóis no ar: quanto mais alta a umidade menos as gotículas evaporam e tendem a se depositar em superfícies, já em umidade mais baixa os aerossóis, que são menores, permanecem por mais tempo no ar (Lowen et al. 2007, du Prel et al. 2009, Paynter 2015). A sobrevivência do vírus nesses aerossóis ou gotículas também é influenciada pela umidade. No geral, vírus envelopados, os quais contêm uma membrana lipídica, apresentam maior estabilidade em baixa umidade relativa do ar (UR), enquanto aqueles não-envelopados tendem a ser mais estáveis em maior UR (Sobsey & Meschke 2003). Ainda, temperaturas mais altas podem afetar a estabilidade da partícula viral no ambiente, o que reduz a infecciosidade dos vírus envelopados (Polozov et al. 2008, Ud-Dean 2010).

Em relação ao hospedeiro, a inalação de ar mais frio e seco pode ressecar as vias aéreas e afetar, além do movimento ciliar, a produção de muco, comprometendo sua resposta imune inata (Salah et al. 1988, Pica & Bouvier 2012). Ademais, temperaturas mais frias, ou alto índice de chuvas, também influenciam o comportamento do hospedeiro, com maior tendência a permanecer por mais tempo em locais fechados, com ventilação reduzida e aglomeração de pessoas, o que pode aumentar a predisposição e facilitar a transmissão viral (Musher 2003, Murray et al. 2012).

Após entrada no organismo, os vírus se ligam e penetram nas células a partir de moléculas presentes na superfície da membrana plasmática celular. No interior da célula, ocorre o processo de replicação, que culminará na formação de novas partículas virais e liberação, resultando em danos às células hospedeiras. O sítio primário de infecção é o epitélio celular que reveste o trato respiratório superior de onde os vírus podem se disseminar para outras células presentes no próprio trato respiratório superior ou ainda atingir células do trato respiratório inferior (Tregoning & Schwarze 2010).

O período de incubação das infecções por vírus respiratórios é relativamente curto, podendo variar de um a cinco dias para PIV, influenza, rinovírus e alguns coronavírus (MERS-HCoV). Outros vírus podem ter um período de incubação maior, como RSV e hMPV de até sete dias, ou adenovírus e SARS-CoV até 10 dias (Mahony 2008, Lessler et al. 2009).

Uma vez que a infecção é estabelecida, a apresentação de manifestações clínicas irá depender de fatores relacionados ao ambiente, ao vírus e ao hospedeiro (Figura 3). A interação de tais fatores leva a diferentes cursos e consequente evolução da doença (Tregoning & Schwarze 2010, Vandini et al. 2015).

Com relação à população pediátrica, as seguintes condições podem estar envolvidas com a gravidade da infecção: idade, má-nutrição, hospitalização, tabagismo passivo ou ar poluído. Tais fatores podem estar associados a uma maior fragilidade do organismo, prejudicando o sistema imune e favorecendo a replicação viral, o que pode resultar em danos mais extensivos ao hospedeiro (Okiro et al. 2008, Paynter 2014, Wang et al. 2014). Tamanho e peso corporal ao nascer também são fatores importantes no caso de recém-nascidos. A idade da criança tem relação com seu tamanho e das vias aéreas, a dinâmica da transmissão - devido contato com outras crianças pequenas, a maturidade imune e ainda, menos reserva de energia, o que contribui negativamente em situações de exaustão e cansaço (Tregoning & Schwarze 2010).

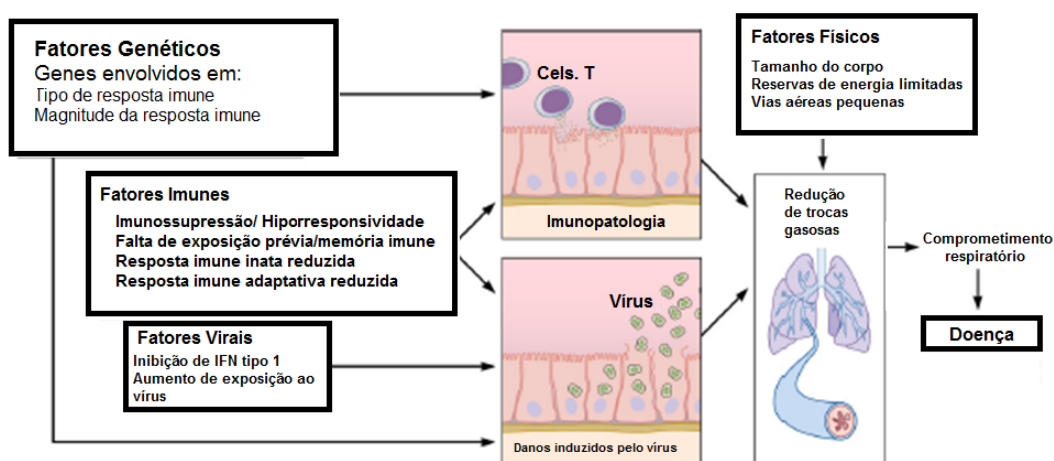


Figura 3. Fatores que influenciam na infecção respiratória viral e impacto da infância.
Fonte: Tregoning & Schwarze 2010 (Adaptado).

Os danos virais às células hospedeiras estão relacionados basicamente com dois mecanismos. Primeiro, àqueles causados diretamente pelo patógeno: RSV e influenza causam necrose epitelial por destruição direta das células como consequência da replicação. Contudo, o RSV demonstra ser menos citopático e agressivo em comparação ao influenza A (Vandini et al. 2015). Ainda, o RSV tem a capacidade de inibir o movimento ciliar causando obstrução das vias aéreas. Outros como rinovírus, raramente estão associados a danos graves ao trato respiratório (Jacobs et al. 2013), entretanto podem aumentar a produção de muco de forma prejudicial à célula (Zhang et

al. 2002, Bossios et al. 2005). O segundo mecanismo está ligado à resposta imune, a qual pode danificar ainda mais as vias aéreas, resultando em maior inflamação e destruição de células do trato respiratório (Kohlmeier & Woodland 2009).

O trato respiratório é exposto constantemente e simultaneamente a diversos patógenos, portanto, a ocorrência de infecções por mais de um patógeno não é rara. Coinfecções virais são comuns, mas não há consenso em relação ao efeito na gravidade da doença (Bicer et al. 2013, Harada et al. 2013). Por outro lado, a infecção viral pode aumentar a suscetibilidade do indivíduo a coinfecção por bactérias, porque tanto as barreiras físicas quanto imunes podem ser afetadas e o epitélio respiratório danificado é uma porta de entrada para bactérias. Ademais, a coinfecção bactéria-vírus pode significar um agravamento no quadro do paciente (Hament et al. 1999, Jamieson et al. 2013). Estudos demonstram que uma pneumonia viral por influenza frequentemente ocorre junto ou seguida de uma pneumonia bacteriana, e as complicações de uma infecção secundária por bactérias são importante causa de morbidade e mortalidade associada a infecções por influenza (Reed et al. 2009, van den Brand et al. 2014).

A detecção de vírus respiratórios em indivíduos assintomáticos tem sido objeto de diversos estudos e, agentes como rinovírus, adenovírus e coronavírus estão entre os mais frequentemente observados (Jartti et al. 2008a, Jartti et al. 2008b, van der Zalm et al. 2009, Castro 2015). Positividade viral em indivíduos assintomáticos pode indicar infecção aguda sem sintomas, infecção viral sintomática passada recente com excreção viral remanescente ou persistência viral de infecção passada (Chonmaitree et al. 2015).

Estudos relatam que a positividade viral associada à ausência de sintomas é mais frequente em crianças maiores de cinco anos, que apresentam maior maturidade do sistema imune nessa fase da vida, o que também é frequentemente relacionado com a detecção de apenas um vírus respiratório (van der Zalm et al. 2009, Thavagnanam et al. 2010).

1.4 Diagnóstico laboratorial dos vírus respiratórios

A similaridade dos sintomas apresentados nas infecções respiratórias por diferentes agentes torna difícil o diagnóstico clínico. Entretanto, a identificação do agente etiológico é importante no âmbito do direcionamento terapêutico e medidas de controle e prevenção, especialmente em ambientes hospitalares. Os benefícios

adicionais da detecção viral podem incluir a redução de exames laboratoriais a serem realizados e diminuição na administração excessiva de antibióticos, além de fornecer melhor predição do curso clínico da infecção (Talbot & Falsey 2010, Pavia 2011, Doan et al. 2012).

Os espécimes clínicos utilizados para o diagnóstico laboratorial das infecções respiratórias podem variar de acordo com as suspeitas clínicas e incluem sangue, escarro, *swabs* nasais e de orofaringe, lavados broncoalveolares ou aspirados das secreções de oro ou nasofaringe (Mahony 2008, Munywoki et al. 2011). Independente da natureza da amostra, bem como da metodologia de detecção utilizada, fatores como o procedimento de coleta, a qualidade da amostra, período da infecção no qual a coleta é realizada, transporte e conservação do espécime clínico irão afetar diretamente os resultados obtidos (Talbot & Falsey 2010, Alsaleh et al. 2014).

Aspirados e *swabs* nasofaríngeos têm sido considerados métodos de escolha para coleta de amostras visto que possuem sensibilidade elevada, podendo o *swab* ter a vantagem de ser um método menos invasivo e de coleta facilitada, enquanto aspirados requerem profissional adequado e equipamentos próprios para realização do procedimento (Lambert et al. 2008, Spyridaki et al. 2009).

Estudos de comparação divergem entre a escolha do *swab* ou do aspirado nasofarínge como melhor espécime para detecção de vírus respiratórios. Embora por um longo período o aspirado tenha sido considerado melhor em relação à sensibilidade, estudos recentes demonstram que os dados variam de acordo com a técnica de detecção utilizada, bem como o procedimento de coleta realizado de forma correta o que influencia diretamente na qualidade do material a ser analisado. O *swab* demonstra uma sensibilidade média de 89% para detecção molecular de vírus como influenza, adenovírus, RSV, PIV, hMPV, HCoV e rinovírus, possuindo como vantagem, além da facilidade para coleta, a maior aceitação por parte do paciente ou seu responsável (Blaschke et al. 2011, DeByle et al. 2012, Tunsjo et al. 2015).

A utilização de escarro para detecção de vírus respiratórios por alguns estudos demonstram um maior índice de positividade comparado ao *swab* ou aspirado. Além de maior sensibilidade, o escarro poderia ser uma amostra que represente melhor o trato respiratório inferior. Contudo, dentre as desvantagens, o escarro é altamente viscoso, o que dificulta o processamento e extração da amostra, sendo necessária uma etapa adicional de pré-tratamento, além da possível presença de inibidores que podem levar a resultados falso-negativos (Falsey et al. 2012, Jeong et al. 2014).

Até a década de 1990, os métodos de detecção consistiam em cultura viral, detecção de antígenos e sorologia, resultando em uma média de 40% de detecção viral em pacientes com infecção do trato respiratório inferior (Heiskanen-Kosma et al. 1998, Jartti et al. 2013). Métodos como cultura em células ou sorologia são pouco utilizados, uma vez que não apresentam aplicação na rotina de diagnóstico. As técnicas de cultivo requerem maior tempo para obtenção de resultados e no caso da sorologia, a produção de anticorpos pelo organismo é demorada e a infecção frequentemente terá sido resolvida antes da definição do agente etiológico (Tregoning & Schwarze 2010). O cultivo em células se refere à infecção de linhagens celulares com amostras clínicas obtidas e pode levar até 10 dias para se observar resultado. É um método que exige a escolha correta da linhagem celular e ainda há alguns vírus que não são cultiváveis. Entretanto, destaca-se a importância do isolamento dos vírus em cultura celular na identificação de agentes infecciosos desconhecidos, como por exemplo, no caso da descoberta do SARS-CoV (Mahony 2008, Olofsson et al. 2011).

Os ensaios de imunofluorescência permitem a detecção de antígenos virais presentes em células infectadas, a partir de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos. É uma técnica considerada de baixo custo e rápida, mas que possui sensibilidade limitada quando comparada com testes de biologia molecular (Freymuth et al. 2006, Kuypers et al. 2006). Existem disponíveis testes comerciais baseados em imunofluorescência que abrangem painéis permitindo a detecção de diferentes vírus respiratórios (Faden 2010).

Os testes baseados em imunocromatografia, denominados testes rápidos, possuem como vantagem o baixo custo, rápida obtenção de resultados (cerca de 15 minutos) e fácil manuseio, não necessitando de ambiente específico com equipamentos especiais ou profissionais altamente treinados para realização do teste (Nakao et al. 2014). Dessa forma compõem uma opção promissora para uso na prática clínica, contudo, quando comparados com outras metodologias diagnósticas, os testes rápidos possuem, apesar de alta especificidade, baixa sensibilidade, o que deve ser aprimorado com o passar do tempo (Bruning et al. 2014). Atualmente, existem disponíveis no mercado testes rápidos para os vírus influenza, vírus sincicial respiratório e adenovírus (Ivaska et al. 2013, Morozumi et al. 2014).

Nos últimos anos, popularizaram-se técnicas de biologia molecular, que fornecem um diagnóstico rápido e com elevada sensibilidade, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*), útil na identificação do material

genético viral a partir de pequenas quantidades de amostra. Ainda, protocolos estabelecidos de reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR – *reverse transcriptase - PCR*), *nested*-PCR, multiplex-PCR e PCR em tempo real (qPCR – *quantitative PCR*) têm permitido a detecção simultânea de vários agentes virais em uma única reação, detecção de mais de um vírus em um único paciente (codetecção) e detecção em indivíduos assintomáticos, alcançando altas taxas de detecção viral (Mahony et al. 2011, Anderson et al. 2013, Jartti et al. 2013). Entretanto, uma das maiores limitações da técnica de PCR é a possibilidade de falso-negativos pela presença de inibidores nas amostras biológicas, além do custo relativamente alto que pode inviabilizar a sua utilização em rotina laboratorial (Anderson et al. 2013, Jartti et al. 2013).

O multiplex *nested*-PCR utiliza iniciadores para mais de um vírus em uma única reação, permitindo a detecção paralela de diversos agentes em única análise. Ainda, a reação é composta por duas etapas, onde a segunda, denominada *nested*, é realizada com iniciadores para regiões internas ao fragmento amplificado na primeira etapa, aumentando a especificidade da reação. Entretanto, o multiplex possui menor sensibilidade quando comparado ao monoplex-PCR e maior chance de contaminação devido a realização de uma segunda etapa de amplificação (*nested*). Apesar das desvantagens, o multiplex *nested*-PCR possui diversos benefícios quando comparado à realização de monoplex-PCR para vários vírus respiratórios: a combinação multiplex-*nested* consome menor quantidade de reagentes e de amostra, além de economizar tempo, uma vez que vários patógenos são pesquisados simultaneamente. Ademais, a integridade da amostra é preservada, uma vez que esta será descongelada menos vezes para a realização da metodologia (Jartti et al. 2013, Krause et al. 2015). Atualmente estão disponíveis kits comerciais baseados nas técnicas de RT-PCR e qPCR, com painéis abrangendo mais de 17 vírus respiratórios e muitas vezes a detecção adicional de um ou mais agentes bacterianos (Arens et al. 2010, Huijskens et al. 2012, Butt et al. 2014).

A detecção molecular se baseia na composição e organização do genoma viral. Regiões conservadas do genoma são alvos de escolha para detecção do vírus, o que garante maior especificidade, enquanto regiões que são variáveis entre diferentes genótipos/subtipos são utilizadas para identificação e caracterização dessas variantes (Quadro 2) (Mahony 2008, Mahony 2011).

Quadro 2. Principais genes alvos utilizados para detecção molecular dos vírus respiratórios. (Adaptado de Mahony 2011).

Agentes virais	Genes	Considerações
Influenza	M (Matriz) NP (Nucleoproteína)	Possuem regiões altamente conservadas que permitem a diferenciação entre as três espécies do vírus influenza
Vírus Sincicial Respiratório	F (Fusão) N (Nucleoproteína) L (Polimerase)	Possuem regiões conservadas, permitindo diferenciação dos dois subgrupos
Parainfluenza	HN (Hemaglutinina-Neuraminidase)	Alvo mais comum de amplificação, contam regiões únicas para os quatro sorotipos, permitindo diferenciá-los
Rinovírus e Enterovírus	5'UTR (Região 5' não codificante) VP1/VP4	A região 5'UTR é altamente conservada. Entretanto não permite diferenciar HRV e EV, por isso se utiliza iniciadores que abrangem a região dos genes VP1/VP4, uma vez que os rinovírus possuem uma deleção de 116 pb em relação aos enterovírus
Coronavírus	N (Nucleocapsídeo) S (Espícula) Pol (Polimerase)	Gene <i>pol</i> utilizado como consenso, enquanto os genes N e S para diferenciação das variantes virais
Bocavírus	NS1 (Proteína não estrutural) NP1 (Fosfoproteína)	Ambos possuem regiões conservadas, sendo a NP1 considerada a proteína mais conservada do genoma
Adenovírus	Hexon IV (Componente da fibra)	Gene hexon possui regiões conservadas, e o gene do componente da fibra (IV) é utilizado para determinar os tipos dos adenovírus
Metapneumovírus	N (Nucleoproteína) M (Matriz) F (Fusão) L (Polimerase)	Estudos têm demonstrado maior sensibilidade de testes utilizando os genes N ou L como alvos

1.5 Prevenção e Tratamento das ITRs virais

Medidas de controle e prevenção devem ser baseadas nas formas de transmissão dos vírus. Intervenções profiláticas incluem o cumprimento de normas de controle de infecção relacionadas com medidas básicas de higiene pessoal, como a lavagem frequente das mãos e desinfecção de superfícies, além de conteúdo educacional para a comunidade a fim de esclarecer sobre as doenças, modo de transmissão,

profilaxia e vacinação (Barker et al. 2001, Rabie & Curtis 2006, Gould & Drey 2009, Luby et al. 2014). O diagnóstico laboratorial precoce e tratamento eficaz também estão inclusos nos meios de controle de transmissão, uma vez que têm como objetivo a resolução da doença e como consequência a diminuição das taxas de transmissão viral (Seto et al. 2013).

Apesar das medidas preventivas serem eficazes, a possibilidade de vacinação disponível facilitaria a prevenção de episódios de infecções do trato respiratório, particularmente com relação às doenças respiratórias graves que são responsáveis por maior morbidade e mortalidade (Nichols et al. 2008, Ruuskanen et al. 2011).

Até o momento há disponibilidade de vacina apenas para o vírus influenza, a qual é recomendada anualmente, em especial para grupos alvos definidos pelo Ministério da Saúde, sendo estes gestantes, crianças com idade inferior a cinco anos, adultos com idade superior a 60 anos, profissionais da área de saúde, indivíduos imunocomprometidos e portadores de doenças crônicas (Brasil 2015). A vacinação é anual devido às mudanças das características dos vírus influenza consequentes da sua diversidade antigênica e genômica. A vacinação contra influenza tem contribuído na redução da mortalidade em indivíduos portadores de doenças crônicas, tais como: doença cardiovascular, doenças renais, diabetes e DPOC. Em 2015, a vacina sazonal de subunidades do vírus influenza foi composta de três variantes virais, FLUA H1N1pdm09, FLUA H3N2 e FLUB (Brasil 2015).

Para o vírus sincicial respiratório existem estudos que propõem candidatos promissores a possíveis vacinas (MacLellan et al. 2013, Kim et al. 2014, Mackow et al. 2015). Já em relação a medicamentos, o palivizumabe (PZ), aprovado pelo FDA – *Food and Drug Administration* em 1998 para utilização em pacientes com risco para infecção grave pelo RSV, é a única droga disponível para prevenção do RSV. O PZ é um anticorpo monoclonal humanizado (IgG) que é ativo contra RSV-A e RSV-B a partir da neutralização da proteína de fusão (F) e pode ser administrado via endovenosa ou intramuscular (Romero 2003, Clercq 2015).

O tratamento das infecções respiratórias virais consiste na maioria dos casos em tratamento de suporte, como hidratação adequada, tratamento da febre, de secreções e da obstrução brônquica. O uso precoce de antivirais (até 48 horas após início dos sintomas) reduz a transmissão do vírus e a gravidade da doença, sendo indicado, nos casos de influenza, para grupos de risco de evolução para quadros com complicações,

independentemente do histórico de vacinação e confirmação laboratorial da infecção. Dentre os medicamentos antivirais utilizados no tratamento das infecções causadas por vírus respiratórios está incluso a Ribavirina, um análogo de nucleosídeo de amplo espectro, sendo eficaz contra diversos vírus, como RSV, influenza, picornavírus e outros. Contudo, o uso da Ribavirina em recém-nascidos e crianças hospitalizadas deve ser realizado com cautela devido seu efeito teratogênico e possível dano ao trato respiratório (Nichols et al. 2008, Beaucourt & Vignuzzi 2014). Oseltamivir e Zanamivir, inibidores de neuraminidase, são amplamente utilizados para tratamento e profilaxia de infecções pelo vírus influenza. Já os inibidores de canais de íon M2, Amantadina e Rimantadina, também utilizados contra influenza, não possuem uso disseminado, pois os vírus desenvolvem rápida resistência (Tregoning & Schwarze 2010, Jackson et al. 2011, Brasil 2013).

1.6 Epidemiologia das infecções por vírus respiratórios

As infecções do trato respiratório são responsáveis por cerca de quatro milhões de mortes mundialmente, sendo 98% devido a infecções do trato respiratório inferior (WHO 2014a). Estima-se que nos países em desenvolvimento, todo ano uma média de 11,3 milhões de crianças menores de cinco anos são admitidas em hospitais por infecções do trato respiratório inferior, com uma taxa de mortalidade de 2,3%, comparados com aproximadamente 570 mil casos e taxa de letalidade de 0,6% em países desenvolvidos (Nair et al. 2013).

O perfil de ocorrência das infecções virais respiratórias é variável e está relacionado com a região, clima e período do ano. Em regiões de clima temperado, com estações geralmente bem definidas, os vírus respiratórios normalmente seguem padrões sazonais de atividade, conforme fatores associados à temperatura (Monto 2004). Assim, influenza, PIV, hMPV e RSV, por exemplo, possuem picos de incidência no inverno, enquanto enterovírus são comuns no outono e verão, e infecções por rinovírus possuem maior incidência no outono e primavera, embora circulem durante o ano todo (du Prel et al. 2009). Também em regiões de clima temperado, é comum a ocorrência de cocirculação de vários vírus em um dado período do ano, mesmo durante o pico de ocorrência de um determinado agente respiratório (Tamerius et al. 2013, Pica & Bouvier 2014).

Em locais de clima tropical, como o Brasil, a sazonalidade dos vírus respiratórios é reflexo da influência de diferentes fatores como ocorrência de chuvas, umidade do ar e temperatura, dificultando a definição de um padrão (Moura et al. 2009, Loh et al. 2011, Gardinassi et al. 2012).

Como referido anteriormente, temperaturas mais baixas, assim como a baixa umidade relativa do ar podem afetar o sistema imune e trato respiratório, deixando o hospedeiro mais suscetível às infecções. Tais condições ambientais podem facilitar a disseminação das partículas virais, aumentando a chance de transmissão, o que reflete na sazonalidade do patógeno (Moura 2010, Paynter 2015). Ademais, dentro de uma mesma região pode existir variação na circulação de patógenos, visto que em países de grandes dimensões as características climáticas podem mudar em diferentes localidades (Weber et al. 1998, van der Sande et al. 2004).

Diversos estudos em todo o mundo relatam positividade para vírus respiratórios que variam de 35,3% a 84% em crianças com quadros de ITR, com maior destaque para RSV e rinovírus (Jansen et al. 2011, Martin et al. 2013, Wang et al. 2016). Em população de adultos e idosos também com sintomatologia respiratória, são descritos índices variando de 29,6% a 57,6%, sendo RSV, rinovírus e vírus influenza os mais prevalentes (Yu et al. 2012, Falsey et al. 2014, Stover & Litwin 2014).

Liao et al. (2015) investigaram indivíduos de 0-60 anos com doença respiratória aguda atendidos em hospitais na China, encontrando prevalência global da infecção por pelo menos um vírus em 48,4% das amostras. Dentre os vírus detectados, FLU A foi o de maior prevalência, seguido por RSV, hMPV e HCoV (25,8%; 22,7%; 11,4% e 10% respectivamente). Quanto à sazonalidade, maior positividade global foi observada nos meses do verão e outono, contudo, vírus como RSV, FLU B e hMPV tiveram maior detecção nos meses de inverno.

Em estudo realizado nos Estados Unidos, durante os meses de inverno de 2008 a 2012, 965 amostras clínicas de *swab* da oro e nasofaringe provenientes de adultos apresentando quadro clínico de ITR foram testadas para 10 vírus respiratórios. Destas, 31% apresentaram positividade para pelo menos um dos vírus pesquisados. Os vírus mais prevalentes foram os RSV (21%), FLUA (19,7%) e HCoV-OC43 (17,3%), além disso, sete codetecções foram observadas (Branche et al. 2014).

Em Camboja, durante o período de 2007 a 2010, Guerrier et al. (2013) reportaram índice de positividade de 54,8%. O estudo foi conduzido em crianças de zero a cinco anos de idade com diagnóstico clínico de ITRI. Dos vírus identificados, os

mais frequentes foram rinovírus (37%), RSV (34,8%) e os vírus parainfluenza (9,2%), ainda, 4,9% das amostras foram positivas para mais de um vírus, com destaque para as associações envolvendo RSV, HRV, HBoV e HAdV. Em relação ao perfil sazonal, os vírus HRV e PIV demonstraram circulação durante todo o ano, enquanto as infecções por RSV e hMPV tiveram pico na estação de maior precipitação pluviométrica.

Bicer et al. (2013) pesquisaram 14 vírus respiratórios em aspirados nasofaríngeos de crianças hospitalizadas com ITR durante 2010-2011, na Turquia. Positividade de 66,5% foi relatada, com os seguintes vírus mais prevalentes: RSV (32%), HAdV (26,2%), PIV 1-4 (19,4%), HRV (18,4%), FLU (12,6%), hMPV (12,6%), HCoV (2,9%) e HBoV (0,9%). Codetecções com dois ou mais vírus foram observadas em 20,6% das amostras positivas, com destaque para RSV, HRV e HAdV. Os vírus RSV, FLU, hMPV e HCoV demonstraram maior circulação nos meses de inverno, enquanto HAdV e HBoV foram detectados principalmente em meses quentes. Já os parainfluenza e rinovírus circularam durante o ano todo.

Em relação à população pediátrica assintomática, estudos demonstram índices de detecção viral de 27% a 40%, sendo que os rinovírus e adenovírus são os agentes mais frequentemente observados (van der Zalm et al. 2009, Thavagnanam et al. 2010, Jansen et al. 2011). Um estudo realizado por Jansen et al. (2011) investigou a presença de vírus respiratórios em crianças com quadro clínico de ITR e em crianças com ausência de sintomas respiratórios atendidas em hospital pediátrico de Amsterdam – Alemanha. Das crianças sintomáticas, 72% foram positivas para pelo menos um vírus respiratório, enquanto a positividade foi de 27% para as crianças assintomáticas. Ainda, codetecções foram observadas em 19,1% dos casos sintomáticos e em 3,2% dos assintomáticos.

No Brasil, os índices de detecção de vírus respiratórios em população pediátrica com quadros de infecção respiratória variam de 18,6% a 85,5%, com destaque para os vírus influenza, RSV e rinovírus (Thomazelli et al. 2007, Bezerra et al. 2011, Castro et al. 2015). Em indivíduos imunocomprometidos e idosos, os índices de positividade viral estão entre 38%-60%; influenza, rinovírus e parainfluenza são os mais observados (Carvalho et al. 2013, Lima et al. 2013, Benites et al. 2014).

Em estudo realizado durante 2004 e 2005 em São José do Rio Preto, interior de São Paulo, Gardinassi et al. (2012) avaliaram a positividade de vírus respiratórios em crianças de até seis anos com quadro de infecção respiratória aguda. Pelo menos um vírus respiratório foi detectado em 54,4% das amostras respiratórias com maiores

ocorrências dos vírus RSV (42,6%), HRV (42,6%) e PIV3 (9,5%), seguidos de hMPV (7,4%), PIV1 (6,6%), FLUB (3,3%), FLUA (2,5%) e PIV2 (0,8%). Maior positividade foi observada durante os meses da primavera em 2004 e do outono de 2005.

Albuquerque et al. (2012) descreveram índice de prevalência das infecções respiratórias virais de 31,2% em crianças apresentando ITR no estado do Rio de Janeiro, entre os anos de 2006 e 2007. Oito amostras (3,9%) foram positivas para mais de um patógeno. Os vírus mais prevalentes foram os rinovírus (51,6%), FLUA (7,8%), HBoV (7,8%), hMPV (7,8%) e RSV (4,7%). A maioria das infecções foi detectada nos meses de junho e novembro, correspondendo ao final do outono, inverno e primavera (Albuquerque et al. 2012).

No estado de Goiás, apenas um estudo foi desenvolvido. Castro (2015) investigou a presença de 16 vírus respiratórios em população constituída por crianças de quatro a 14 anos, apresentando ou não doença crônica e com diagnóstico clínico de infecção do trato respiratório. A positividade encontrada foi de 18,6%, com destaque para HRV (21,4%), FLUA (11,9%) e HAdV (11,9%); quatro casos de codeteções foram identificados. Quanto ao perfil sazonal, maior positividade do RSV foi observada nos meses de maior umidade relativa do ar e maior precipitação pluviométrica. Os vírus influenza foram predominantemente detectados logo após a temporada de chuvas, os PIVs nos meses de temperaturas baixas e os rinovírus foram detectados durante todo o ano.

As variações nas positividades registradas em cada estudo devem ser consideradas com cautela, pois envolvem características individuais de cada trabalho. Em um estudo de revisão, Goka e colaboradores ressaltam que vários fatores contribuem para heterogeneidade nos resultados dos estudos sobre infecções por vírus respiratórios, como por exemplo: número de vírus testados, ano e época de realização do estudo, características da população recrutada (comorbidades, a idade do paciente, sexo, estado imunológico), diferenças nos critérios de inclusão/exclusão, duração dos estudos e diferença nos testes de detecção utilizados (Goka et al. 2013). Assim sendo, as diferenças no desenho dos estudos, bem como características de cada região (geográfica/climática) onde o mesmo é realizado, são fatores que contribuem para a heterogeneidade de resultados e devem ser levados em consideração quando comparados. O Quadro 3 ilustra estudos sobre vírus respiratórios em diferentes populações, selecionados com base na metodologia de detecção, população de estudo e

regiões geográficas onde o mesmo foi realizado, demonstrando as variações entre os diversos trabalhos.

Quadro 3. Levantamento de estudos de detecção viral em amostras respiratórias.

Autor, País	N amostral	População de estudo	Amostra coletada	Metodologia de detecção	Índice de Positividade	Vírus com maior frequência de detecção	Índice de co-deteção
Thavagnanam et al. 2010, Reino Unido	55	1-14 anos com ausência de sintomas respiratórios	Lavado broncoalveolar	Multiplex-PCR	35%	HAdV (47,4%), RSV (26,3%) e HRV (15,8%)	3,6% (2/55)
Wang et al. 2010, China	817	0-9 anos com quadro clínico de ITR	Swab de nasofaringe	Multiplex-PCR	59,5%	RSV (24,7%), HBoV (34,5%) e FLU (22,2%)	13,8% (113/817)
Frobert et al. 2011, França	73	0-2 anos com quadro clínico de ITR	Aspirado de nasofaringe	Multiplex-PCR	78%	RSV-A (49,1%), RSV-B (17,5%) e HRV (14%)	27,4% (20/73)
Jansen et al. 2011, Holanda	298	0-6 anos apresentando ou não quadro clínico de ITR	Lavado nasal	Multiplex-PCR	48,3%	HRV (29,2%), RSV (22,2%) e HCoV (7,6%)	10,7% (32/298)
Guerrier et al. 2013, Camboja	1006	0-5 anos com quadro clínico de ITR	Aspirado de nasofaringe	Multiplex-PCR	54,8%	HRV (37%), RSV (34,8%) e PIV (9,2%)	4,9% (49/1006)
Bicer et al. 2013, Turquia	155	0-9 anos com quadro clínico de ITR	Aspirado de nasofaringe	Multiplex-PCR	66,5%	RSV (32%), HAdV (26,2%) e PIV (19,4%)	13,5% (21/155)
Heo et al. 2014, Coreia do Sul	207	Militares com quadro clínico de ITR	Swab nasofaringe	Multiplex PCR	42%	HAdV (63,9%), FLUA (30,2%) e FLUB (4,6%)	1,5% (3/207)
Cui et al. 2015, China	1074	0-16 anos com quadro clínico de ITR	Swab de naso e orofaringe	Multiplex qPCR	82,3%	EV (42,3%), HRV (39,9%) e HCoV (17,5%)	38,6% (415/1074)
Morikawa et al. 2015, Japão	200	3-10 anos com ausência de sintomas respiratórios	Amostras de gargarejo	qPCR	22,5%	HRV (44,4%), Parechovirus (17,8%) e HAdV (11,1%)	2% (4/200)
Wang et al. 2016, China	3662	0-4 anos apresentando quadro clínico de ITR	Swabs de orofaringe	RT-PCR	35,3%	FLUB (27%), FLUA (20,9%) e RSV-A (15,3%)	2,9% (106/3662)

Quadro 3. Levantamento de estudos de detecção viral em amostras respiratórias. (Continuação)

Autor, País	N amostral	População de estudo	Amostra coletada	Metodologia de detecção	Índice de Positividade	Vírus com maior frequência de detecção	Índice de co-deteção
Martínez-Roig et al. 2015, Espanha	463	0-15 anos com quadro clínico de ITR	Aspirado de nasofaringe	Multiplex-PCR	83,1%	RSV-B (36,1%), HRV (29,6%) e RSV-A (28,8%)	51,4% (238/463)
Self et al. 2015, Estados Unidos	1783	1-73 anos apresentando ou não quadro clínico de ITR	Swab nasal ou orofaringe	qPCR	42,1%	HRV (39,3%), RSV (31%), hMPV (19%)	Não foi avaliado
Thomazelli et al. 2007, Brasil	336	0-5 anos com quadro clínico de ITR	Aspirado de nasofaringe	PCR	55,6%	RSV (43,3%), hMPV (32,1%) e PIV3 (15%)	7,1% (24/336)
Bezerra et al. 2011, Brasil	407	0-5 anos com quadro clínico de ITR	Aspirado de nasofaringe	q-PCR	85,5%	RSV (43,7%), HAdV (29%) e HRV (22,1%)	39,5% (161/407)
Gardinassi et al. 2012, Brasil	272	0-6 anos com quadro clínico de ITR	Lavados de nasofaringe	PCR	54,4%	RSV (42,6%), HRV (42,6%), e PIV3 (9,5%)	12,1% (33/272)
Albuquerque et al. 2012, Brasil	205	0-15 anos com quadro clínico de ITR	Swab nasal	PCR ou qPCR	31,2%	HRV (51,6%), FLUA (7,8%), HBoV (7,8%) e hMPV (7,8%)	3,9% (8/205)
Silva et al. 2013, Brasil	260	0-3 anos com quadro clínico de ITR	Aspirado de nasofaringe	qPCR	85,4%	RSV (62,6%), hMPV (37,4%) e HRV (24,8%)	56% (146/260)
Carvalho et al. 2013, Brasil	33	~10 anos com quadro clínico de ITR	Swab nasofaringe	qPCR	60,6%	FLUA (25%), HRV (15%) e PIV (15%)	12,1% (4/33)
Arruda et al. 2014, Brasil	432	0-2 anos com quadro clínico de ITR	Aspirado de nasofaringe	qPCR	78,9%	RSV (41,9%), HRV (37,2%) e HBoV (24,3%)	37,3% (161/432)
Benites et al. 2014, Brasil	104	0-21 anos com quadro clínico de ITR	Aspirado de nasofaringe	qPCR	50%	HRV (46,1%), RSV (17,3%) e HCoV (13,5%)	20,2% (21/104)
Silva et al. 2015, Brasil	134	19-80 anos com quadro clínico de ITR	Swab nasal	qPCR	32,1%	HBoV (27,9%), HAdV (25,6%) e HRV (16,3%)	4,5% (6/134)
Castro 2015, Brasil	225	6-14 anos apresentando ou não quadro clínico de ITR	Aspirado nasofaríngeo e/ou swab nasal	Multiplex-PCR	18,6%	HRV (21,4%), FLUA (11,9%), HAdV (11,9%)	1,8% (4/225)
ITR, Infecção do trato respiratório; qPCR, PCR em tempo real; FLU, Vírus Influenza; RSV, Vírus Sincicial Respiratório; PIV, Vírus Parainfluenza; HRV, Rinovírus; EV, Enterovírus; HCoV, Coronavírus; hMPV, Metapneumovírus; HAdV, Adenovírus; HBoV, Bocavírus							

2 JUSTIFICATIVA

As infecções do trato respiratório são responsáveis por alta taxa de morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento. As infecções do trato respiratório superior, apesar de consideradas de menor gravidade, acarretam prejuízos à sociedade em termos de dias de trabalho/escola perdidos, além de custos econômicos adicionais à saúde. Anualmente, cerca de 1,4 – 1,6 milhões de crianças menores de cinco anos morrem devido pneumonia ou outra infecção do trato respiratório inferior em todo o mundo (WHO 2014c). No Brasil, no período de maio/2014 a maio/2015 foram notificados cerca de 7.724 casos de infecções respiratórias virais no país, sendo 50,4% considerados infecções graves (Brasil 2014a, Brasil 2014b, Brasil 2015b).

A identificação do agente etiológico nos casos de ITRs se torna necessária, principalmente, em ambientes de serviço de atendimento e urgência pediátrica, auxiliando no direcionamento de intervenções terapêuticas e otimizando medidas de controle e prevenção destas infecções, além de reduzir inúmeros testes laboratoriais, diminuindo assim custo econômico, e ainda conter o uso indiscriminado de antibióticos (Pavia 2011). Neste sentido, a utilização de técnicas moleculares tem proporcionado resultados mais sensíveis e com alta especificidade (Mahony et al. 2011, Jartti et al. 2013).

Apesar da importância de bactérias como agentes de infecções do trato respiratório, vírus são responsáveis por cerca de 80% destas infecções em crianças menores de cinco anos (Ruuskanen et al. 2011, Nair et al. 2012, Niederman & Krilov 2013). O papel destes agentes nas diferentes síndromes respiratórias tem sido amplamente avaliado na literatura internacional. No Brasil, embora estudos direcionados à população pediátrica tenham sido descritos (Quadro 3), na Região Centro-Oeste são escassos, destacando-se a investigação conduzida por este grupo em crianças entre quatro e 16 anos de idade em Goiânia-GO.

Neste contexto, considerando a relevância das infecções respiratórias virais e a lacuna no conhecimento destas informações em nossa região, a realização do presente estudo fornecerá informações a respeito da circulação dos principais vírus respiratórios em ambiente hospitalar pediátrico, e assim, contribuirá na avaliação do papel destes agentes na etiologia de doenças respiratórias. Este constitui o primeiro estudo no estado de Goiás que avaliou a frequência de vírus respiratórios em pacientes

pediátricos com idade entre zero e seis anos atendidos em hospital público do município de Goiânia e cujos resultados obtidos agregarão conhecimento no campo científico, podendo fornecer dados para a elaboração de medidas educativas preventivas e ainda informações para futuras estratégias de imunoprofilaxia que auxiliarão no controle de infecções respiratórias agudas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a ocorrência de vírus respiratórios em população pediátrica atendida em unidade de saúde pública do município de Goiânia-Goiás.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os índices de detecção dos principais vírus respiratórios em crianças atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia (HMI), durante o período de um ano;
- Analisar a frequência viral em relação à presença ou não de sintomas de infecção respiratória aguda;
- Relacionar a positividade dos vírus com aspectos epidemiológicos da população pediátrica estudada;
- Avaliar o perfil de circulação viral, considerando os fatores climáticos;
- Identificar a ocorrência de codetecção dos vírus respiratórios pesquisados.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento e População do Estudo

O presente estudo, de caráter transversal observacional, teve sua etapa de coleta conduzida por um período de um ano (maio/2014 a maio/2015) no Hospital Materno Infantil de Goiânia (HMI). O HMI é referência estadual em urgência e emergência nas áreas de saúde da criança e da mulher, com atendimento 100% de usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), dedicando-se principalmente a assistência médico-hospitalar, além de contribuir para o ensino e a pesquisa (Brasil 2016).

A população de estudo foi constituída por crianças com idade inferior a seis anos, atendidas na unidade de pronto-atendimento (emergência) bem como em enfermarias do HMI, constituindo amostra de conveniência. Foram estabelecidos dois grupos de estudo, considerando diferentes critérios de inclusão. O primeiro grupo foi composto por crianças apresentando quadro clínico de infecção respiratória, denominado de grupo sintomático. Para a definição de um quadro sintomático foram considerados os seguintes critérios: apresentação de no mínimo dois sinais respiratórios como tosse, febre ou sibilância e resultado da ausculta. O segundo grupo foi composto por crianças que no momento da coleta não apresentavam sinais de infecção respiratória, de acordo com os critérios referidos anteriormente, sendo denominado grupo assintomático. As crianças do grupo assintomático foram atendidas no hospital por alguma razão que não quadro de infecção respiratória, como por exemplo, sintomatologia para outras doenças infecciosas, procedimentos cirúrgicos, acidentes, doenças congênitas, crises convulsivas, entre outros.

As visitas ao HMI por parte do pesquisador responsável pela coleta das amostras ocorreram diariamente no período matutino, excluindo-se os finais de semana. Para a seleção das crianças, primeiro procedeu-se uma abordagem direta dos possíveis casos elegíveis (crianças com idade inferior a seis anos). As fichas de avaliação clínica destas crianças foram revisadas pelo membro da equipe de pesquisa para confirmar a possibilidade de participação no estudo e determinar em qual grupo o indivíduo seria incluído de acordo com os critérios referidos anteriormente.

Após identificação dos casos elegíveis, procedeu-se o recrutamento dos pacientes e esclarecimentos a respeito da pesquisa e metodologia de coleta da amostra. Em caso de consentimento, foi obtida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLE – Anexo A) pelos pais ou responsáveis, seguida pela entrevista para preenchimento do questionário contendo dados clínicos e epidemiológicos (Anexo B).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás - CAAE: 37305314.7.0000.5078 (Anexo C).

4.2 Coleta e Preparo das Amostras Clínicas

Após assinatura do TCLE e preenchimento do questionário, se procedeu a coleta de uma amostra de *swab* nasal (*Swab* de nylon - FLOQSwabs, Copan, Brescia, Itália) de uma narina, sendo realizada pelo membro da equipe de pesquisadores, no ambiente de atendimento nas respectivas unidades do Hospital. Os *swabs* foram coletados conforme descrito por Lambert (2008), armazenados em tubo estéril contendo 2 mL de meio de transporte MEM (Meio Mínimo Essencial, Gibco, Life Technologies, Estados Unidos), fechados e identificados adequadamente. As amostras foram conservadas e transportadas refrigeradas em até quatro horas para o Laboratório de Virologia Humana do IPTSP/UFG, onde foram imediatamente processadas.

O processamento dos *swabs* coletados foi realizado a fim de obter uma solução homogênea sem células. Brevemente, o *swab* já em meio essencial mínimo foi homogeneizado em vórtex (Vertex QL901) com o objetivo de liberar qualquer célula do *swab* para o meio. Em seguida, o *swab* foi retirado do tubo, seguindo centrifugação a 1300 rpm (rotação por minuto), 10°C por 10 minutos. O sobrenadante foi separado do sedimento celular e armazenado adequadamente em criotubo à -80°C até a realização dos ensaios moleculares (Figura 4).

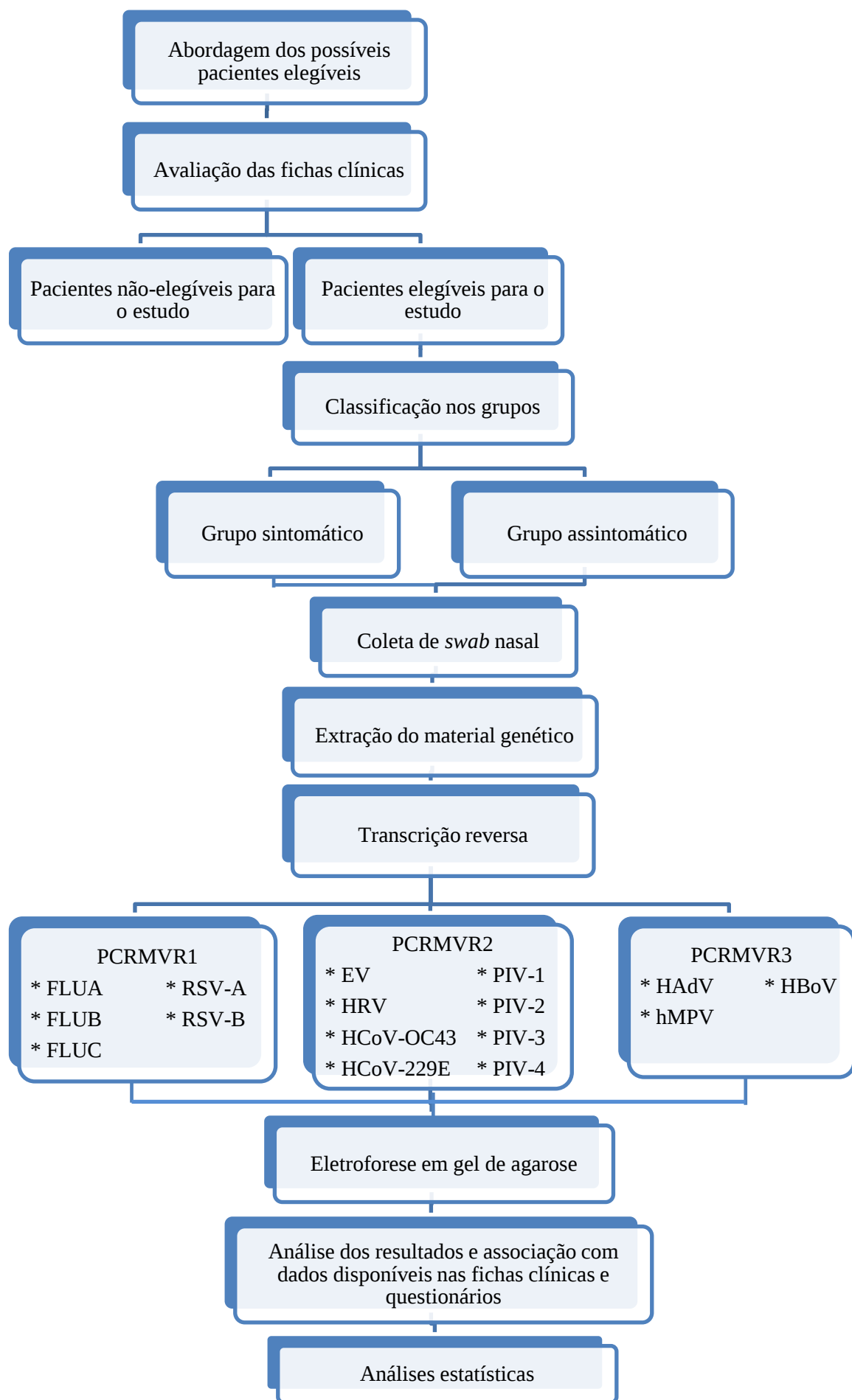


Figura 4. Fluxograma do estudo.

4.3 Triagem Molecular

4.3.1 Extração do Material Genético

O material genético viral (RNA ou DNA) foi extraído a partir de 200 µL da amostra processada utilizando o Kit QIAamp® Cador® Pathogen Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram tratadas com proteinase K e RNA carreador com posterior homogeneização em vórtex. Após adição do tampão de lise e nova homogeneização, o lisado foi transferido para mini-colunas de eluição fornecidas pelo kit. Posteriormente duas etapas de lavagem com tampões específicos foram realizadas e, ao final do processo, foi obtido um eluído de 150 µL por amostra extraída, o qual foi armazenado em freezer -80°C até utilização em ensaios moleculares.

4.3.2 Transcrição Reversa

Para a pesquisa molecular dos vírus com material genético RNA, 20µL do produto de extração foram submetidos à reação de transcrição reversa (*reverse transcription* – RT) para síntese do DNA complementar (cDNA). A mistura de reação foi preparada contendo iniciador randômico (0,03 µM) (*Random Primer* – Invitrogen® Life Technologies, EUA), água DEPC, 1 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP – Invitrogen®), 80 U da enzima transcriptase reversa (MMLV - Invitrogen®), 1mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão 10X (menos MgCl₂) e 24 U de enzima inibidora de ribonuclease (RNaseOUT - Invitrogen®) para um volume final de 50 µL. A reação foi então processada em termociclador (Mastercycler Personal/Eppendorf) com ciclo único de 25°C por cinco minutos, 42°C por 10 minutos, 50°C por 20 minutos e 85°C por cinco minutos.

4.3.3 Reação em Cadeia pela Polimerase

O produto da reação de transcrição reversa foi então submetido a três reações multiplex *nested*-PCR para a detecção de 16 vírus respiratórios (Influenza A, B e C, Vírus sincicial respiratório A e B, Parainfluenza 1-4, Coronavírus 229E e OC43, Enterovírus, Rinovírus, Bocavírus, Metapneumovírus e Adenovírus). Foram utilizados

iniciadores e protocolos previamente descritos por Coiras e colaboradores (2003, 2004), Avellon et al. (2001), López-Huertas et al. (2005), Pozo et al. (2007), Allard et al. (1992), Puig et al. (1994), adaptados por Castro (2015). Assim, três reações compostas por duas etapas de amplificação foram estabelecidas: Multiplex vírus respiratórios 1 - MVR1 (FLU A, B e C, RSV A e B), Multiplex vírus respiratórios 2 - MVR2 (PIV 1 – 4, HCoV 229E e OC43, HRV e EV) e Multiplex vírus respiratórios 3 – MVR3 (hMPV, HAdV e HBoV). Todas as amostras coletadas foram submetidas aos três protocolos e, posteriormente, as amostras positivas foram confirmadas por um monoplex-PCR.

PCRMVR1 – Primeira amplificação. A 4 µL do cDNA previamente sintetizado, foram adicionados 0,3 mM de cada um dos iniciadores específicos (Quadro 4), água MilliQ e mix comercial para PCR (GoTaq Colorless Master Mix – Promega corporation, EUA – 50 U/mL de Taq DNA polimerase, tampão da reação – pH 8,5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 400 µM dCTP e 3 mM MgCl₂), completando um volume final de 25 µL. O sistema de reação foi então submetido à seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, 45 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (50°C, dois minutos) e extensão (68°C, um minuto), e uma extensão final a 68°C por 10 minutos.

Segunda amplificação. A reação de *nested*-PCR foi realizada utilizando 2 µL do produto da primeira amplificação, os mesmos reagentes e concentrações da primeira etapa, diferindo apenas nos iniciadores utilizados (Quadro 4). A ciclagem utilizada consistiu de desnaturação inicial a 95°C por quatro minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por 30 segundos, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4 - Sequências dos iniciadores utilizados na reação PCRMVR1.

Nome	Sequência 5' – 3'	Região Alvo	Fragmento (pb)
Primeira amplificação			
FluAC1	GAAC TCRTYCYWWATSWCAAWGRRGAAAT	NP	
FluB1	ACAGAGATAAAGAAGAGCGTCTACAA	NP	
FluABC	ATKGC GCWYRAYAMWCTYARRTCTTCAWAIGC	NP	
RSVAB	ATGGAGYTG CYRATCCWCARRRCAARTGCAAT	F	
RSVAB	AGGTGTWGT TACACCTGCATTRACACTRAATTC	F	
Segunda amplificação			
FluAB3	GATCAAGTGAKMGRRAGYMGRAAYCCAGG	NP	301 (FLUA) 226 (FLUB) 111 (FLUC) 363 (RSVA)
FluC3	AAATTGGAATTTGTTCTTTCAAGGGACA	NP	
FluAC4	TCTTCAWATGCARSWSMAWKGCATGCCATC	NP	
FluB4	CTTAATATGGAAACAGGTGTTGCCATATT	NP	
RSVA3	TTATACACTCAACAATRCCAAAAAWACC	F	

RSVA4	AAATTCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT	F	611 (RSVB)
RSVB3	ATCTTCCTAACTCTTGCTRTTAATGCATTG	F	
RSVB4	GATGCGACAGCTCTGTTGATTTACTATG	F	
NP, Nucleoproteína; F, Fusão			

PCRMVR2 – Primeira amplificação. A reação foi realizada com 4 µL do cDNA sintetizado, 0,16 mM de cada iniciador (Quadro 5), água MilliQ e mix comercial para PCR (GoTaq Colorless Master Mix – Promega corporation, EUA – 50 U/mL de Taq DNA polimerase, tampão da reação – pH 8,5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 400 µM dCTP e 3 mM MgCl₂), para um volume final de 25 µL. A ciclagem utilizada foi composta por desnaturação inicial a 94°C por três minutos, 45 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (55°C, 90 segundos), extensão (72°C, um minuto) e, por último, uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Segunda amplificação. A 2 µL do produto da primeira etapa, foram adicionados os mesmos reagentes da primeira amplificação, alterando-se o conjunto e concentração de iniciadores, a 0,2 mM (Quadro 5). A ciclagem utilizada foi a mesma da segunda amplificação utilizada para o PCRMVR1.

Quadro 5 - Sequências dos iniciadores utilizados na reação PCRMVR2.

Nome	Sequência 5' – 3'	Região Alvo	Fragmento (pb)
Primeira amplificação			
1-PIV13	AGGWTGYSMRGATATAGGRAARTCATA	HN	
2-PIV13	CTWGTATATATRTAGATCTTKTTRCCTAGT	HN	
1-PIV2	TAATTCCTCTTAAAATTGACAGTATCGA	HN	
1-PIV4	ATCCAGARRGACGTCACATCAACTCAT	5'UTR-HA	
2-PIV24	TRAGRCCMCCATAYAMRGGAATA	HN	
1-HCoV	TGTGCCATAGARGAYWTACTTTTT	S	
2-HCoV	AACCGCTTKYACCAKCAAYGCACA	S	
1-EV/RV	CTCCGGCCCCCTGAATRYGGCTAA	5'UTR-VP4/VP2	
2-EV/RV	TCIGGIARYTTCCASYACCAICC	5'UTR-VP4/VP2	
Segunda amplificação			
3-PIV13	ACGACAAYAGGAARTCATGYTCT	HN	439 (PIV1) 390 (PIV3) 297 (PIV2) 174 (PIV4)
4-PIV1	GACAACAATCTTTGGCCTATCAGATA	HN	
4-PIV3	GAGTTGACCATCCTYCTRTCTGAAAAC	HN	
3-PIV24	CYMAYGGRTGYAYTMGAATWCCATCATT	HN	
4-PIV2	GCTAGATCAGTTGTGGCATAATCT	HN	
4-PIV4	TGACTATRCTCGACYTTRAATAAGG	HN	
3-HCoV	TTGTGCGCAATGTTATAAWGGYAT	S	630 (229E) 587 (OC43)
4-HCoV	GATAATRTGAGTRCCATTWCCACA	S	
3-EV/RV	ACCRSTACTTTGGGTRWCCGTG	5'UTR-VP4/VP2	226 (EV)
4-EV/RV	CTGTGTTGAWACYTGAGCICCCA	5'UTR-VP4/VP2	110 (HRV)
HN, Hemaglutinina-Neuraminidase; S, Espícula; 5'UTR, Região 5' não codificante; HA, Hemaglutinina; VP, Proteína do capsídeo viral			

PCRMVR3 – Primeira amplificação. Para volume final de 25 µL, foram utilizados 2,5 µL do cDNA sintetizado, 0,24 mM de cada iniciador específico (Quadro 6), água MiliQ e mix comercial para PCR (GoTaq Colorless Master Mix – Promega corporation, USA – 50 U/mL de Taq DNA polimerase, tampão da reação – pH 8,5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 400 µM dCTP e 3 mM MgCl₂). A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, 40 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (53°C, um minuto) e extensão (72°C, 40 segundos) e a etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Segunda amplificação. A reação foi feita sob as mesmas condições da primeira amplificação, exceto os iniciadores (Quadro 6) e a quantidade de produto inicial (2 µL do amplicon da primeira reação). A ciclagem foi a seguinte: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, 30 ciclos de desnaturação (94°C por 3 minutos), anelamento (55°C, um minuto), extensão (72°C, 40 segundos) e a etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Quadro 6 - Sequências dos iniciadores utilizados na reação PCRMVR3.

Nome	Sequência 5' – 3'	Região Alvo	Fragmento (pb)
Primeira amplificação			
M1S	GAGTCCTACCTAGTAGACAC	Matriz	
M1A	TTGTYCCTTGRTGRCTCCA	Matriz	
HBOV1f	CACAGGAGCMGGAGYCGCAG	NP-1/VP1/VP2	
HBOV1r	CCAAGATATYTRTATCCAGG	NP-1/VP1/VP2	
ADHEX1f	AACACCTAYGASTACATGAAC	Hexon	
ADHEX1r	ACCTTGAAGKCBTTCCTACA	Hexon	
hexAA1885	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC	Hexon	
hexAA1913	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	Hexon	
Segunda amplificação			
M1S		Matriz	718 (hMPV)
M2A	TCTTGCAKATYYTRCTKATGCT	Matriz	
HBOV2f	GTGGTGTGGGTTCTACTGGC	NP-1/VP1/VP2	243 (HBoV)
HBOV2r	CTACGGTACACATCATCCCAG	NP-1/VP1/VP2	
ADHEX2f	CCCMTTYAACCACCACCG	Hexon	168 (HAdV)
ADHEX2r	TTGTACGARATGGGGTAK	Hexon	
nexAA1893	GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG	Hexon	142 (HAdV)
nexAA1905	TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC	Hexon	
NP, Nucleoproteína; VP , Proteína do Capsídeo			

4.3.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos de amplificação (10 µL), assim como o padrão de peso molecular *DNA ladder* (Invitrogen), foram misturados a 1 µL do tampão de corante da amostra (Azul de bromofenol; Xilenocianol; Glicerol) e submetidos a uma eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 2,0% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e tampão TBE 0,5X (Tris/Borato/EDTA). Posteriormente, o gel foi examinado em transluminador (Vilbert Loumart) com luz ultravioleta para a visualização dos fragmentos de DNA de tamanho esperado.

4.4 Análises Estatísticas

Os dados obtidos a partir dos questionários e fichas clínicas dos pacientes foram reunidos e digitalizados. Realizou-se avaliação das informações disponíveis e planilhas foram construídas a partir das mesmas, juntamente com os resultados.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Epi Info versão 7, sendo aplicado o teste de qui-quadrado (χ^2) e, quando adequado, o teste exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95%. Utilizou-se também o programa IBM SPSS Statistics, versão 20, para a análise de variância.

5 RESULTADOS

Durante o período de maio de 2014 a maio de 2015, 251 crianças foram incluídas no estudo e uma amostra de *swab* respiratório foi coletada de cada participante, com média de 21 coletas por mês. Dentre os pacientes envolvidos no estudo, 55,8% eram do sexo masculino e 75,7% tinham de 0-24 meses de idade. Em relação aos sintomas, 55% das crianças constituíram o grupo sintomático e 45% foram incluídas no grupo assintomático, posto que o número de amostras coletadas mensalmente foi similar entre os dois grupos. Outras características da população de estudo estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Características da população e índice de positividade viral nas amostras pesquisadas.

Características	N (%)	Positividade viral (%)	P
Gênero			
Masculino	140 (55,8)	57/140 (40,7)	0,07
Feminino	111 (44,2)	33/111 (29,7)	
Idade			
0 – 24 meses	190 (75,7)	71/190 (37,4)	0,6
25 – 48 meses	39 (15,5)	13/39 (33,3)	
49 – 72 meses	22 (8,8)	6/22 (27,3)	
Unidade de coleta			
Pronto-Socorro	152 (60,6)	58/152 (38,2)	0,2
Enfermaria	91 (36,2)	28/91 (30,8)	
Sem informação	8 (3,2)	4/8 (50)	
Presença de sintomas Respiratórios			
Sim	138 (55)	51/138 (37)	0,7
Não	113 (45)	39/113 (34,5)	
Período de coleta			
Seco	133 (53)	54/133 (40,6)	0,09
Chuvoso	118 (47)	36/118 (30,5)	
TOTAL	251 (100)	90/251 (35,9)	

O índice global de positividade para pelo menos um vírus respiratório foi de 35,9% (90/251). Não houve diferença estatisticamente significativa considerando a positividade viral em relação às características idade, presença de sintomas e unidade de coleta. Crianças do sexo masculino apresentaram positividade mais elevada ($p = 0,07$), assim como o observado para as amostras coletadas durante período seco ($p = 0,09$) (Tabela 1).

Dentre as 90 amostras positivas, 74 foram positivas para um único patógeno, enquanto 11 apresentaram positividade para dois vírus, quatro amostras para três agentes virais e uma foi positiva para cinco vírus respiratórios, totalizando 113 patógenos identificados. O vírus com maior frequência de detecção foi o rinovírus, representando 31% (35/113) dos agentes observados, seguido por RSV (27,4%; RSV-A - 25/113 e RSV-B - 6/113), PIV (13,3%; PIV-4 - 6/113, PIV-3 - 5/113, PIV-1 - 2/113 e PIV-2 - 2/113), adenovírus (10,7% - 12/113), influenza (9,7%; FLUC - 8/113, FLUB - 2/113 e FLUA - 1/113), bocavírus (5,3% - 6/113) e HCoV (2,6%; HCoV-229E - 2/113 e HCoV-OC43 - 1/113). Os patógenos enterovírus e metapneumovírus humano não foram observados no presente estudo (Figura 5).

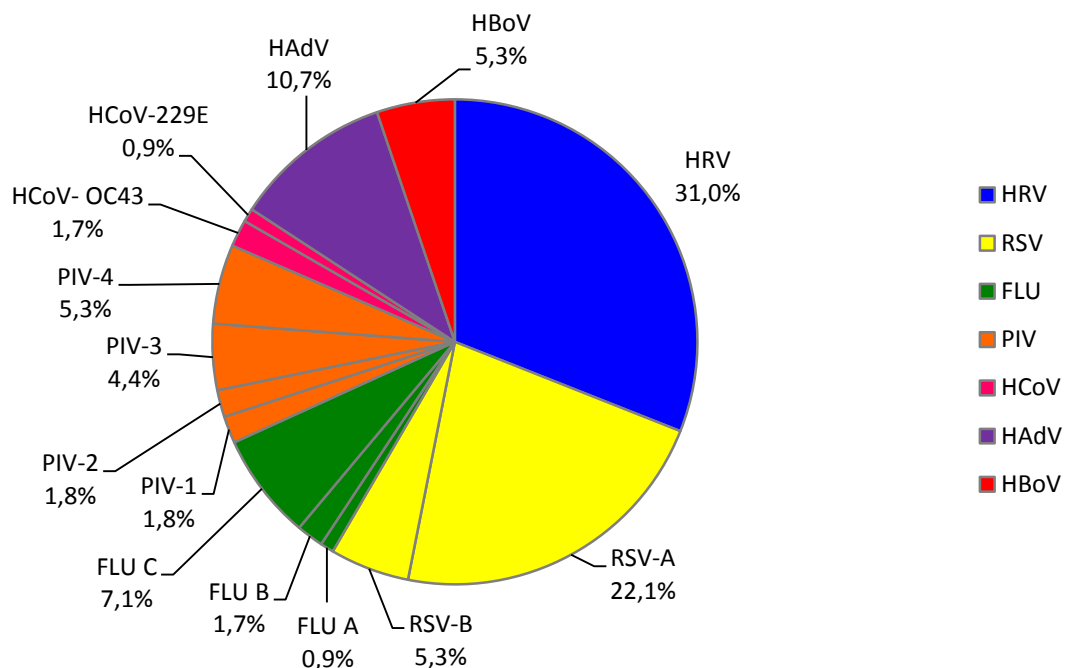


Figura 5. Distribuição dos vírus respiratórios identificados.

Em relação à faixa etária, observou-se maior positividade entre os indivíduos de 0-24 meses (37,4%), embora tal diferença não tenha sido estatisticamente

significativa, como referido anteriormente. Entretanto, a distribuição dos vírus identificados por cada grupo etário demonstra predominância de alguns patógenos em grupos específicos (Figura 6): o vírus sincicial respiratório predominou em crianças com até 24 meses, bem como o adenovírus. Em contrapartida, os vírus parainfluenza tiveram predominância no grupo de crianças com 29-48 meses e os influenza se destacaram em crianças de 49 a 72 meses de idade ($p<0,05$). Por fim, observou-se que os coronavírus apresentaram predominância em crianças entre 12 e 24 meses de idade ($p<0,05$), embora o dado não seja ilustrado na figura abaixo.

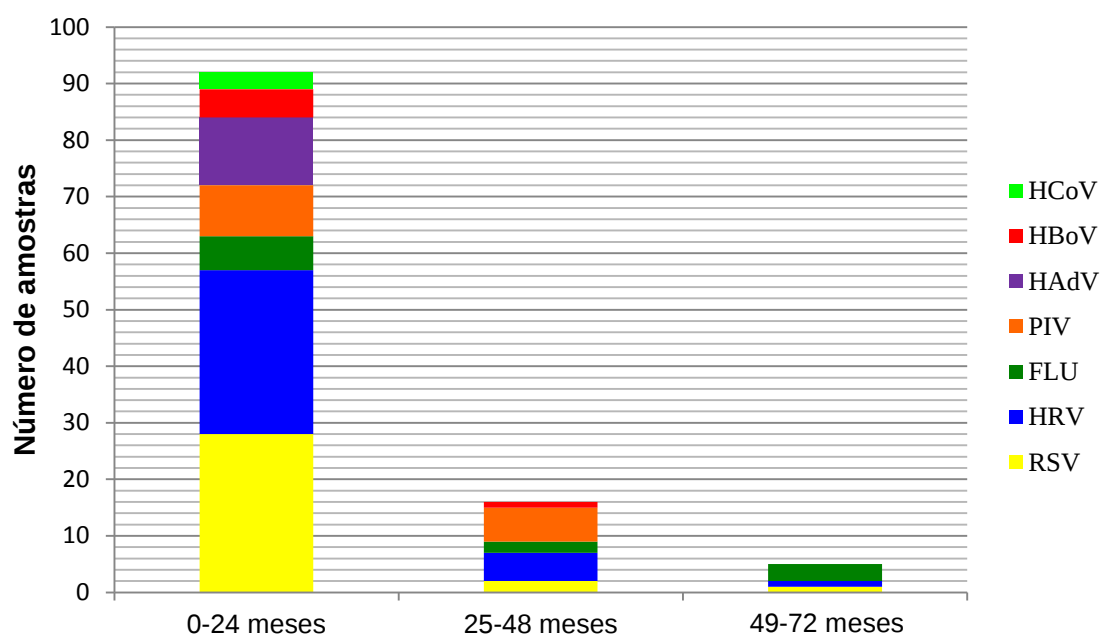


Figura 6. Distribuição dos vírus respiratórios identificados por faixa etária.

Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa no índice de positividade global entre os grupos analisados (sintomático e assintomático). Análise considerando cada grupo de estudo separadamente demonstrou índices significantes entre o grupo de crianças sintomáticas (Tabela 2). Neste sentido, maiores índices foram identificados entre crianças do grupo etário de 0-24 meses e entre as amostras coletadas durante o período seco ($p<0,05$). Para o grupo assintomático, nenhuma diferença significativa pode ser observada.

Tabela 2. Positividade viral em relação às características da população para os dois grupos de estudo.

	Sintomáticos			Assintomáticos		
	Positivo/N (%)	p	X ²	Positivo/N (%)	p	X ²
Sexo						
Feminino	18/62 (29)	0,08	3,0	15/49 (30,6)	0,4	0,5
Masculino	33/76 (43,4)			24/64 (37,5)		
Idade						
0-24 meses	42/100 (42)	0,04	3,9	29/90 (32,2)	0,4	0,6
25-48 meses	6/23 (26,1)			7/16 (43,7)		
49-72 meses	3/15 (20)			3/7 (42,9)		
Unidade de coleta						
Pronto-socorro	35/90 (38,9)	0,3	0,9	23/62 (37,1)	0,5	0,4
Enfermaria	12/40 (30)			16/51 (31,4)		
Período de coleta						
Seco	35/78 (44,9)	0,02	4,8	19/55 (34,5)	0,9	0,0
Chuvoso	16/60 (26,7)			20/58 (34,5)		

Entre as crianças do grupo sintomático (N=138), a avaliação considerando os sintomas descritos demonstrou que a associação febre, tosse e sibilância foi a mais frequente, presente em 77,5% dos pacientes, seguida de febre e tosse (20,3%) e a associação tosse e sibilância foi relatada para 2,1% dos indivíduos, observando-se distribuição similar para as crianças com positividade viral ou não (Tabela 3).

Tabela 3. Manifestações clínicas descritas no grupo sintomático e positividade viral (N=138).

Sintomas	Amostras positivas (%) N = 51	Amostras negativas (%) N = 87	Total
Febre, tosse e sibilância	40/51 (78,4)	67/87 (77)	107/138 (77,5)
Febre e tosse	10/51 (19,7)	18/87 (20,7)	28/138 (20,3)
Tosse e sibilância	1/51 (2)	2/87 (2,3)	1/138 (2,1)

Adicionalmente, os dois grupos populacionais apresentaram um perfil distinto dos vírus identificados (Figura 7). O grupo sintomático apresentou maior variedade no número de agentes detectados. Destaca-se a ocorrência dos vírus PIV-1,

PIV-2, FLU A e FLU B somente neste grupo, enquanto os coronavírus foram identificados exclusivamente nos pacientes assintomáticos. Não obstante, os vírus RSV e HRV foram os mais observados em ambos os grupos.

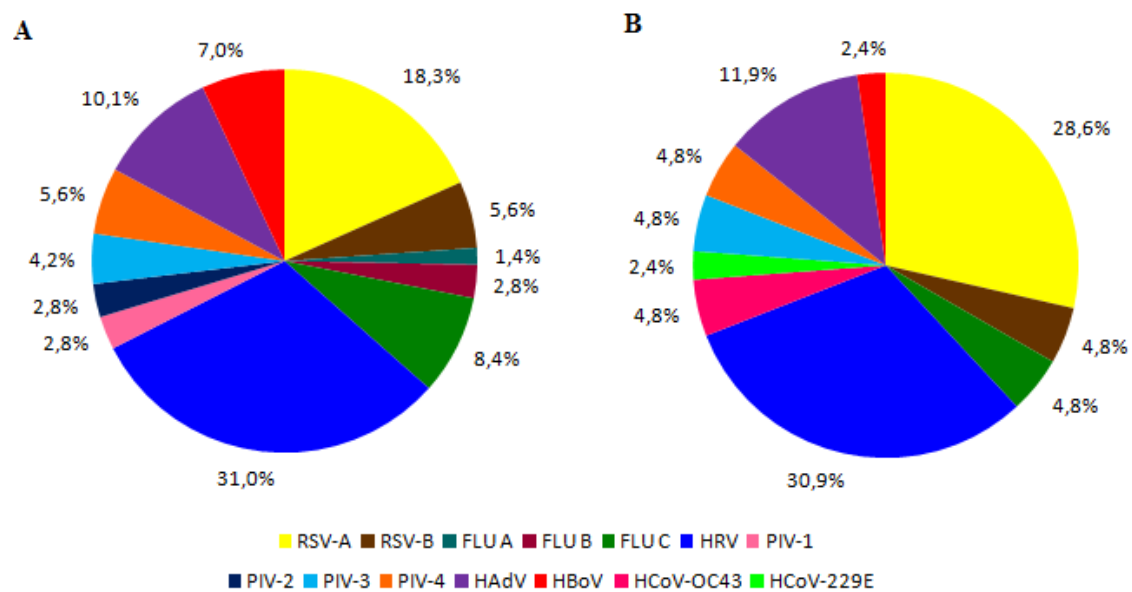


Figura 7. Distribuição viral em relação aos grupos de estudo, grupo sintomático (A) e grupo assintomático (B).

Foi observada positividade viral durante todo o período do estudo, de maio/2014 a maio/2015, com exceção do mês de março/2014, onde não houve detecção. Embora número semelhante de amostras tenha sido coletado entre as estações chuvosa e seca, maior positividade viral foi observada durante os meses de menor precipitação pluviométrica, menores temperaturas e menor umidade relativa do ar (UR), caracterizando o período seco do ano, compreendendo os meses de maio a setembro, contudo sem significância estatística (Figura 8).

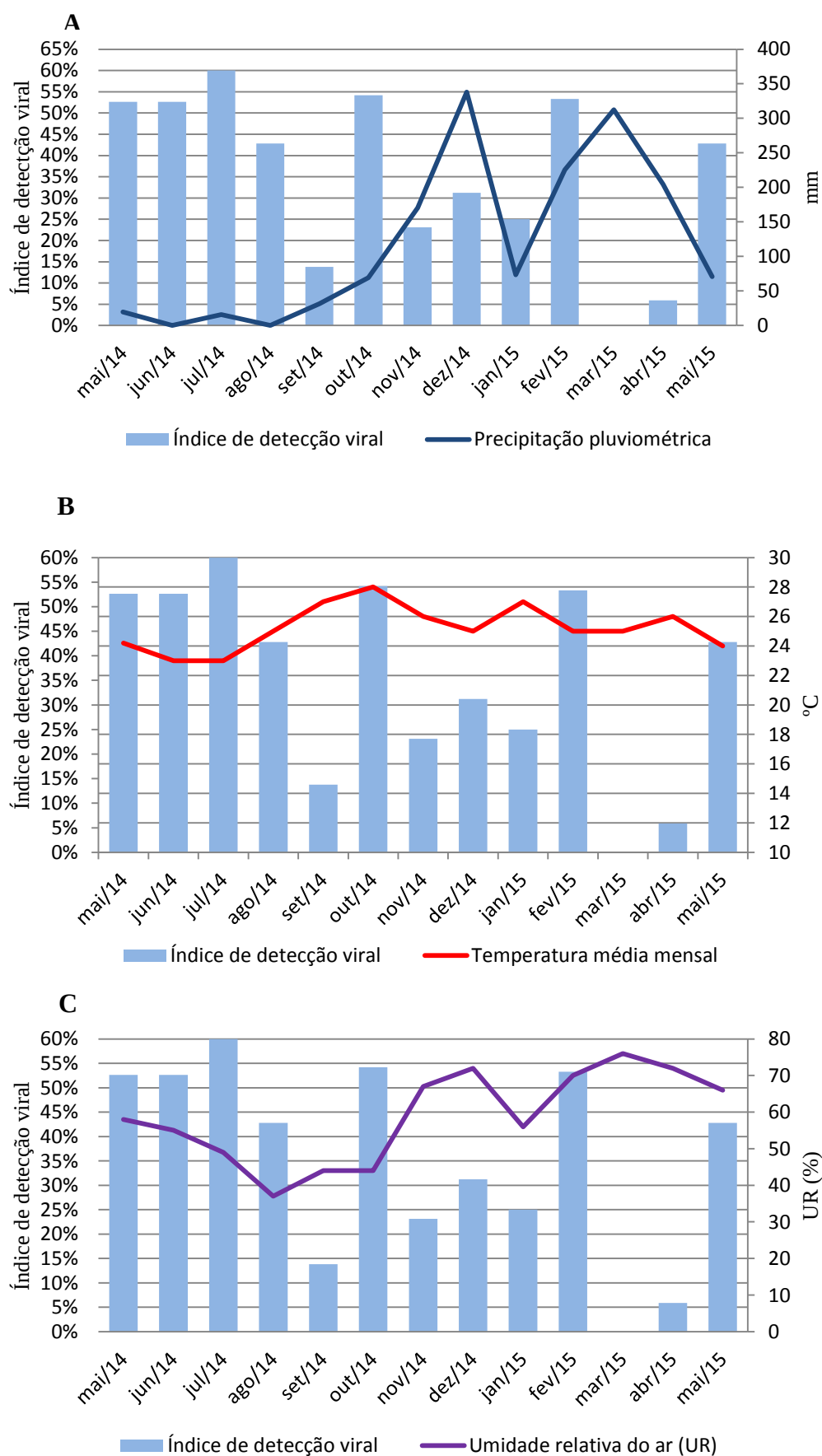


Figura 8. Variação do índice de detecção viral durante os meses de estudo em relação à precipitação pluviométrica (A), temperatura média mensal (B) e umidade relativa do ar (C).

Considerando a positividade para cada um dos vírus em relação ao período de coleta, foi possível observar alguns perfis temporais (Figura 9). O vírus sincicial respiratório teve maior percentual de positividade durante os meses de período seco (maio a setembro) ($p<0,001$), bem como os vírus influenza e rinovírus ($p<0,05$). Em contrapartida, os parainfluenza e adenovírus apresentaram maior positividade durante meses chuvosos (outubro a fevereiro) ($p<0,05$), o que também foi observado para os coronavírus (outubro e novembro). Por fim, os bocavírus foram observados de maneira similar durante as duas estações. Embora a identificação destas tendências temporais, não é possível definir um perfil sazonal para estes agentes, considerando o pequeno número de amostras positivas, bem como o período restrito de 13 meses avaliados.

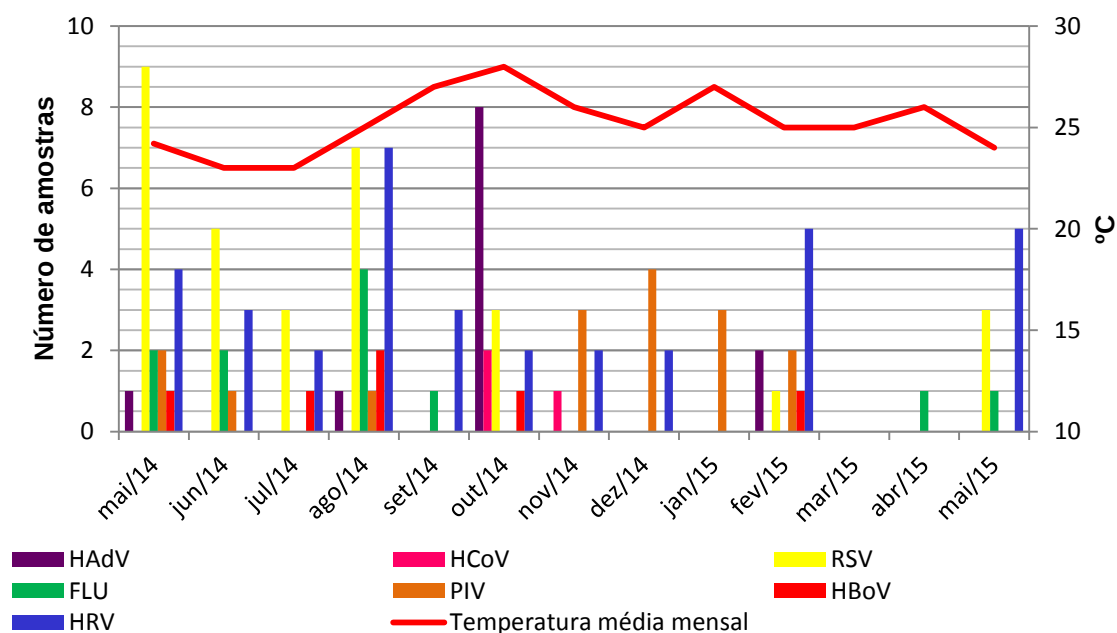


Figura 9. Distribuição dos vírus respiratórios identificados durante os meses de estudo.

As 16 amostras que foram positivas para mais de um vírus representam um índice de codetecção de 6,4%, sendo os vírus RSV ou HRV os mais comuns, presentes em 15 amostras. Ainda, o grupo de pacientes sintomáticos apresentou maior número de codetecções (81,2% - 13/16) quando comparado às observadas no grupo assintomático ($p<0,05$). Quanto à faixa etária, 93,7% (15/16) dessas amostras eram de crianças com 0-24 meses de idade, embora sem significância estatística (Tabela 4).

Tabela 4. Amostras positivas para mais de um vírus.

Codeteccções	Número de amostras	Idade (meses)
Grupo sintomático		
HRV+ RSV-A	2	4 ; 10
HRV + HAdV	1	3
HRV + HBoV	1	11
RSV-A + HBoV	1	0
RSV-A + HAdV	1	1
RSV-A + FLU C	1	6
RSV-B + FLU A	1	9
HRV + RSV-B + PIV-1	1	11
HRV + HBoV + FLU C	1	5
HRV + RSV-B + PIV-4	1	2
RSV-A + HAdV + PIV-1	1	24
HRV + HAdV + RSV-A + FLU B + PIV-4	1	8
Grupo assintomático		
HRV + RSV-A	1	14
HRV + PIV-4	1	31
HAdV + HCoV-OC43	1	16

6 DISCUSSÃO

A importância clínica-epidemiológica das infecções respiratórias virais encontra-se bem estabelecida em todo o mundo (Niederman & Krilov 2013). Neste contexto, a evolução das técnicas moleculares contribuiu de maneira determinante, em especial com o desenvolvimento de protocolos multiplex para a detecção de diferentes agentes, constituindo ferramenta rápida, sensível e precisa de pesquisa laboratorial (Jartti et al. 2013). Apesar deste avanço, o presente estudo constitui a primeira investigação da ocorrência de vírus respiratórios em população pediátrica de zero a seis anos de idade realizada na Região Centro-Oeste, especificamente no estado de Goiás. Foi descrito um índice de positividade global de 35,9% em população composta por crianças apresentando ou não quadro clínico de infecção respiratória. Índice inferior (18,6%) foi relatado no estudo desenvolvido por Castro (2015), o qual, no entanto, avaliou crianças e adolescentes de quatro a 16 anos de idade apresentando ou não doença crônica e com diagnóstico clínico de infecção do trato respiratório.

A literatura mundial apresenta avaliações similares em diferentes grupos populacionais, recebendo destaque crianças entre zero e dois anos de idade com quadro de infecção do trato respiratório. Em estudos mais recentes desenvolvidos em população semelhante à do presente estudo e baseados em técnicas moleculares, foram observados índices variando de 35,3% em Suzhou – China (Wang et al. 2016) até 84% em Washington - Estados Unidos (Martin et al. 2013). O estudo desenvolvido em Washington avaliou crianças com até dois anos e meio de idade, tendo sido coletada mais de uma amostra por criança em intervalos de sete a 10 dias, fatores estes que podem ter influenciado o alto índice observado (Martin et al. 2013).

No Brasil, trabalhos também realizados em população pediátrica com ITR descrevem percentual de detecção que variam de 31,2% no estado do Rio de Janeiro (Albuquerque et al. 2012) a 85,5% em Recife - Pernambuco (Bezerra et al. 2011). Embora o estudo de Bezerra et al. (2011) tenha avaliado população semelhante ao do presente estudo, a investigação laboratorial foi realizada pela técnica de qPCR, cuja sensibilidade é maior quando comparada ao PCR convencional ou multiplex. Além disso, de acordo com os autores, o alto índice de positividade reflete o ambiente no qual as crianças vivem, uma vez que a maioria era proveniente de família com baixo nível socioeconômico e vivendo em habitações precárias e superlotadas (Bezerra et al. 2011).

Neste contexto, ressalta-se que para a interpretação de avaliações considerando agentes virais respiratórios, diferentes aspectos devem ser considerados. Fatores intrínsecos (método de detecção, agentes pesquisados, população de estudo, período e ambiente de coleta), bem como características extrínsecas (região geográfica/climática) influenciam nos achados e podem estar relacionados com certas variações entre os estudos.

Considerando os vírus identificados, observou-se predominância dos rinovírus (31%) e vírus sincicial respiratório (27,4%), seguidos pelos vírus parainfluenza (13,3%), adenovírus (10,7%), influenza (9,7%), bocavírus (5,3%) e coronavírus (2,6%). Os agentes rinovírus e vírus sincicial respiratório têm sido reconhecidos por inúmeros estudos como patógenos prevalentes em população pediátrica. Dentre esses, estudo realizado em Camboja por Guerrier e colaboradores (2013), cuja população foi composta por pacientes de zero a cinco anos apresentando quadro clínico de infecção respiratória, observou predominância do HRV e RSV, identificados em 37% e 34,8% das amostras positivas, respectivamente, seguidos pelos vírus parainfluenza (9,2%) e metapneumovírus (8%). Martinez-Roig et al. (2015), em Barcelona – Espanha, reportaram maior positividade para o RSV-B (36,1%) em crianças e adolescentes de até 15 anos com infecção respiratória aguda. Os rinovírus também foram frequentes (29,6%), bem como RSV-A (28,8%), influenza A (24,1%) e bocavírus (20%) (Martinez-Roig et al. 2015). Em estudo recente realizado no Vietnã, por Tran e colaboradores (2016), houve clara predominância dos HRV (30%) e RSV (23,8%) em amostras positivas provenientes de pacientes hospitalizados, de zero a 14 anos, apresentando ITR, uma vez que os outros agentes identificados apresentaram positividade bem inferior: bocavírus (7,2%), PIV 1 (5,3%), PIV-3 (3,3%) e FLU A (3,2%) (Tran et al. 2016).

No Brasil, achados similares ilustram a importância dos rinovírus e vírus sincicial respiratório para a população pediátrica. Na Região Nordeste do país, Recife-Pernambuco, Bezerra et al. (2011) evidenciaram maior frequência dos RSV, adenovírus e rinovírus, presentes em 43,7%, 29% e 22,1% das amostras positivas, respectivamente. Os vírus HCoV e FLU (A e B) demonstraram baixa positividade, semelhante ao observado no presente estudo. Arruda et al. (2014) também observaram predominância dos RSV (41,9%) e HRV (37,2%) em estudo realizado nas cidades de Curitiba, Porto Alegre e Ribeirão Preto, e em menor escala dos agentes HBoV (24,3%), hMPV (21,4%)

e influenza (17%). O estudo foi conduzido em população pediátrica, de zero a dois anos de idade, hospitalizada, apresentando quadro clínico de ITR (Arruda et al. 2014).

Ademais, de acordo com informações obtidas nos boletins epidemiológicos nacional e estadual referentes ao período do presente estudo, em relação aos casos de infecções por vírus respiratórios no país, houve predomínio dos vírus RSV, HRV e influenza A e B, com picos de detecção de maio a setembro do ano de 2014, posto que RSV e HRV predominaram em indivíduos menores de cinco anos, enquanto influenza foi mais frequente em indivíduos de 20-49 anos (Brasil 2014, Goiás 2014). Considerando o ano de 2015, até o mês de maio, o perfil das infecções respiratórias foi semelhante ao descrito em 2014 (Brasil 2015, Goiás 2015).

Refletindo o descrito no levantamento epidemiológico do Brasil, a positividade para os FLU nesta população foi baixa. Diversos estudos, no mundo e no Brasil, têm relatado essa baixa frequência dos vírus influenza em população composta por crianças mais novas (Khamis et al. 2012, Martin et al. 2013, Giamberardino et al. 2016). No presente estudo, dentre as amostras positivas para o vírus influenza, observou-se maior positividade para o vírus FLU C, diferente do relatado por outras investigações, as quais descrevem maior prevalência dos vírus FLU A e B (Calvo et al. 2013, Smith et al. 2016). No Brasil, ao nosso conhecimento, a investigação do FLU C foi realizada por Nascimento et al. 1991, no Rio de Janeiro, em crianças com até quatro anos de idade com ITR utilizando imunofluorescência, onde o vírus não foi identificado. Em 2000, Motta et al. descreveram, também no Rio de Janeiro, estudo sorológico em adultos hospitalizados com percentual de positividade de 56,7% para anticorpos contra o FLU C.

Ressalta-se assim que poucos trabalhos investigaram a respeito da ocorrência do vírus influenza C, sendo sua epidemiologia pouco descrita. Ademais, os levantamentos epidemiológicos do sistema de vigilância nacional não descrevem a ocorrência desta espécie. Este menor interesse deve estar associado ao fato de que a sua infecção é considerada ser de menor gravidade quando comparada aos outros influenza (Wright et al. 2013), entretanto, estudos descreveram infecções do trato respiratório inferior associadas ao mesmo (Principi et al. 2013, Shimizu et al. 2015). O FLU C é um patógeno que tem sido sugerido como comum da infância, uma vez que uma alta parcela da população adulta possui anticorpos contra o mesmo (Matsuzaki et al. 2014). Não obstante, Akinloye et al. (2011) descreveram maior positividade do FLU C em relação aos vírus A e B em crianças nigerianas apresentando infecção respiratória, tendo

sugerido que o período de coleta, restrito a quatro meses, representaria a estação caracterizada por baixa ocorrência (ou circulação) dos vírus influenza A e B.

Na Região Centro-Oeste, a ocorrência do FLU C foi descrita por Castro (2015), com índice de detecção de 2,4% dentre as amostras que apresentaram positividade para algum vírus respiratório. Neste sentido, em associação ao resultado obtido no presente estudo, revela-se um papel expressivo do FLU C em nossa região e ainda, destaca-se a relevância para a vigilância virológica, da utilização de técnicas moleculares que permitam a investigação de diferentes agentes, bem como informações a respeito da epidemiologia dos mesmos.

Embora seja clara e bem definida a presença dos agentes metapneumovírus e enterovírus em população pediátrica, os mesmos não foram observados em nosso estudo. Esse achado é consoante com o descrito por Castro (2015), que também não identificou a presença do metapneumovírus em seu estudo, e ainda observou baixa frequência dos enterovírus (7% das amostras positivas), demonstrando que fatores associados ao próprio padrão de circulação podem estar associados com a ausência de tais patógenos neste trabalho. Ainda, de acordo com os boletins epidemiológicos nacionais referentes ao período do presente estudo, dentre os vírus identificados em infecções respiratórias, os metapneumovírus foram os agentes com menor frequência. Destaca-se que o hMPV é um agente relativamente novo, descrito inicialmente em 2001 por van den Hoogen e colaboradores, cujas diferentes metodologias de detecção vêm sendo propostas ao longo dos anos, especificamente em relação aos melhores iniciadores utilizados para identificação do agente (van den Hoogen et al. 2001, Mahony et al. 2011).

Em relação à faixa etária, embora sem significância estatística, indivíduos com até 24 meses de idade apresentaram maior percentual de positividade viral (37,4%), seguido pelo grupo de 25-48 meses (33,3%) e 49-72 meses (27,3%). Apesar do número amostral ser menor nos grupos de crianças mais velhas, o resultado encontrado reflete o observado na literatura, onde vários estudos demonstram diferentes prevalências em relação à faixa etária, embora com maior índice de positividade viral em crianças entre zero e dois anos, consideradas as mais afetadas (Khamis et al. 2012, Bicer et al. 2013, Silva et al. 2013).

Quanto à distribuição dos vírus nas diferentes faixas etárias, alguns padrões puderam ser inferidos. Os vírus RSV foram mais frequentes crianças com até 24 meses de idade ($p < 0,05$), similar com o descrito por Calvo et al. (2015), que também

identificaram maior proporção dos casos de RSV em crianças mais novas ($p<0,01$). Ainda, sabe-se que o RSV é reconhecido por ser um patógeno que atinge principalmente crianças mais novas, em especial até os seis meses de idade, dado que vem sendo reforçado por diversos estudos (Khamis et al. 2012, Hall et al. 2013, Nolan et al. 2015). Concomitante aos RSV, os adenovírus e rinovírus predominaram em crianças mais jovens, corroborando estudos em diversos países, inclusive o Brasil (Alonso et al. 2012, Ampuero et al. 2012, Espinola & Russomando. 2012, Gardinassi et al. 2012, Tran et al. 2016). Em contrapartida, os vírus parainfluenza predominaram no grupo composto por crianças de 25 a 48 meses, enquanto os vírus influenza apresentaram maior destaque no grupo composto por crianças mais velhas, de 49 a 72 meses ($p<0,05$), fato consoante com o relatado por diversos autores, que têm descrito maior positividade dos vírus influenza em crianças mais velhas dentro de população pediátrica (Gardinassi et al. 2012, Liu et al. 2015, Wang et al. 2016). Destaca-se ainda a presença dos coronavírus em crianças com idade de 12 a 24 meses ($p<0,05$). Embora o número de amostras positivas para tal vírus seja pequeno, a alta frequência dos HCoV em crianças desta faixa etária têm sido descrita por diversos estudos (Gaunt et al. 2010, Prill et al. 2012).

Considerando os dois grupos avaliados, positividade semelhante foi observada entre crianças sintomáticas (37%) e assintomáticas (34,5%). A detecção de vírus em pacientes pediátricos assintomáticos tem sido descrita por outros estudos, com positivities similares à observada no presente estudo. Thavagnanam e colaboradores (2010) investigaram a presença de vírus respiratórios em pacientes (de um a 14 anos) com ausência de quadro clínico de ITR e identificaram pelo menos um agente viral em 35% da população de estudo. Van der Zalm et al. (2009) e Chonmaitree et al. (2015) descreveram índice de positividade de 40% e 27%, respectivamente, em população pediátrica com ausência de quadro clínico respiratório, também por metodologia molecular, sugerindo a frequente ocorrência de vírus respiratórios nessa população, embora a positividade tenha sido inferior ao descrito para pacientes sintomáticos ($p<0,05$). Ressalta-se que a detecção do genoma viral em amostras respiratórias não se correlaciona necessariamente com a replicação viral, podendo refletir latência ou excreção viral sem a presença de sintomas, uma vez que a replicação do agente no trato respiratório pode preceder o aparecimento de sintomas, bem como se estabelecer de maneira mais prolongada após a resolução dos mesmos.

Dentro do grupo de crianças sintomáticas, maior positividade foi evidenciada em pacientes com até 24 meses de idade ($p<0,05$), e em amostras coletadas

durante o período de seca ($p < 0,05$). Os achados estão em concordância com o descrito por outros estudos em população pediátrica sintomática (Cui et al. 2015, Lui et al. 2015, Simiri et al. 2015). Já no grupo de indivíduos assintomáticos nenhuma diferença estatisticamente significativa foi identificada, embora maior percentual de positividade tenha sido observado nas faixas etárias compostas por crianças entre 25 e 48 meses e aquelas do sexo masculino.

A distribuição dos vírus identificados nos dois grupos resultou em perfis distintos, onde o grupo sintomático apresentou maior variedade no número de patógenos. Neste sentido, alguns agentes como parainfluenza 1 e 2 e influenza A e B foram encontrados somente neste grupo, embora os coronavírus tenham sido exclusivamente detectados em pacientes assintomáticos. Os patógenos bocavírus e FLU-C apresentaram maior positividade no grupo sintomático, enquanto adenovírus e RSV-A no grupo assintomático.

A maior variedade de agentes em pacientes sintomáticos em comparação a indivíduos assintomáticos têm sido relatada por outros autores (Van der Zalm et al. 2009, Jansen et al. 2011, Self et al. 2015). Chonmaitree et al. (2015), em estudo com crianças no primeiro ano de vida apresentando ou não ITR, evidenciaram rinovírus como agente prevalente em ambos os grupos, os coronavírus e PIV-3 tiveram destaque no grupo assintomático, RSV, FLU e adenovírus foram predominantes no grupo sintomático e bocavírus com prevalência igual nos dois grupos. Embora a detecção do agente isoladamente não signifique que o mesmo seja o responsável pelo quadro clínico presente, e assim, pela infecção, diversos autores têm demonstrado que agentes como RSV e influenza estão associados mais frequentemente com indivíduos sintomáticos ($p < 0,05$), sugerindo que estes possam ter maior potencial patogênico que outros agentes (Jansen et al. 2011, Self et al. 2015). Entretanto, inferências a este respeito para os diferentes agentes virais respiratórios são restritas, existindo a necessidade de avaliações adicionais para melhor compreensão.

A circulação dos vírus respiratórios apresenta diferentes padrões de acordo com a região geográfica. No geral, em países de clima temperado, as infecções por vírus respiratórios seguem padrões claros de sazonalidade, sendo mais frequentes no inverno, associadas à baixa temperatura e menor umidade relativa do ar (Bloom-Feshbach et al. 2013, Sirimi et al. 2015). As mesmas características são observadas para regiões de clima subtropical (Chen et al. 2014). Para locais de clima tropical, tem sido observada a influência de uma combinação de fatores na ocorrência das ITRs virais, como

incidência de chuvas, temperatura e umidade, que vão se associar positiva ou negativamente em relação à ocorrência dos patógenos (Murray et al. 2012, Tang & Loh 2014). Acredita-se que a combinação de fatores imunes e comportamentais do hospedeiro, somado a questões epidemiológicas, aspectos meteorológicos e características estruturais e genéticas do patógeno expliquem tais variações nos padrões de circulação (Pica & Bouvier 2012, Paynter et al. 2014).

O Brasil é um país de grandes dimensões, fato que somado com sua disposição geográfica, confere uma grande diversidade de subtipos climáticos às suas regiões. A cidade de Goiânia, localizada no centro do estado de Goiás, possui clima predominante tropical com duas estações bem definidas: uma estação seca, de maio a setembro, e uma estação chuvosa, de outubro a abril. Por estar em uma região de alta altitude, o ar é relativamente seco na maior parte do ano, principalmente entre julho a setembro, os meses em que são registrados menores índices de umidade relativa do ar. As temperaturas mais baixas são registradas nos meses de junho a setembro, enquanto as mais altas entre os meses de setembro a dezembro. Entre os meses de maio de 2014 a maio de 2015 foram registradas temperatura média de 25°C, sendo a mínima 16°C e máxima registrada 35°C. No mesmo período a precipitação média foi de 117,7 mm e umidade relativa do ar 59,2 % (IBGE 2016, INMET 2016).

Considerando o cenário geral, na presente avaliação maior positividade foi observada durante o período de seca (maio a setembro), com menor precipitação pluviométrica, baixa umidade relativa do ar e menores temperaturas registradas. No estudo de Castro (2015), também realizado na cidade de Goiânia, o percentual de positividade global foi maior nos meses chuvosos, positivamente associado com a alta umidade relativa do ar e temperaturas mais quentes. É de relevância destacar um fator diferencial importante, uma vez que maior parte da população avaliada correspondia a crianças maiores de 6 anos e com doença respiratória crônica, aspecto que pode influenciar nas diferenças entre os resultados obtidos.

Como referido, embora em regiões de clima temperado o perfil sazonal das infecções virais do trato respiratório seja bem definido, em regiões de clima tropical, principalmente em climas úmidos, esse perfil ainda é controverso. Em Bangladesh, Murray et al. (2012) demonstraram associação positiva entre precipitação pluviométrica e ocorrência de ITRs virais (*odds* = 2.97, intervalo de confiança = 1.87-4.70). Em contrapartida, Haynes et al. (2013) avaliaram a ocorrência de ITRs em diversos países com clima tropical ou seco e observaram em grande parte das regiões associações

negativas entre positividade viral e precipitação pluviométrica. No Brasil, um estudo em Fortaleza-Ceará, nordeste do país, documentou uma associação positiva entre índice de chuvas e positividade viral (Alonso et al. 2012). Associação similar foi reportada em Salvador por Nascimento-Carvalho et al 2010. No entanto, em São Paulo, o índice de positividade viral foi associado com o período de menor precipitação pluviométrica e temperaturas mais frias (Paiva et al. 2012).

Para alguns vírus em particular, pôde ser identificado um perfil temporal. A ocorrência dos vírus influenza, rinovírus e RSV predominou no período de estiagem e frio, durante os meses de maio a agosto, diferente do observado para os vírus parainfluenza e adenovírus, identificados principalmente durante os meses chuvosos e quentes. Os bocavírus foram detectados ao longo dos meses de estudo.

No estudo de Castro (2015), o RSV apresentou pico de detecção também durante a estação de maior precipitação pluviométrica, bem como os vírus influenza, embora estes tenham apresentado maior pico logo após a temporada chuvosa cuja temperatura mínima média encontrava-se em declínio. Os rinovírus apresentaram detecção ao longo dos meses de estudo (Castro 2015). Alonso et al. (2012), em Fortaleza, observaram padrão de circulação somente para os vírus influenza e RSV, ambos mais frequentes na estação chuvosa, embora coincidente com período de baixas temperaturas. Em contrapartida, no estado de São Paulo, Paiva et al. (2012) identificaram relação negativa entre precipitação pluviométrica e positividade para o vírus sincicial respiratório, a mesma associação foi vista para a temperatura e umidade, quanto mais baixas maior a ocorrência do patógeno ($p<0,05$).

Na literatura existem controvérsias em relação à precipitação pluviométrica e sazonalidade do vírus sincicial respiratório em regiões de clima tropical, embora a maioria dos estudos tenha observado uma associação positiva com a ocorrência de chuvas. Agrawal et al. (2009), em estudo realizado com pacientes de zero a cinco anos na Índia, reportaram relação inversa entre RSV e temperatura ($p<0,01$) e precipitação pluviométrica ($p<0,05$). Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado que o RSV possui um padrão sazonal irregular, que pode variar anual ou bienalmente, nem sempre associado com o período chuvoso em uma mesma região (Weber et al. 1998, van der Sande et al. 2004).

Em relação aos vírus influenza, mesmo em climas tropicais a circulação dos mesmos é mais frequente em estações frias (Moura 2010). Ensaios laboratoriais *in vitro* e em modelos animais têm sugerido uma relação inversa entre a temperatura e umidade

relativa do ar (UR) e a manutenção da viabilidade de partículas virais dos vírus influenza. Essas inferências basearam-se na alta estabilidade dos vírions em situação de baixas temperatura e UR, e moderada em alta UR, sendo ainda inexistente em altas temperaturas, independente da umidade (Lowen et al. 2007). Estudo realizado no Brasil, em Salvador, relatou a ocorrência de infecções pelo vírus influenza associado a temperaturas mais baixas, o que também foi demonstrado na Região Sul (Freitas et al. 2013, Silva et al. 2014)

De forma geral, nenhum perfil de detecção específico tem sido observado para os rinovírus, uma vez que eles têm sido detectados ao longo do período de estudo, embora picos de ocorrência sejam documentados nos meses de inverno (Gardinassi et al. 2012). Anders et al. (2015), em estudo realizado em crianças vietnamitas recém-nascidas acompanhadas até o primeiro ano de idade, demonstraram que as infecções por HRV foram identificadas durante o ano todo. Estudos que relacionam a sazonalidade dos vírus respiratórios abordam principalmente influenza e/ou vírus sincicial respiratório, sendo difícil associações em relação a agentes como adenovírus e parainfluenza, embora algumas inferências sejam feitas. Nascimento-Carvalho et al. (2013), em estudo realizado em Salvador, identificaram correlação positiva entre a frequência dos parainfluenza e adenovírus com a ocorrência de chuvas ($p = 0,02$), semelhante ao observado no presente estudo.

Considerando as codetecções observadas, 16 (6,4%) amostras foram positivas para mais de um vírus respiratório, sendo predominantes em crianças do grupo sintomático ($p < 0,05$). Quanto aos agentes mais observados, os rinovírus ou RSV foram identificados em 15 casos, sendo quatro associações envolvendo ambos. Embora sem significância estatística, 93,7% dos casos observados foram em crianças de 0-24 meses. Guerrier et al. (2013) também observaram índice de codetecção de 6%, com destaque para as associações envolvendo RSV ou rinovírus. O achado no presente estudo foi consoante com o descrito por Jansen et al. (2011), em estudo realizado na Holanda, onde avaliaram a presença de vírus respiratórios em crianças de zero a seis anos de idade apresentando ou não quadro clínico de infecção respiratória e observaram codetecções em 10,7% das amostras, sendo a maior parte em pacientes com sintomas respiratórios e também em crianças com até dois anos de idade. Ainda, os vírus HAdV, HRV, RSV e HBoV foram comumente identificados em associação entre si ou com outros patógenos (Jansen et al. 2011). Advani et al. (2012), em estudo com crianças de zero a três anos sintomáticas ou assintomáticas para quadro clínico de ITR, também

descreveram maior percentual de codeteção em pacientes sintomáticos, reforçando o encontrado por nosso trabalho.

O estudo apresentou algumas limitações que prejudicaram as análises e associações dos resultados da triagem molecular com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Primeiro, da dificuldade em relação ao acesso dos prontuários das crianças ou falta de documentação que fornecesse informações, impedindo a coleta de dados como duração dos sintomas, dias de internação, vacinação e administração de antibióticos. Também, a diferença do número amostral entre as faixas etárias, comprometendo as análises comparativas. Por fim, intercorrências em relação à realização das análises estatísticas, além da duração de apenas um ano do estudo, dificultaram inferências maiores quanto a aspectos associados à sazonalidade dos agentes.

Como perspectivas, investigações adicionais são previstas, com o objetivo de elucidar aspectos associados ao papel destes agentes nessa população de estudo. Dentre estas, é proposta uma avaliação adicional para os metapneumovírus humano, com a possibilidade do estabelecimento de um novo protocolo de análise e a caracterização molecular e subtipagem dos rinovírus identificados. Ainda, considerando a escassez de dados na literatura que discutam aspectos associados à epidemiologia e importância clínica do vírus influenza C, as amostras positivas serão sequenciadas para o desenvolvimento de uma análise filodinâmica.

Não obstante, os dados obtidos no presente estudo agregam conhecimento no contexto das infecções respiratórias virais, ressaltando a importância destas na população pediátrica e auxiliando na compreensão dos fatores epidemiológicos e temporais associados aos diferentes patógenos em nossa região.

A circulação de diferentes vírus respiratórios ao longo do ano e em períodos concomitantes torna complexa a elucidação do papel destes agentes. Além disso, o padrão de atividade parece se alterar em diferentes grupos etários ou entre pacientes apresentando diferentes condições clínicas ou fatores associados. Portanto, a utilização de ensaios multiplex torna-se determinante na investigação destes agentes, possibilitando o diagnóstico etiológico mais rápido e preciso. Desta forma, a melhora na assistência clínica apresenta-se como um benefício direto, com intervenções terapêuticas apropriadas, reduzindo internações, uso desnecessário de antibióticos e, desta forma, os custos do tratamento. Ademais, a sua aplicação epidemiológica constitui ferramenta essencial, exercendo função na avaliação de diferentes aspectos da vigilância

virológica fornecendo assim, conhecimentos na elaboração e direcionamento de medidas de controle e prevenção dos quadros de ITR.

7 CONCLUSÕES

- Foi observado um índice de positividade global de 35,9% na população de estudo. Os rinovírus foram identificados com maior frequência (31%), seguidos por RSV (27,4%), PIV (13,3%), adenovírus (10,7%), influenza (9,7%), bocavírus (5,3%) e HCoV (2,6%);
- Os grupos sintomático e assintomático registraram índices semelhantes de positividade. Os vírus FLU A e B, PIV-1 e 2 foram identificados exclusivamente no grupo sintomático, enquanto os coronavírus foram evidenciados somente nos assintomáticos;
- Maior positividade foi observada em indivíduos de zero a 24 meses de idade, embora sem significância estatística. Os coronavírus apresentaram predominância em crianças de 12-24 meses ($p < 0,05$), RSV e adenovírus tiveram destaque em crianças com até 24 meses de idade, enquanto os parainfluenza predominaram no grupo de crianças com 25-48 meses. Os vírus influenza se destacaram em crianças de 49 a 72 meses de idade ($p < 0,05$);
- Os maiores índices de positividade viral foram obtidos durante a estação seca da região, período de menor precipitação pluviométrica e temperaturas mais frias. Os RSV, rinovírus e FLU foram detectados predominantemente nos meses de menor precipitação e temperaturas enquanto os PIV, HCoV e adenovírus foram detectados principalmente nos meses da estação seca. Os bocavírus não apresentaram padrão claro de circulação;
- Co-deteccões foram identificadas em 16 amostras (6,4%) e ocorreram principalmente no grupo de crianças sintomáticas ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Advani S, Sengupta A, Forman M, Valsamakis A, Milstone A. Detecting respiratory viruses in asymptomatic children. *Pediatr Infect Dis J* 31: 1221-1226, 2012.
- Agrawal AS, Sarkar M, Chakrabarti S, Rajendran K, Kaur H, Mishra AC, Chatterjee MK, Naik TN, Chadha MS, Chawla-Sarkar M. Comparative evaluation of real-time PCR and conventional RT-PCR during a 2 year surveillance for influenza and respiratory syncytial virus among children with acute respiratory infections in Kolkata, India, reveals a distinct seasonality of infection. *J Med Microbiol* 58: 1616-1622, 2009.
- Alonso WJ, Laranjeira BJ, Pereira SAR, Florencio CMGD, Moreno EC, Miller MA, Giglio R, Schuck-Paim Cynthia, Moura FEA. Comparative Dynamics, morbidity and mortality burden of pediatric viral respiratory infections in an Equatorial city. *Pediatr Infect Dis J* 31: 9-14, 2012.
- Akinloye OM, Ronkko E, Savolainen-Kopra C, Ziegler T, Iwalokun BA, Deji-Agboola MA, Oluwadun A, Roivainen M, Adu FD, Hovi T. Specific viruses detected in nigerian children in association with acute respiratory disease. *J Trop Med*, 2011.
- Albuquerque MCM, Varella RB, Santos N. Acute respiratory viral infections in children in Rio de Janeiro and Teresopolis, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 54: 249-255, 2012.
- Allander T, Tammi MT, Eiksson M, Bjekner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *PNAS* 102: 12891-12896, 2005.
- Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HGM, Lehtinen P, Osterback R, Vuorinen T, Waris M, Bjekner A, Tiveljung-Lindell A, van den Hoogen BG, Hyypia T, Ruuskanen O. Human Bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 44: 904-910, 2007.
- Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol* 37: 149 – 157, 1992.
- Almeida MB, Zerbinati RM, Tateno AF, Oliveira CM, Romão RM, Rodrigues JC, Pannuti CS, Silva LVF. Rhinovirus C and respiratory exacerbations in children with cystic fibrosis. *Emerg Infect Dis* 16: 996-999, 2010.
- Alsaleh AN, Whiley DM, Bialasiewicz S, Lambert SB, Ware RS, Nissen MD, Sloots TP, Grimwood K. Nasal swab samples and real-time polymerase chain reaction assays in community-based, longitudinal studies of respiratory viruses: the importance of sample integrity and quality control. *BMC Infect Dis* 14, 2014.
- Al-Tawfiq JA. Middle East Respiratory Syndrome-coronavirus infection: a overview. *J Infect Public health* 6: 319-322, 2013.
- Ampuero JS, Ocana V, Gómez J, Gamero ME, Garcia J, Halsey ES, Laguna-Torres VA. Adenovirus respiratory tract infections in Peru. *PLOS One* 7: 1-14, 2012.
- Anders KL, Nguyen HL, Nguyen NM, Thuy NTV, Van NTH, Hieu NT, Tham NTH, Ha PTT, Lien LB, Chau NVV, Hang VTT, van Doorn HR, Simmons CP. Epidemiology and Virology of Acute Respiratory Infections during the First Year of Life: a birth cohort study in Vietnam. *Pediatr Infect Dis J* 34: 361 – 370, 2015.

- Anderson TP, Werno AM, Barratt K, Mahagamasekera P, Murdoch DR, Jennings LC. Comparison of four multiplex PCR assays for the detection of viral pathogens in respiratory specimens. *J Virol Meth* 191: 118-121, 2013.
- Arakawa M, Okamoto-Nakagawa R, Toda S, Tsukagoshi H, Kobayashi M, Ryo A, Mizuta K, Hasegawa S, Hirano R, Wakiguchi H, Kudo K, Tanaka R, Morita Y, Noda M, Kozawa K, Ichiyama T, Shirabe K, Kimura H. Molecular epidemiological study of human rhinovirus species A, B and C from patients with acute respiratory illnesses in Japan. *J Med Microbiol* 61: 410– 419, 2012.
- Arens MQ, Buller RS, Rankin A, Mason S, Whetsell A, Agapov E, Lee W, Storch GA. Comparison of the Eragen Multi-code respiratory virus panel with conventional viral testing and real-time multiplex PCR assays for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 48: 2387-2395, 2010.
- Arnberg N, Edlund K, Kidd AH, Wadell G. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J of Virology* 74: 42-48, 2000.
- Arruda E, Jones MH, Paula FE, Chong D, Bugarin G, Notario G, Mtsuno AK, Pitrez PM, Vo P, Suzuki C, Rosario Filho N, Stein RT. The burden of single virus and viral coinfections on severe lower respiratory tract infections among preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 33: 997-1003, 2014.
- Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *Plos Path* 5: 1-11, 2009.
- Auksornkitti V, Kamprasert N, Thongkomplew S, Suwannakarn K, Theamboonlers A, Samransamruajkij R, Poovorawan Y. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus, 2010-2011: identification of genotype ON1 and a new subgroup B genotype in Thailand. *Arch Virol* 159: 499-507, 2014.
- Avellón A, Perez P, Aguillar JC, Lejarazu RO, Echevarria JE. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic poplymerase chain reaction. *J Virol Meth* 92: 113-120, 2001.
- Barker J, Stevens D, Bloomfield SF. Spread and prevention of some common viral infections in community facilities and domestic homes. *J Appl Microbiol* 91: 7-21, 2001.
- Beaucourt S, Vignuzzi M. Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance. *Curr Opin Virol* 8: 10-15, 2014.
- Beck ET, He J, Nelson MI, Bose ME, Fan J, Kumar S, Henrickson KJ. Genome sequencing and phylogenetic analysis of 39 human parainfluenza virus type 1 strains isolated from 1997-2010. *PLOS One* 7: 1-14, 2012.
- Becker WB, McIntosh K, Dess JH, Chanock RM. Morphogenesis of avian infectious bronchitis virus and a related human virus (strain 229E). *J Virol* 1: 1019-1027, 1967.
- Benites CECA, Cabrini DP, Silva ACB, Silva JC, Catalan DT, Berezin EN, Cardoso MRA, Passos SD. Acute respiratory viral infections in pediatric câncer patients undergoing chemotherapy. *J Pediatr* 157: 1-7, 2014.

- Bezerra PGM, Britto MCA, Correia JB, Duarte MCMB, Fonceca AM, Rose K, Hopkins MJ, Cuevas LE, McNamara PS. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLOS One* 6: 1-9, 2011.
- Bicer S, Giray T, Çol D, Erdag GC, Vitrinel A, Gurol Y, Çelik G, Kaspar Ç, Kuçuk O. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Ital J Pediatr* 39: 1-10, 2013.
- Blaschke AJ, Allison MA, Meyers L, Rogatcheva M, Heyrend C, Mallin B, Carter M, LaFleur B, Barney T, Poritz MA, Daly JA, Byington CL. Non-invasive sample collection for respiratory virus testing by multiplex PCR. *J Clin Virol* 52: 210-214, 2011.
- Bloom-Feshbach K, Alonso WJ, Charu V, Tamerius J, Simonsen L, Miller MA, Viboud C. Latitudinal variations in seasonal activity of influenza and respiratory syncytial virus (RSV): A global comparative review. *PLOS One* 8: 1-12, 2013.
- Bochkov YE, Gern JE. Clinical and molecular features of human rhinoviruses C. *Microbes Infect* 14: 485-494, 2012.
- Bochkov YA, Watters K, Ashraf S, Griggs TF, Devries MK, Jackson DJ, Palmenberg AC, Gern JE. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *PNAS* 112: 5485 – 5490, 2015.
- Boone SA, Gerba CP. Significance of fomites in the spread of respiratory and enterical viral disease. *Appl Environ Microbiol* 73: 1687-1696, 2007.
- Bossios AS, Psarras D, Gourgiotis C, Skevaki CL, Constantopoulos AG, Saxoni-Papageorgiou P, Papadopoulos NG. Rhinovirus infection induces cytotoxicity and delays wound healing in bronchial epithelial cells. *Resp Res* 6: 114, 2005.
- Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RWH, Baudin F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* 124:12-21, 2007.
- Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26: 49-53, 2008.
- Branche AR, Walsh EE, Formica MA, Falsey AR. Detection of respiratory viruses in sputum from adults by use of automated multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 52: 3590-3596, 2014.
- Brasil, Ministério da Saúde. Protocolo de tratamento de influenza. Brasília, 2013.
- Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 18 de 2014. Brasília, 2014a.
- Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 53 de 2014. Brasília, 2014b.
- Brasil, Ministério da Saúde. Informe Técnico. Campanha Nacional de Vacinação contra o Influenza. Brasília, 2015a.
- Brasil, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Influenza: Monitoramento até a semana epidemiológica 21 de 2015. Brasília, 2015b.
- Brasil, Ministério da Saúde. Hospital Materno Infantil – HMI. 2016. Disponível em: <http://www.saude.go.gov.br/page/94/hospital-materno-infantil-hmi>. Acesso em março de 2016.

Brassard DL, Leser GP, Lamb RA. Influenza B virus NB glycoprotein is a component of the virion. *Virology* 220: 350-360, 1996.

Broor S, Bharaj P, Chahar HS. Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen. *J Biosc* 33: 483-493, 2008.

Bruning AHL, van Dijk K, van Eijk HWM, Koen G, van Woensel JBM, Kruisinga FH, Dasja Pajkrt D, Wolthers KC. Evaluation of a rapid antigen detection point-of-care test for respiratory syncytial virus and influenza in a pediatric hospitalized population in the Netherlands. *Diagn Microbiol Infect Dis* 80: 292-293, 2014.

Butt SA, Maceira VP, McCallen ME, Stellrecht KA. Comparison of three commercial RT-PCR systems for the detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 61: 406-410, 2014.

Cabeça TK, Granato C, Bellei N. Epidemiological and clinical features of human coronavirus infections among different subsets of patients. *Influenza Other Respir Viruses* 7: 1040-1047, 2013.

Caccia ERB, Watanabe ASA, Carraro E, Leal E, Granato C, Bellei N. Frequency of human bocavirus respiratory infections among at-risk patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 54: 307-10, 2012.

Calvo C, García-García ML, Borrell B, Pozo F, Casas I. Prospective study of influenza C in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 32:916-919, 2013.

Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine* 25: 6852-6862, 2007.

Carvalho LM, Paula FE, Silvestre RVD, Roberti LR, Arruda E, Mello WA, Ferriani VPL. Prospective surveillance study of acute respiratory infections, influenza-like illness and seasonal influenza vaccine in a cohort of juvenile idiopathic arthritis patients. *Pediatr Rheumat* 11: 1-10, 2013.

Castro IA. Investigação molecular de vírus em crianças com infecção do trato respiratório e crianças asmáticas em Goiânia-Goiás. 74p. Dissertação – Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

Chang A, Masante C, Buchholz UJ, Dutch RE. Human metapneumovirus (hMPV) binding and infection are mediated by interactions between the hMPV fusion protein and heparan sulfate. *J Virol* 86: 3230-3243, 2012.

Chang L. Enterovirus 71 in Taiwan. *Pediatr Neo* 49: 103-112, 2008.

Chanock RM. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J Exper Med* 104: 555-576, 1956.

Chen AY, Cheng F, Lou S, Liu Z, Delwart E, Pintel D, Qiu J. Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. *Virology* 403: 145-154, 2010.

Chen Z, Zhu Y, Wang Y, Zhou W, Yan Y, Zhu C, Zhang C, Sun H, Ji W. Association of meteorological factors with childhood viral acute respiratory infections in subtropical China: a analysis over 11 years. *Arch Virol* 159: 631-639, 2014.

Chen W, Arnold JC, Fairchok MP, Danaher PJ, McDonough EA, Blair PJ, Garcia J, Halsey ES, Schofield C, Ottolini M, Mor D, Ridore M, Burgess TH, Millar EV. Epidemiologic, clinical,

and virologic characteristics of human rhinovirus infection among otherwise healthy children and adults Rhinovirus among adults and children. *J Clin Virol* 64: 74-82, 2015.

Cheng H, Huang Y, Yen T, Hsia S, Hsieh Y, Li C, Chang L, Huang L. The correlation between the presence of viremia and clinical severity in patients with enterovirus 71 infection: a multi-center cohort study. *BMC Infect Dis* 14: 1-8, 2014.

Chieochansin T, Kapoor A, Delwart E, Poovorawan Y, Simmonds P. Absence of detectable replication of human bocavirus species 2 in respiratory tract. *Emerg Infect Dis* 15: 1503-1505, 2009.

Chiu C, Shi Y, Yang J, Hsiao Y, Tzang B, Hsu T. Effects of Human Parvovirus B19 and Bocavirus VP1 Unique Region on Tight Junction of Human Airway Epithelial A549 Cells. *Plos One* 9: 1-6, 2014.

Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, Clos A, Patel JA, Nair S, Fan J, Henrickson KJ. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clin Infect Dis* 46: 815-823, 2008.

Chonmaitree T, Alvarez-Fernandez P, Jennings K, Trujillo R, Marom T, Loeffelholz MJ, Miller AL, McCormick DP, Patel JA, Pyles RB. Symptomatic and asymptomatic respiratory viral infections in the first year of life: Association with acute otitis media development. *Clin Infect Dis* 60: 1-9, 2015.

Christensen A, Norbdo SA, Krokstad S, Rognlien AGW, Dollner H. Human bocavirus in children: Mono-detection, high viral load and viraemia are associated with respiratory tract infection. *J Clin Virol* 49: 158-162, 2010.

Clercq E. Chemotherapy of respiratory syncytial virus infections: the final breakthrough. *Inter J Antimicrobial Agents* 45: 234-237, 2015.

Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription Nested-PCR assay. *J Med Virol* 69: 132-144, 2003.

Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription Nested-PCR assays. *J Med Virol* 72: 484-495, 2004.

Coleman CM, Frieman MB. Coronaviruses: Important Emerging Human Pathogens. *J Virol* 88: 5209-5212, 2014.

Collins PL, Olmsted RA, Johnson PR. The small hidrophobic protein of human respiratory syncytial virus: comparison between antigenic subgroups A and B. *J Gen Virol* 71: 1571- 1576, 1990.

Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol* 82: 2040-2055, 2008.

Collins PL, Karron RA. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Compans RW, Content J, Duesberg PH. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* 10: 795-800, 1972.

Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205: 17-23, 1994.

Cotten M, Watson SJ, Zumla AI, Makhdoom HQ, Palser AL, Ong SH, Al Rabeeah AA, Alhakeem RF, Assiri A, Al-Tawfiq JA, Albarrak A, Barry M, Shibl A, Alrabiah FA, Hajjar S, Balkhy HH, Flemman H, Rambaut A, Kellam P, Memish ZA. Spread, circulation, and evolution of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *mBio* 5: 1-11, 2014.

Cui B, Zhang D, Pan H, Zhang F, Farrar J, Law F, van Doorn HR, Wu B, Ba-Thein W. Viral aetiology of acute respiratory infections among children and associated meteorological factors in southern China. *BMC Infect Dis* 15: 124-136, 2015.

Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 84: 2895-2908, 2003.

DeByle C, Bulkow L, Miernyk K, Chikoyak L, Hummel KB, Hennessy T, Singleton R. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and nasopharyngeal wash collection methods for respiratory virus detection in hospitalized children using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 185: 89-93, 2012.

Del Fiol FS, Lopes LC, Toledo MI, Barberato-Filho S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 68-72, 2010.

Deng Y, Gu X, Zhao X, Luo J, Luo Z, Wang L, Fu Z, Yang X, Liu E. High viral load of Human Bocavirus correlates with duration of wheezing in children with severe lower respiratory tract infection. *Plos One* 7: 1-7, 2012.

Deng Z, Hao Y, Yao L, Xie Z, Gao H, Xie L, Zhong L, Zhang B, Cao Y, Duan Z. Immunogenicity of recombinant human bocavirus-1,2 VP2 gene virus-like particles in mice. *Immunology* 142: 58-66, 2013.

Desselberger U, Racaniello VR, Zazra JJ, Palese P. The 3' and 5'- terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* 8: 315-328, 1980.

Dickens LE, Collins PL, Wertz GW. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 52: 364-369, 1984.

Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J Virol* 83: 7739-7748, 2009.

Dimopoulos G, Lerikou M, Tsiodras S, Chranioti A, Perros E, Anagnostopoulou U, Armaganidis A, Karakitsos P. Viral epidemiology of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther* 25: 12-18, 2012.

Doan Q, Enarson P, Kisson N, Klassen TP, Johnson DW. Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the Emergency Department. *Cochrane Database Syst Rev* 5, 2012.

Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt H, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RAM, Berger A, Burguiere A, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra J, Muller S, Rickerts V, Stummer M, Vieth S, Klenk H, Osterhaus ADME, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348: 1967-1976, 2003.

du Prel J, Puppe W, Grondahl B, Knuf M, Weigl JAI, Schaaff F, Schmitt H. Are Meteorological Parameters Associated with Acute Respiratory Tract Infections?. *Clin Infect Dis* 49: 861-868, 2009.

Duvvuri VR, Granados A, Rosenfeld P, Bahl J, Eshaghi A, Gubbay JB. Genetic diversity and evolutionary insights of respiratory syncytial virus A ON1 genotype: global and local transmission dynamics. *Nature* 5: 1-12, 2015.

Ebner K, Pinsker W, Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic and clinical implications. *J Virol* 79: 12635-12642, 2005.

Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, Staat MA, Iwane M, Prill MM, Williams JV. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *N Engl J Med* 368: 633-643, 2013.

Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, Low DE, Gubbay JB. Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLOS One* 7: 1-10, 2012.

Espinola EE, Russomando G. Genetic diversity of human adenovirus in hospitalized children with severe acute lower respiratory infections in Paraguay. *J Clin Virol* 53: 367-369, 2012.

Faden H. Comparison of midturbinate flocked-swab specimens with nasopharyngeal aspirates for detection of respiratory viruses in children by the direct fluorescent antibody technique. *J Clin Microbiol* 48: 3742-3743, 2010.

Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infection in young and elderly adults. *J Infect Dis* 187: 785-790, 2003.

Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. Yield of Sputum for Viral Detection by Reverse Transcriptase PCR in Adults Hospitalized with Respiratory Illness. *J Clin Microbiol* 12: 21-24, 2012.

Falsey AR, McElhaney JE, Beran J, van Essen GA, Duval X, Esen M, Galtier F, Gervais P, Hwang S, Kremsner P, Launay O, Leroux-Roels G, McNeil SA, Nowakowski A, Richardus JH, Ruiz-Palacios G, Rose SS, Devaster J, Oostvogels L, Durviaux S, Taylor S. Respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in older adults with moderate to severe influenza-like illness. *J Infect Dis* 209: 1873-1881, 2014.

Farsani SMJ, Munnink BBO, Canuti M, Deijs M, Cotten M, Jebbink MF, Verhoeven J, Kellam P, Loens K, Goossens H, Ieven M, van der Hoek L. Identification of a novel human rhinovirus C type by antibody capture VIDISCA-454. *Viruses* 7: 239-251, 2015.

Feldman SA, Audet S, Beeler JA. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J Virol* 74: 6442-6447, 2000.

Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol* 53: 97-105, 2012.

Francis T. A new type of virus from epidemic influenza. *Science* 92:405-408, 1940.

Freytmuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the

diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with na acute respiratory illness. *J Med Virol* 78: 1498-1504, 2006.

Freitas FTM. Sentinel surveillance of Influenza Other Respir Viruses, Brazil, 2000-2010. *Braz J Infect Dis* 17: 62-68, 2013

Frobert E, Escuret V, Javouhey E, Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Moulinier C, Gillet Y, Lina B, Floret D, Morfin F. Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: evaluating the CLART® Pneumovir DNA array. *J Med Virol* 83: 150-155, 2011.

Frost HM, Robinson CC, Dominguez SR. Epidemiology and clinical presentation of parainfluenza type 4 in children: A 3-year comparative study to parainfluenza types 1-3. *J Infect Dis* 209: 695-702, 2014.

Fuchs R, Blaas D. Uncoating of human rhinoviruses. *Rev Med Virol* 20: 281-297, 2010.

Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S. Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle. *J Virol* 85: 1322-1329, 2011.

Garcia J, Espejo V, Nelson M, Sovero M, Villaran MV, Gomez J, Barrantes M, Sanchez F, Comach G, Arango AE, Aguayo N, Rivera IL, Chicaiza W, Jimenez M, Aleman W, Rodriguez F, Gonzales MS, Kochel TJ, Halsey ES. Human rhinoviruses and enteroviruses in influenza-like illness in Latin America. *Virology J* 10: 1-12, 2013.

Gardinassi LG, Simas PVM, Salomão JB, Durigon EL, Trevisan DMZ, Cordeiro JA, Lacerda MN, Rahal P, Souza FP. Seasonality of viral respiratory infections in southeast of Brazil: the influence of temperature and air humidity. *Braz J Microbiol* 43: 98-108, 2012.

Gaunt ER, Hardie A, Claas ECJ, Simmonds P, Templeton KE. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J Clin Microbiol* 48: 2940-2947, 2010.

Geng HY, Tan WJ. A novel human coronavirus: Middle East respiratory syndrome human coronavirus. *Sci China Life Sci* 56: 683-687, 2013.

Gern JE. Rhinovirus respiratory infections and asthma. *Am J Med* 112: 19-27, 2002.

Gern JE. The ABCs of rhinoviruses, wheezing and asthma. *J Virol* 84: 7418-7426, 2010.

Ghebremedhin B. Human Adenovirus: Viral Pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immun* 4: 26-33, 2014.

Giamberardino HIG, Homsani S, Bricks LF, Pacheco APO, Guedes M, Debur MC, Raboni SM. Clinical and epidemiological features of respiratory virus infections in preschool children over two consecutive influenza seasons in southern Brazil. *J Med Virol* , 2016.

Gilani Z, Kwong YD, Levine OS, Deloria-Knoll M, Scott JAG, O'Brien KL, Feikin DR. A literature review and survey of childhood pneumonia etiology studies: 2000–2010. *Clin Infect Dis* 54: 102-108, 2012.

Girard MP, Tam JS, Assossou OM, Kieny MP. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* 28: 4895-4902, 2010.

Glezen WP, Frank AL, Taber LH, Kasel JA. Parainfluenza virus type 3: Seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *J Infect Dis* 150: 851-857, 1984.

Goiás, SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Mensal da Síndrome Respiratória Aguda Grave – Goiás 2014. Goiânia, 2014.

Goiás, SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Mensal da Síndrome Respiratória Aguda Grave – Goiás 2015. Goiânia, 2015.

Goka EA, Vallely PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Single and multiple respiratory virus infections and severity of respiratory disease: A systematic review. *Paediatr Respir Rev* 15: 363-370, 2013.

Goldmann DA. Transmission of viral respiratory infections in the home. *Pediatr Infect Dis J* 19: 97-102, 2000.

Gotoh B, Takeuchi K, Komatsu T, Yokoo J. The STAT2 activation process is a crucial target of Sendai virus C protein for the blockade of alpha interferon signaling. *J Virol* 77: 3360-3370, 2003.

Gould D, Drey N. Preventing the spread of acute respiratory viral infections. *Nurs Stand* 24: 44-9, 2009.

Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, Fouchier RAM, Galiano M, Gorbalenya AE, Memish ZA, Perlman S, Poon LLM, Snijder EJ, Stephens GM, Woo PCY, Zaki AM, Zambon M, Ziebuhr J. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the coronavirus study group. *J Virol* 87: 7790-7792, 2013.

Guerrier G, Goyet S, Chheng ET, Rammaert B, Borand L, Te V, Try PL, Sareth R, Cavailler P, Mayaud C, Guillard B, Vong S, Buchy P, Tarantola A. Acute viral lower respiratory tract infections in Cambodian children: clinical and epidemiological characteristics. *Pediatr Infect Dis J* 32: 8-13, 2013.

Guido M, Quattrocchi M, Campa A, Zizza A, Grima P, Romano A, Donno A. Human metapneumovirus and human bocavirus associated with respiratory infection in Apulian population. *Virology* 417: 64-70, 2011.

Gurda BL, Parent KN, Bladdek H, Sinkovits RS, DiMattia MA, Rence C, Castro A, McKenna R, Olson N, Brown K, Baker TS, McKenna MA. Human Bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the *Parvoviridae*. *J Virol* 84: 5880-5889, 2010.

Haan CAM, Masters PS, Shen X, Weiss S, Rottier PJM. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* 296: 177-189, 2002.

Hacking D, Hull J. Respiratory syncytial virus – viral biology and the host response. *J Infect* 45: 18-24, 2002.

Hagemeijer MC, Rottier PJM, Haan CAM. Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures. *Viruses* 4: 3245-3269, 2012.

Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* 89: 2359-2376, 2008.

Hall CB, Douglas Jr. RD. Mode of transmission of respiratory syncytial virus. *J Pediatr* 99: 100-103, 1981.

Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 344: 1917-1928, 2001.

Hall CB, Weinberg GA, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Schultz AF, Poehling KA, Szilagyi PG, Griffin MR, Williams JV, Zhu Y, Grijalva CG, Prill MM, Iwane MK. Respiratory syncytial virus – associated hospitalizations among children less than 24 months of age. *Pediatrics* 132: 341-348, 2013.

Hament J, Kimpen JLL, Fleer A, Wolfs TFW. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immun Med Microbiol* 26: 189-195, 1999.

Hampson AW, Mackenzie JS. The influenza viruses. *Med J Austr* 185: 39-43, 2006

Harada Y, Kinoshita F, Yoshida LM, Minh LN, Suzuki M, Morimoto K, Toku Y, Tomimasu K, Moriuchi H, Ariyoshi K. Does respiratory virus coinfection increase the clinical severity of acute respiratory infection among children infected with respiratory syncytial virus?. *Pediatr Infect Dis J* 32: 441-445, 2013.

Haynes AK, Manangan AP, Iwane MK, Sturm-Ramirez K, Homaira N, Brooks WA, Luby S, Rahman M, Klena JD, Zhang Y, Yu H, Zhan F, Dueger E, Mansour AM, Azazzy N, McCracken JP, Bryan JP, Lopez MR, Burton DC, Bigogo G, Breiman RF, Feikin DR, Njenga K, Montgomery J, Cohen AL, Moyes J, Pretorius M, Cohen C, Venter M, Chittaganpitch M, Thamthitiwat S, Sawatwong P, Baggett HC, Lubner G, Gerber SI. Respiratory syncytial virus circulation in seven countries with Global Disease Detection Regional Centers. *J Infect Dis* 208:246–254, 2013.

Heiny AT, Miotto O, Srinivasan KN, Khan AM, Zhang GL, Brusica V, Tan TW, August T. Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *Plos One* 2: 1-14, 2007.

Heiskanen-Kosma T, Korppi M, Jokinen C, Kurki, S, Heiskanen, L, Juvonen, H, Kallinen, S, Stén, M, Tarkiainen, A, Rönkä, P, Kleemola, M, Mäkelä, HP, Leinonen, M. Etiology of childhood pneumonia: serologic results of a prospective, population-based study. *Pediatr Infect Dis J* 17: 986–91, 1998.

Heikkinen T, Jarvinen A. The common cold. *Lancet* 361: 51–59, 2003.

Heo JY, Lee JE, Kim HK, Choe K. Acute lower respiratory tract infections in soldiers, South Korea, April 2011– March 2012. *Emerg Infect Dis* 20: 875-877, 2014.

Henderson G, Murray J, Yeo RP. Sorting of the respiratory syncytial virus matrix protein into detergent-resistant structure is dependent on cell-surface expression of the glycoproteins. *Virology* 300: 244-254, 2002.

Hendley JO, Gwaltney JM. Mechanisms of transmission of rhinovirus infections. *Epidemiol Rev* 10: 242-258, 1988.

Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 16: 242-264, 2003.

Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T, Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Gen Evol* 28: 183-191, 2014.

Hofmann H, Hattermann K, Marzi A, Gramberg T, Geier M, Krumbiegel M, Kuate S, Uberla K, Niedrig M, Pohlmann S. *J Virol* 78: 6134–6142, 2004.

Hofmann H, Pyrc L, van der Hoek M, Geier M, Berkhout B, Pohlmann S. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *PNAS* 102: 7988–7993, 2005.

Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: Lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews* 3: 591-600, 2005.

Huang GH, Xu WB. Recent advance in new types of human adenovirus. *Bing Du Xue Bao* 29: 342–348, 2013.

Huang X, Dong W, Milewska A, Golda A, Qi Y, Zhu QK, Marrasco WA, Baric RS, Sims AC, Pyrc K, Li W, Sui J. Human Coronavirus HKU1 spike protein uses O-acetylated sialic acid as an attachment receptor determinant and employs hemagglutinin-esterase protein as a receptor-destroying enzyme. *J Virol* 89: 7202-7213, 2015.

Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel Human Metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis* 12: 147-150, 2006.

Hui DSC, Chan PKS. Severe acute respiratory syndrome and coronavirus. *Infect Dis Clin North Am* 24: 619-638, 2010.

Huijskens EG, Biesmans RC, Buiting AG, Obihara CC, Rossen JW. Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time PCR. *Virology J* 9: 1-7, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Cidades. Disponível em: www.cidades.ibge.gov.br. Acesso em março de 2016.

ICTV. Virus Taxonomy: 2014 Release. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/>. Acessado em: 05 de janeiro de 2016.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia – Dados históricos. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acesso em março de 2016.

Ivaska L, Niemela J, Heikkinen T, Vuorinen T, Peltola V. Identification of respiratory viruses with a novel point-of-care multianalyte antigen detection test in children with acute respiratory tract infection. *J Clin Virol* 57: 136-140, 2013.

Jackson RJ, Cooper KL, Tappenden P, Rees A, Simpson EL, Read RC, Nicholson KG. Oseltamivir, zanamivir and amantidine in the prevention of influenza: a systematic review. *J Infect* 62: 14-25, 2011.

Jacobs SE, Lamson DM, George KS, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev* 26: 135-162, 2013.

Jamieson AM, Pasman L, Yu S, Gamradt P, Homer RJ, Decker T, Medzhitov R. Role of tissue protection in lethal respiratory viral-bacterial coinfection. *Science* 7: 1230-1234, 2013.

Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, Visser CE, Pajkrt D, Molenkamp R, Jong MD, Schinkel J. Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol* 49: 2631-2636, 2011.

- Jartti T, Jartti L, Peltola V, Waris M, Ruuskanen O. Identification of respiratory viruses in asymptomatic subjects. *Pediatr Infect Dis J* 27: 1103-1107, 2008a.
- Jartti T, Lee W, Pappas T, Evans M, Lemanske RF, Gerns JE. Serial viral infections in infants with recurrent respiratory illnesses. *Eur Respir J* 32: 314-320, 2008b.
- Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Soderlund-Venermo M. Human bocavirus – the first 5 years. *Rev Med Virol* 22: 46-64, 2012.
- Jartti T, Soderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Makela MJ. New molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract infections in children. *Paediatr Respir Rev* 14: 38-45, 2013.
- Jeong JH, Kim KH, Jeong SH, Park JW, Lee SM, Seo YH. Comparison of Sputum and Nasopharyngeal Swabs for Detection of Respiratory Viruses. *J Med Virol* 86: 2122-2127, 2014.
- Jevsnik M, Ursic T, Zigon N, Lusa L, Krivec U, Petrovec M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect Dis* 12: 1-7, 2012.
- Jin Y, Zhang R, Xie Z, Yan K, Gao H, Song J, Yuan X, Hou Y, Duan Z. Prevalence of adenovirus in children with acute respiratory tract infection in Lanzhou, China. *Virology J* 10: 271-279, 2013.
- Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related protein. *PNAS* 84: 5625-5629, 1987.
- Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* 19: 546-557, 2006.
- Kantola K, Sadeghi M, Antikainen J, Kirveskari J, Delwart E, Hedman K, Soderlund-Venermo M. Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. *J Clin Virol* 48: 4044-4050, 2010.
- Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaikat S, Alam MM, Sharif S, Angez M, Zaidi S, Delwart E. A new bocavirus species in human stool. *J Infect Dis* 199: 196-200, 2009.
- Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, Triki H, Bahri O, Oderinde B, Baba M, Bukbuk D, Besser J, Bartkus J, Delwart E. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent enteric infections. *J Infect Dis* 201: 1633 – 1643, 2010.
- Karron RA, Wright PF, Crowe JE, Clements-Manm ML, Thompson J, Makhene M, Casey R, Murphy BR. Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines chimpanzees and in human adults, infants, and children. *J Infect Dis* 176: 1428-1436, 1997.
- Khamis FA, Al-Kobaisi MF, Al-Areimi WS, Al-Kindi H, Al-Zakawani I. Epidemiology of Respiratory Virus Infections among infants and young children admitted to hospital in Oman. *J Med Virol* 84:1323-1329, 2012.
- Khor C, Sam I, Hooi P, Chan Y. Displacement of predominant respiratory syncytial virus genotypes in Malaysia between 1989 and 2011. *Infect Gen Ev* 14: 357-360, 2013.

- Kim E, Beeler JA, Crim RL, Piedra PA, Gilbert BE, Gambotto A. Development of an adenovirus-based respiratory syncytial virus vaccine: preclinical evaluation of efficacy, immunogenicity, and enhanced disease in a cotton rat model. *J Virol* 88: 5100-5108, 2014.
- Kohlmeier JE, Woodland DL. Immunity to respiratory viruses. *Ann Rev Immun* 27: 61-82, 2009.
- Krause JC, Panning M, Hengel H, Henneke P. The role of Multiplex PCR in respiratory tract infections in children. *Medicine* 111: 639-645, 2015.
- Kronman MP, Zhou C, Mangione-Smith R. Bacterial prevalence and antimicrobial prescribing trends for acute respiratory tract infections. *Pediatrics* 134: 955-965, 2014.
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling A, Humphrey CD, Shieh W, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang J, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348: 1953-1966, 2003.
- Kunkel F, Herrler G. Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* 195: 195-202, 1993.
- Kunz AN, Ottolini M. The role of adenovirus in respiratory tract infections. *Curr Infect Dis Rep* 12: 81-87, 2010.
- Kuo L, Hurst KR, Masters PS. Exceptional flexibility in the sequence requirements for coronavirus small envelope protein function. *J Virol* 81: 2249-2262, 2007.
- Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang M, Cent A, Corey L, Morrow R. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol* 44: 2382-2388, 2006.
- Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.
- Lambert SB, Whiley DM, O'Neill NT, Andrews EC, Canavan FM, Bletchly C, Siebert DJ, Sloots TP, Nissen MD. Comparing Nose-Throat Swabs and nasopharyngeal Aspirates Collected From Children With Symptoms for Respiratory Virus Identification Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Pediatrics* 122: 615-620, 2008.
- Lau SKP, Yip CCY, Tsoi H, Lee RA, So L, Lau Y, Chan K, Woo PCY, Yuen K. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J Clin Microbiol* 45: 3655-3664, 2007.
- Lee J, Storch MD. Characterization of Human Coronavirus-OC43 and HCoV-NL63 Infections among Hospitalized Children <5 Years of Age. *Pediatr Infect Dis J* 33: 814-820, 2014.
- Lehtoranta L, Soderlund-Venermo M, Nokso-Koivisto J, Toivola H, Blomgren K, Hatakka K, Poussa T, Korpela R, Pitkaranta A. Human bocavirus in the nasopharynx of otitis-prone children. *Inter J Pediatr Otorhin* 76: 206-211, 2012.
- Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, Perl TM, Nelson KE, Cummings DAT. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet* 9: 291-300, 2009.

- Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is a attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 68: 2521-2524, 1987.
- Li Q, Zhang Z, Zheng Z, Ke X, Luo H, Hu Q, Wang H. Identification and characterization of complex dual nuclear localization signals in human bocavirus NP1. *J Gen Virol* 94: 1335 – 1342, 2013.
- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426: 450-454, 2003.
- Liao X, Hu Z, Liu W, Lu Y, Chen D, Chen M, Qiu S, Zeng Z, Tian X, Cui H, Zhou R. New epidemiological and clinical signatures of 18 pathogens from respiratory tract infections based on a 5-year study. *Plos One* 10: 1-15, 2015.
- Liesman RM, Buchholz UJ, Luongo CL, Yang L, Proia AD, DeVincenzo JP, Collins PL, Pickles RJ. RSV-encode NS2 promotes epithelial cell shedding and distal airway obstruction. *J Clin Invest* 124: 2219-2233, 2014.
- Lima CRA, Mirandolli TB, Carneiro LC, Tusset C, Romer CM, Andreolla HF, Baethgen LF, Pasqualotto AC. Prolonged respiratory viral shedding in transplant patients. *Transplant Infect Dis* 16: 165–169, 2013.
- Liu T, Li Z, Zhang S, Song S, Julong W, Lin Y, Guo N, Xing C, Xu A, Bi Z, Wang X. Viral etiology of acute respiratory tract infections in hospitalized children and adults in Shandong Province, China. *Virology J* 12:168-175 , 2015.
- Liu W, Liu Q, Chen D, Liang H, Chen X, Huang W, Qin S, Yang Z, Zhou R. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus type. *BMC Infect Dis* 13: 1-8, 2013.
- Lo MS, Brazas RM, Holtzman MJ. Respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of Stat2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. *J Virol* 79: 9315-9319, 2005.
- Loh TP, Lai FYL, Tan ES, Thoon KC, Tee NWS, Cutter J, Tang JW. Correlations between clinical illness, respiratory virus infections and climate factors in a tropical paediatric population. *Epidemiol Infect* 139: 1884–1894, 2011.
- López-Huertas MR, Casas I, Acosta-Herrera B, García ML, Coiras MT, Pérez-Brena P. Two RT-PCR based assays to detect human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Meth* 129: 1-7, 2005.
- Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese, P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *Plos Pathogens* 3: 1470-1476, 2007.
- Lu G, Hu Y, Wang Q, Qi J, Gao F, Li Y, Zhang Y, Zhang W, Yuan Y, Bao J, Zhang B, Shi Y, Yan J, Gao GF. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. *Nature* 500: 227-231, 2013.
- Luby SP, Lu X, Cromeans T, Sharker MAY, Kadir MA, Erdman DD. Hand contamination with human rhinovirus in Bangladesh. *J Med Virol* 86: 2177-2180, 2014.
- Mackow N, Amaro-Carambot E, Liang B, Surman S, Lingemann M, Yang L, Collins PL, Munir S. Attenuated human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) expressing the fusion glycoprotein of

- human respiratory syncytial virus (RSV) as a bivalent HPIV1/RSV vaccine. *J Virol* 89: 10319-10332, 2015.
- Mahony JB. Detection by respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* 21: 716-747, 2008.
- Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48: 217–249, 2011.
- Marc D. Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *J Gen Virol* 95: 2594-2611, 2014.
- Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A, Englund JA. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare. *J Infect Dis* 201: 1625 – 1632, 2010.
- Martin ET, Fairchok MP, Stednick ZJ, Kuypers J, Englund JA. Epidemiology of multiple respiratory viruses in childcare attendees. *J Infect Dis* 207: 982-989, 2013.
- Martin ET, Kuypers J, McRoberts JP, Englund JA, Zerr DM. Human bocavirus 1 primary infection and shedding in infants. *J Infect Dis* 44: 1-9, 2015.
- Martínez-Roig A, Salvadó M, Caballero-Rabasco MA, Sánchez-Buenaavida A, López-Segura N, Bonet-Alcaina M. Viral Coinfection in childhood respiratory tract infections. *Arch Bronc* 51: 5-9, 2015.
- Masters PS, Koetzner CA, Kerr CA, Heo Y. Optimization of targeted RNA recombination and mapping of a novel nucleocapsid gene mutation in the coronavirus mouse hepatitis virus. *J Virol* 68: 328-337, 1994.
- Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 66: 193-212, 2006.
- Masters PS, Perlman. Coronaviridae. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.
- Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS* 101: 4620-4024, 2004.
- Matsuzaki Y, Sugawara K, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Mizuta K, Katsushima N, Katsushima F, Katsushima Y, Itagaki T, Shimotai Y, Hongo S, Muraki Y, Nishimura H. Epidemiological information regarding the periodic epidemics of influenza C virus in Japan (1996-2013) and the seroprevalence of antibodies to different antigenic groups. *J Clin Virol* 61: 87-93, 2014.
- McDevitt J, Rudnick S, First M, Spengler J. Role of absolute humidity in the inactivation of Influenza viruses on stainless steel surfaces at elevated temperatures. *Appl Environ Microbiol* 76: 3943 – 3947, 2010.
- McIntyre CL, Knowles NJ, Simmonds P. Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *J Gen Virol* 94: 1791-1806, 2013.
- Melero JA, García-Barreno B, Martínez I, Pringle CR, Cane PA. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol* 78: 2411-2418, 1997.

Mejias A, Ramilo O. Defining the burden of respiratory syncytial virus infection. *Jornal de Pediatria* 89: 517-519, 2013.

Monto AS. Occurrence of respiratory virus: time, place and person. *Pediatr Infect Dis J* 23: 58-64, 2004.

Morikawa S, Hiroi S, Kase T. Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *J Clin Virol* 64: 59-63, 2015.

Morozumi M, Shimizu H, Matsushima Y, Mitamura K, Tajima T, Iwata S, Ubukata K. Evaluation of new immunochromatographic assay kit for adenovirus detection in throat swab: Comparison with culture and real-time PCR results. *J Infect Chem* 20: 303-306, 2014.

Morris JA, Blount RE, Savage RE. Recovery of cytopathic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 92: 544-550, 1956.

Motta FC, Luiz MO, Couceiro JN. Serological analysis reveals circulation of influenza C viruses, Brazil. *Rev Saúde Pública* 34: 204-205, 2000.

Mould JA, Paterson RG, Takeda M, Ohigashi Y, Venkataraman P, Lamb RA, Pinto LH. Influenza B virus BM2 protein has ion channel activity that conducts protons across membranes. *Develop cell* 5: 175-184, 2003.

Moura FEA, Perdigão ACB, Siqueira MM. Seasonality of influenza in the tropics: a distinct pattern in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 81: 180-183, 2009.

Moura FEA. Influenza in the tropics. *Curr Opin Infect Dis* 23: 415-420, 2010.

Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J of Path* 235: 217-228, 2015.

Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 66: 2111-2124, 1985.

Munywoki PK, Hamid F, Mutunga M, Welch S, Cane P, Nokes DJ. Improved detection of respiratory viruses in pediatric outpatients with acute respiratory illness by real-time PCR using nasopharyngeal flocked swabs. *J Clin Microbiol* 49: 3365-3367, 2011.

Muraki Y, Hongo S. The molecular virology and reverse genetics of influenza C virus. *Jap J of Infect Dis* 63: 157-165, 2010.

Murray EL, Klein M, Brondi L, McGowan JE, Mels CV, Brooks WA, Kleinbaum D, Goswami D, Ryan PB, Bridges CB. Rainfall, household crowding, and acute respiratory infections in the tropics. *Epidemiol Infect* 140: 78-86, 2012.

Musher DM. How contagious are common respiratory tract infections?. *N Engl J Med* 348: 1256-1266, 2003.

Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratou E, Sutanto A, Sedyaningsih ER, Ngama M, Munywoki PK, Kartasasmita C, Simões EAF, Rudan I, Weber MW, Campbell H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 375: 1545-1555, 2012.

Nair H, Simões EAF, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JSF, Feikin DR, Mackenzie GA, Moisi JA, Roca A, Baggett HC, Zaman SMA, Singleton RJ, Lucero MG,

- Chandran A, Gentile A, Cohen C, Krishnan A, Bhutta ZA, Arguedas A, Clara AW, Andrade AL, Ope M, Ruvinsky RO, Hortal M, McCracken JP, Madhi SA, Bruce N, Qazi SA, Morris SS, Arifeen SE, Weber MW, Scott JAG, Brooks WA, Breiman RF, Campbell H. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet* 381: 1380-1390, 2013.
- Nakada S, Creager RS, Krystal M, Aaronson RP, Palese P. Influenza C virus hemagglutinin: Comparison with influenza A and B virus hemagglutinins. *J Virol* 50: 118-124, 1984.
- Nakao A, Hisata K, Matsunaga N, Fujimori M, Yoshikawa N, Komatsu M, Kikuchi K, Takahashi H, Shimizu T. The clinical utility of a near patient care rapid microarray-based diagnostic test for influenza and respiratory syncytial virus infections in the pediatric setting. *Diagn Microbiol Infect Dis* 78: 363-367, 2014.
- Nascimento JP, Siqueira MM, Sutmoller F, Krawczuk MM, Farias V, Ferreira V, Rodrigues MJ. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med São Paulo* 33: 287-296, 1991.
- Nascimento-Carvalho CM, Cardoso MR, Barral A, et al. Seasonal patterns of viral and bacterial infections among children hospitalized with community-acquired pneumonia in a tropical region. *Scan J Inf Dis* 42: 839-844, 2010.
- Nasri D, Bouslama L, Pillet S, Bourlet T, Aouni M, Pozzetto B. Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. *Exp Rev Mol Diag* 7: 419-434, 2007.
- Nemerow GR, Stewart PL, Reddy VS. Structure of human adenoviruses. *Curr Opin Virol* 2: 115-121, 2012.
- Neuman BW, Joseph JS, Saikatendu KS, Serrano P, Chatterjee A, Johnson MA, Liao L, Klaus JP, Yates JR, Wuthrich K, Stevens RC, Buchmeier MJ, Kuhn P. Proteomics analysis unravels the functional repertoire of coronavirus nonstructural protein 3. *J Virol* 82: 5279-5294, 2008.
- Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, Droese B, Klaus JP, Makino S, Sawicki SG, Siddell SG, Stamou DG, Wilson IA, Kuhn P, Buchmeier MJ. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol* 174: 11-22, 2011.
- Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J* 19: 6751-6758, 2000.
- Neumann G, Kawaoka Y. Transmission of influenza A viruses. *Virology* 479-480: 234-246, 2015.
- Nichols WG, Campbell AJP, Boeckh M. Respiratory viruses other than Influenza virus: Impact and therapeutic advances. *Clin Microbiol Rev* 21: 274-290, 2008.
- Niederman MS, Krilov LR. Acute lower respiratory infections in developing countries. *Lancet* 381: 1341-1342, 2013.
- Nishio M, Tsurudome M, Ito M, Garcin D, Kolakofsky D, Ito Y. Identification of paramyxoviruses V protein residues essential for STAT protein degradation and promotion of virus replication. *J Virol* 79: 8591-8601, 2005.

Nokso-Koivisto J, Pyles RB, Miller AL, Jennings K, Loeffelholz M, Chonmaitree T. Role of human bocavirus in upper respiratory tract infections and acute otitis media. *J Pediatric Infect Dis Soc* 3: 98-103, 2014.

Nolan T, Borja-Tabora C, Lopez P, et al. Prevalence and incidence of respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in children aged 6 months to 10 years with influenza-like illness enrolled in a randomized Trial. *Clin Infect Dis* 60: 80-89, 2015.

Odagiri T, Hong J, Ohara Y. The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component. *J Gen Virol* 80: 2573-2581, 1999.

O'Donnell R. Features of respiratory syncytial virus. *Paediatr Child Health* 19: 43-47, 2008.

Okoro EA, Ngama M, Bett A, Cane PA, Medley GF, Nokes DJ. Factors associated with increased risk of progression to respiratory syncytial virus-associated pneumonia in young Kenyan children. *Trop Med Inter Health* 13: 914-926, 2008.

Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, Westin J, Lindh M. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Exp Rev Anti-infect Ther* 9: 615-626, 2011.

Onyango CO, Welch SR, Munywoki PK, Agoti CN, Bett A, Ngama M, Myers R, Cane PA, Nokes DJ. Molecular epidemiology of human rhinovirus infections in Kilifi, Coastal Kenya. *J Med Virol* 84: 823-831, 2012.

Paiva TM, Ishida MA, Benega MA, Constantino CRA, Silva DBB, Santos KCO, Oliveira MI, Barbosa HA, Carvalhanas TRMP, Schuck-Paim C, Alonso WJ. Shift in the timing of respiratory syncytial virus circulation in a subtropical megalopolis: implications for immunoprophylaxis. *J Med Virol* 84: 1825-1830, 2012.

Palese P. The genes of influenza virus. *Cell* 10: 1-10, 1977.

Palmenberg AC, Spiro D, Kuzmickas R, Wang S, Djikeng A, Rathe JA, Fraser-Liggett CM, Liggett SB. Sequencing and analysis of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science* 324: 55-59, 2009.

Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB. Analysis of complete genome sequences of human rhinoviruses. *J All Clin Imm* 125: 1190-1201, 2010.

Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Inter J Infect Dis* 25: 45-52, 2014.

Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, Papi A, Leir SH, Fraenkel DJ, Meyer J, Lackie PM, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL. Rhinoviruses infect the lower airways. *J Infect Dis* 181: 1875-1884, 2000.

Papenburg J, Carbonneau J, Isabel S, Bargerion MG, Williams JV, Serres G, Hamelin M, Boivin G. Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J Clin Virol* 58: 541-547, 2013.

Parrish CR, Murcia PR, Holmes EC. Influenza virus reservoirs and intermediate hosts: dogs, horses, and new possibilities for influenza virus exposure of humans. *J Virol*. 89: 2991-2994, 2015.

Paterson RG, Leser GP, Shaughnessy MA, Lamb RA. The paramyxoviruses SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* 208: 121-131, 1995.

Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: Old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis* 52: 284-289, 2011.

Paynter S, Sly PD, Ware RS, Williamns G, Weinstein P. The importance of the local environment in the transmission of respiratory syncytial virus. *Sci Total Environ* 493: 521-525, 2014a.

Paynter S, Ware RS, Lucero MG, Tallo V, Nohynek H, Weinstein P, Williams G, Sly PD, Simões EAF. Malnutrition: A Risk Factor for Severe Respiratory Syncytial Virus Infection and Hospitalization. *Pediatr Infect Dis J* 33: 268-271 2014b.

Paynter S. Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings. *Epidemiol Infect* 143: 1110–1118, 2015.

Pekosz A, Lamb RA. The CM2 protein of influenza C virus is an oligomeric integral membrane glycoprotein structurally analogous to influenza A virus M2 and influenza B virus NB proteins. *Virology* 237: 439-451, 1997.

Pelon W, Mogabgab WJ, Phillips IA, Pierce WE. A cytopathogenic agent isolated from naval recruits with mild respiratory illnesses. *Exp Biol Med* 94: 262-267, 1957.

Peltola V, Jartti T, Putto-Laurila A, Mertsola J, Vainionpää R, Waris M, Hyytiä T, Ruuskanen O. Rhinovirus infections in children: a retrospective and prospective hospital-based study. *J Med Virol* 81: 1831-1838, 2009.

Pica N, Bouvier NM. Environmental factors affecting the transmission of respiratory viruses. *Curr Opin Virol* 2: 90-95, 2012.

Pica N, Bouvier NM. Ambient temperature and respiratory virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 33: 311-313, 2014.

Picornaviridae. Enterovirus. 2016. Disponível em: <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>. Acesso em janeiro de 2016.

Pitoiset C, Darniot M, Huet F, Aho S, Pothier P, Manoha C. Human metapneumovirus genotypes and severity of disease in young children (n=100) during a 7-year study in Dijon Hospital, France. *J Med Virol* 82: 1782-1789, 2010.

Piyaratna R, Tollefson RJ, Williams JV. Genomic analysis of four human metapneumovirus prototypes. *Virus Research* 160: 200-205, 2011.

Polozov IV, Bezrukov L, Gawrisch K, Zimmerberg J. Progressive ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus. *Nat Chem Biol* 4: 248-255, 2008.

Pozo F, García-García ML, Calvo C, Cuesta I, Pérez-Brena P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol* 40: 224 – 228, 2007.

Price WH. The isolation of a new virus associated with respiratory clinical disease in humans. *PNAS* 42: 892-896, 1956.

Prill MM, Iwane MK, Edwards KM, Williams JV, Weinberg GA, Staat MA, Willby MJ, Talbot HK, Hall CB, Szilagyi PG, Griffin MR, Curns AT, Erdman DD. Human coronavirus in young

children hospitalized for acute respiratory illness and asymptomatic controls. *Pediatr Infect Dis J* 31: 235-240, 2012.

Principi N, Scala A, Daleno C, Esposito S. Influenza C virus–associated community-acquired pneumonia in children. *Influenza Other Respir Viruses* 7:999–1003, 2013.

Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *App Envir Microbiol* 60: 2963 – 2970, 1994.

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

Pyrk K, Sims AC, Dijkman R, Jebbink M, Long C, Deming D, Donaldson E, Vabret A, Baric R, van der Hoek L, Pickles R. Culturing the unculturable: Human coronavirus HKU1 infects, replicates, and produces progeny virions in human ciliated airway epithelial cell cultures. *J Virol* 84: 11255-11263, 2010.

Rabie T, Curtis V. Handwashing and risk of respiratory infections: a quantitative systematic review. *Trop Med Inter Health* 11: 258-267, 2006.

Racaniello VR, Palese P. Influenza B virus genome: Assignment of viral polypeptides to RNA segments. *J Virol* 29: 361-373, 1979.

Racaniello VR. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Raman R, Tharakaraman K, Shriver Z, Jayaraman A, Sasisekharan V, Sasisekharan R. Glycan-receptor specificity as a useful tool for characterization and surveillance of influenza A virus. *Trends Microbiol* 22:632 – 641, 2014.

Reed C, Kallen AJ, Patton M, Arnold KE, Farley MM, Hageman J, Finelli L. Infection with community-onset *Staphylococcus aureus* and influenza virus in hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 28: 572-576, 2009.

Ren L, Xiao Q, Zhou L, Xia Q, Liu E. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus subtype B: a novel genotype of subtype B circulating in China. *J Med Virol* 87: 1-9, 2015.

Richardson JC, Akkina RK. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol* 116: 69-80, 1991.

Rihkanen H, Ronkko E, Nieminen T, Komsa K, Raty R, Saxen H, Ziegler T, Roivainen M, Soderlund-Venermo M, Anne L, Hovi T, Pitkaranta A. Respiratory viruses in laryngeal croup of young children. *J Pediatr* 152: 661-665, 2008.

Robinson CM, Singh G, Henquell C, Walsh MP, Peigue-Lafeuille H, Seto D, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J. Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. *Virology* 409: 141-147, 2011.

Roelvink PW, Lizonova A, Lee JGM, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, Wickham TJ. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 72: 7909-7915, 1998.

- Romero JR. Palivizumab prophylaxis of respiratory syncytial virus disease from 1998 to 2002: results from four years of palivizumab usage. *Pediatr Infect Dis J* 22: 46-54, 2003.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrot RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proceed Soc Exper Biol Med* 84: 570-573, 1953.
- Ruuskanen O, Ogra PL. Respiratory syncytial virus. *Curr Prob Pediatr*: 50-79, 1993.
- Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet* 377: 1264-1275, 2011.
- Rux JJ, Burnett RM. Adenovirus structure. *Human Gene Therapy* 15: 1167-1176, 2004.
- Salah B, Xuan ATD, Fouilladieu JL, Lockhart A, Regnard J. Nasal mucociliary transport in healthy subjects is slower when breathing dry air. *Eur Respir J* 1: 852-855, 1988.
- Schenk T, Maier B, Hufnagel M, Strahm B, Kontny U, Neumann-Haefelin D, Falcone V. Persistence of human bocavirus DNA in immunocompromised children. *Pediatr Infect Dis J* 30: 82-84, 2011.
- Schildgen O, Muller A, Allander T, Mackay IM, Volz S, Kupfer B, Simon A. Human bocavirus: Passenger or pathogen in acute respiratory tract infections?. *Clin Microbiol Rev* 21: 291-304, 2008.
- Schomacker H, Schaap-Nutt A, Collins PL, Schmidt AC. Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Curr Opin Virol* 2: 294-299, 2012.
- Schroek JL, Ruh CA, Sellick JA, Ott MC, Mattappallil A, Mergenhagen KA. Factors associated with antibiotic misuse in outpatient treatment for upper respiratory tract infections. *Antimicrobial Agents Chem* 59: 3848-3852, 2015.
- Schulze IT. The structure of influenza virus. *Virology* 42: 890-904, 1970.
- Schweiger B, Zadow I, Heckler R. Antigenic drift and variability of influenza viruses. *Med Microbiol Immun* 191: 133-138, 2002.
- Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G, Arnberg N. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 77: 9183-9191, 2003.
- Self WH, Williams DJ, Zhu Y, Ampofo K, Pavia AT, Chappell JD, Hymas WC, Stockmann C, Bramley AM, Schneider E, Erdman D, Finelli L, Jain S, Edwards KM, Grijalva CG. Respiratory viral detection in children and adults: comparing asymptomatic controls and patients with community-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 213: 1-9, 2015.
- Seo YB, Song JY, Choi MJ, Kim IS, Yang TU, Hong K, Cheong HJ, Kim WJ. Etiology and clinical outcomes of acute respiratory virus infection in hospitalized adults. *Infect Chem* 46: 67-76, 2014.
- Seto WH, Conly JM, Pessoa-Silva CL, Malik M, Eremin S. Infection prevention and control measures for acute respiratory infections in healthcare settings: an update. *East Mediterr Health J* 19: 39-47, 2013.

- Sharma M, Damlin A, Pathak A, Lundborg CS. Antibiotic prescribing among pediatric inpatients with potential infections in two private sector hospitals in Central India. *PLoS ONE* 10: 1-12, 2015.
- Shimizu Y, Abiko C, Ikeda T, Mizuta K, Matsuzaki Y. Influenza C virus and human metapneumovirus infections in hospitalized children with lower respiratory tract illness. *Pediatr Infect Dis J* 34: 1273-1275, 2015.
- Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440: 435-436, 2006.
- Silva ER, Pitrez PMC, Arruda E, Mattiello R, Sarria EE, Paula FE, Proença-Modena JL, Delcaro LS, Cintra O, Jones MH, Ribeiro JD, Stein RT. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-infection as risk factors. *BMC Infect Dis* 13: 1-8, 2013.
- Silva RC, Siqueira MAM, Netto EM, Bastos JS, Nascimento-Carvalho CM, Vilas-Boas AL, Bouzas ML, Motta FC, Brites C. Epidemiological aspects of influenza A related to climatic conditions during and after a pandemic period in the city of Salvador, northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 229-235, 2014.
- Silva RC, Mendes GS, Rojas MA, Amorim AR, Couceiro JN, Lupi O, Elabras J, Pires G, Valle S, Santos N. Frequency of viral etiology in symptomatic adult upper respiratory tract infections. *Braz J Infect Dis* 19: 30-35, 2015.
- Sirimi N, Miligkos M, Koutouzi F, Petridou E, Siahianidou T, Michos A. Respiratory Syncytial virus activity and climate parameters during a 12-year period. *J Med Virol*, 2015.
- Smith DB, Gaunt ER, Digard P, Templeton K, Simmonds P. Detection of influenza C virus but not influenza D virus in Scottish respiratory samples. *J Clin Virol* 74: 50-53, 2016.
- Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. *Lancet*: 66-68, 1933.
- Spyridaki IS, Christodoulou I, Beerb L, Hovland V, Kurowski M, Olszewska-Ziaber A, Carlsen K, Lodrup-Carlson K, van Drunen CM, Kowalski ML, Molenkamp R, Papadopoulos NG. Comparison of four nasal sampling methods for the detection of viral pathogens by RT-PCR-A-GA2LEN Project. *J Virol Meth* 156: 102-106, 2009.
- Sobsey MD, Meschke JS. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. Report for the World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 70, 2003.
- Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardoso MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis and control of enterovirus 71. *Lancet* 10: 778-790, 2010.
- Stover CS, Ltwinn CM. The epidemiology of upper respiratory infections at a tertiary care Center: prevalence, seasonality, and clinical symptoms. *J Respir Med* 2014: 1-8, 2014.
- Stadler K, Maignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk H, Rappuoli R. SARS – Beginning to understand a new virus. *Nature Rev* 1: 209-218, 2003.
- Strasser P, Unger U, Strobl B, Vilas U, Vlasak R. Recombinant viral sialate-O-acetyltransferases. *Glycoconjugate J* 20: 551-561, 2004.

- Sturman LS, Holmes KV, Behnke J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol* 33: 449-462, 1980.
- Sun B, Cai Y, Li Y, Li J, Liu K, Li Y, Yang Y. The nonstructural protein NP1 of human bocavirus1 induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells. *Virology* 440: 75-83, 2013.
- Suzuki T, Portner A, Scroggs RA, Uchikawa M, Koyama N, Matsuo K, Suzuki Y, Takimoto T. Receptor specificities of human respirovirus. *J Virol* 75: 4604-4613, 2001.
- Talbot HK, Falsey AR. The diagnosis of viral respiratory disease in older adults. *Clin Infect Dis* 50: 747-751, 2010.
- Tamerius JD, Shaman J, Alonso WJ, Bloom-Feshbach, Uejio CK, Comrie A, Viboud C. Environmental predictors of seasonal influenza epidemics across temperate and tropical climates. *PLOS One* 9: 1-12, 2013.
- Tang JW, Loh TP. Correlations between climate factors and incidence – A contributor to RSV seasonality. *Rev Med Virol* 24: 15-34, 2014.
- Tapparel C, Cordey S, Junier T, Fanirelli L, van Belle S, Soccia PM, Aubert J, Zdobnov E, Kaiser L. Rhinovirus genome variation during chronic upper and lower respiratory tract infections. *PLOS One* 6: 1-8, 2011.
- Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Gen Evol* 14: 282-293, 2013.
- Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell host & Microbe* 7: 440-451, 2010.
- Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Ann Rev Path* 3:499-522, 2008.
- Taubenberger JK, Baltimore D, Doherty PC, Markel H, Morens DM, Webster RG, Wilson IA. Reconstruction of the 1918 influenza virus: unexpected rewards from the past. *mBio* 3: 1-5, 2012.
- Taylor RM. A further note on 1233 (“Influenza C”) virus. *Arch. Gesamte Virusforsch* 4: 485-500, 1951.
- Tewary SK, Zhao H, Shen W, Qiu J, Tang L. Structure of the NS1 protein N-Terminal origin recognition/nickase domain from the emerging human bocavirus. *J Virol* 87: 11487 – 11493, 2013.
- Thammawat S, Sadlon TA, Hallsworth PG, Gordon DL. Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection. *J Virol* 82: 11767-11774, 2008.
- Thangavel RR, Bouvier NM. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *J Immun Meth* 410: 60-79, 2014.
- Thavagnanam S, Christie SN, Doherty GM, Coyle PV, Shields MD, Heaney LG. Respiratory viral infection in lower airways of asymptomatic children. *Acta Paediatr* 99: 394-398, 2010.
- Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DBL, Golono MA, Gillio AE, Stwien KE, Erdman DD, Durigon EL. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr* 83: 422-428, 2007.

- Tong S, Lia Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo DAA, Chen L, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle MS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xub X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *PNAS* 109: 4269-4274, 2012.
- Tran DN, Trinh QD, Pham NTK, Vu MP, Há MT, Nguyen TQN, Okitsu S, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Clinical and epidemiological characteristics of acute respiratory virus infections in Vietnamese children. *Epidemiol Infect* 144: 527-536, 2016
- Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: Causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev* 23: 74-98, 2010.
- Tsai K, Chen G. Influenza genome diversity and evolution. *Microbes Infect* 13: 479-488, 2011.
- Tunsjo HS, Berg AS, Inchley CS, Roberg IK, Leegaard TM. Comparison of nasopharyngeal aspirate with flocked swab for PCR-detection of respiratory viruses in childre. *APMIS* 123: 473-477, 2015.
- Ud-Dean SMM. Structural explanation for the effect of humidity on persistence of airborne virus: Seasonality of influenza. *J Theor Biol* 264: 822-829, 2010.
- Uncapher CR, DeWitt CM, Colonno RJ. The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology* 180: 814-817, 1991.
- Vainionpaa R, Hyypia T. Biology of parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 7: 265-275, 1994.
- Van den Brand JMA, Haagmans BL, van Riel D, Osterhaus ADME, Kuiken T. The pathology and pathogenesis of experimental severe acute respiratory syndrome and influenza in animal models. *J Comp Path* 151: 1-30, 2014.
- Van den Brand JMA, Smits SL, Haagmans BL. Pathogenesis of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Path* 235: 175-184, 2015.
- Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, Groot R, Fouchier RAM, Osterhaus ADME. A newly discovered human metapneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Medicine* 7: 719-724, 2001.
- Van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, Swart RL, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 10: 658-666, 2004.
- Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, Dillen PMEW, Kaandorp J, Spaargaren J, Berkhout B. Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine* 10: 368-373, 2004.
- Van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, Petersen G, Forster J, Berkhout B, Uberla K. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLOS Medicine* 2: 764-770, 2005.
- Van Der Sande MA, Goetghebuer T, Sanneh M, Whittle HC, Weber MW. Seasonal variation in respiratory syncytial virus epidemics in the Gambia, West Africa. *Pediatr Infect Dis J* 23:73-74, 2004.

- Van der Zalm MM, Van Ewijk BE, Wilbrink B, Uiterwaal CSPM, Wolfs TFW, van der Ent CK. Respiratory pathogens in children with and without respiratory symptoms. *J Pediatr* 154: 396-400, 2009.
- Vandini S, Bottau P, Faldella G, Lanari M. Immunological, viral, environmental, and individual factors modulating lung immune response to respiratory syncytial virus. *BioMed Res Inter*, 2015.
- Venter M, Rock M, Puren AJ, Tiemessen CT, Crowe JE. Respiratory syncytial virus nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell epitopes in a south African population of diverse HLA types are conserved in circulating field strains. *J Virol* 77: 7319-7329, 2003.
- Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human Bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 13: 636-637, 2007.
- Volling C, Hassan K, Mazzulli T, Green K, Al-Den A, Hunter P, Mangat R, Ng J, McGeer A. Respiratory syncytial virus infection-associated hospitalization in adults: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis* 14: 665-672, 2014.
- Wagner R, Matrosovich M, Klenk H. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* 12:159-166, 2002.
- Walker CLF, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, O'Brien KL, Campbell H, Black RE. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* 381: 1405-1416, 2013.
- Walsh EE, Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in adult populations. *Infection Disorders – Drug Targets* 12: 98-102, 2012.
- Wang D, Chen L, Ding Y, Zhang J, Hua J, Geng Q, Ya X, Zeng S, Wu J, Jiang Y, Zhang T, Zhao G. Viral etiology of medically attended influenza-like illnesses in children less than 5 years old in Suzhou, China, 2011-2014. *J Med Virol*, 2016.
- Wang G, Deering C, Macke M, Shao J, Burns R, Blau DM, Holmes KV, Davidson BL, Perlman S, McCray PB. Human coronavirus 229E infects polarized airway epithelia from the apical surface. *J Virol* 74: 9234-9239, 2000.
- Wang H, Li ZY, Liu Y, Persson J, Beyer I, Moller T, Koyuncu D, Drescher MR, Strauss R, Zhang X, Wahl JK, Urban N, Drescher C, Hemmink A, Fender P, Lieber A. Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11, and 14. *Nature Medicine* 17: 96-104, 2011.
- Wang J, Engvall K, Smedje G, Norback D. Rhinitis, asthma and respiratory infections among adults in relation to the home environment in multi-family buildings in Sweden. *Plos One* 9: 1-14, 2014.
- Wang W, Cavailler P, Ren P, Zhang J, Dong W, Yan H, Mardy S, Cailhol J, Buchy P, Sheng J, Fontanet A, Deubel V. Molecular monitoring of causative viruses in child acute respiratory infection in endemo-epidemic situations in Shanghai. *J Clin Virol* 49: 211-218, 2010.
- Wark PAB, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, Holgate ST, Davies DE. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* 201: 937-947, 2005.
- Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health* 3:268–80, 1998.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179, 1992.

Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. *Ann New York Aca Sci* 1323: 115-139, 2014.

Weinberg GA, Hall CB, Iwane MK, Poehling KA, Edwards KM, Griffin MR, Staat MA, Curns AT, Erdman DD, Szilagyi PG. Parainfluenza virus infection of young children: Estimates of the population-based burden of hospitalization. *J Pediatr* 154: 694-699, 2009.

Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus pathogenesis. *Adv Virus Res* 81: 85-164, 2011.

WHO - *World Health Organization*. Infection prevention and control of epidemic- and pandemic- prone acute respiratory infections in health care. Geneva: Word Health Organization, 2014a.

WHO - *World Health Organization*. Influenza virus infections in humans. Geneva: Word Health Organization, 2014b.

WHO - *World Health Organization*. Pneumonia. 2014c. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>. Acesso em maio de 2015.

WHO-*World Health Organization*. A manual for estimating disease burden associated with seasonal influenza. Geneva: Word Health Organization, 2015.

WHO-*World Health Organization*. Severe Acute Respiratory Syndrome - SARS. 2016a. Disponível em: < <http://www.who.int/csr/sars/en/>>. Acesso em março de 2016.

WHO-*World Health Organization*. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). 2016b. Disponível em: < <http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>>. Acesso em março de 2016.

Wold WSM, Ison MG. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Woo PCY, Lau SKP, Chu C, Chan K, Tsoi H, Huang Y, Wong BHL, Poon RWS, Cai JJ, Luk W, Poon LLM, Wong SSY, Guan Y, Peiris JSM, Yuen K. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 79: 884-895, 2005.

Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 2013.

Wu P, Chang L, Berkhout B, van der Hoek L, Lu C, Kao C, Lee P, Shao P, Lee C, Huang F, Huang L. Clinical manifestations of human coronavirus NL63 infection in children in Taiwan. *Eur J Pediatr* 167: 75-80, 2008.

Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol* 22: 183-191, 2014.

Xu L, He X, Zhang D, Feng F, Wang Z, Guan L, Wu J, Zhou R, Zheng B, Yuen K, Li M, Cao K. Surveillance and Genome Analysis oh Human Bocavirus in Patients with Respiratory infection in Guangzhou, China. *Plos One* 7: 1-9, 2012.

Yamada H, Hayata S, Omata-Yamada T, Taira H, Mizumoto K, Iwasaki K. Associaton of the Sendai virus C protein with nucleocapsids. *Arch Virol* 113: 245-253, 1990.

- Yang D, Leibowitz JL. The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Res* 206: 120-133, 2015.
- Yea C, Cheung R, Collins R, Adachi D, Nishikawa J, Tellier R. The complete sequence of a human parainfluenzavirus 4 genome. *Viruses* 1: 26-41, 2009.
- Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT, Homes KV. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357: 420-422, 1992.
- Yu X, Lu R, Wang Z, Zhu Na, Wang W, Julian D, Chris B, Lv J, Tan W. Etiology and clinical characterization of respiratory virus infections in adult patients attending an emergency department in Beijing. *PLOS One* 7: 1-7, 2012.
- Zaas AK, Garner BH, Tsalik EL, Burke1 T, Woods CW, Ginsburg GS. The current epidemiology and clinical decisions surrounding acute respiratory infections. *Trends Mol Med* 20: 579-588, 2014.
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 367: 1814-1820, 2012.
- Zhang L, Peeples ME, Boucher RC, Collins PL, Pickles RJ. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol* 76: 5654-5666, 2002.
- Zhang L, Bukreyev A, Thompson CI, Watson B, Peeples ME, Collins PL, Pickles RJ. Infection of ciliated cells by human parainfluenza virus type 3 in an in vitro model of human airway epithelium. *J Virol* 79: 1113-1124, 2005.
- Zumla A, Al-Tawfiq JA, Enne VI, Kidd M, Drosten C, Breuer J, Muller MA, Hui D, Maeurer M, Bates M, Mwaba P, Al-Hakeem R, Gray G, Gautret P, Al-Rabeeah AA, Memish ZA, Gant V. Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections -needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis* 14: 1123-1135, 2014.

Anexo A. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do projeto de pesquisa: Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecção respiratória e/ou gastroenterite: estudo caso-controle.

Pesquisador responsável: Teresinha Teixeira de Sousa

Orientadora: Profa. Divina das Dores de Paula Cardoso.

Nome do sujeito de Pesquisa:.....

Você autoriza a criança a participar de uma pesquisa, em que ela, seu filho (a) ou a criança pela qual você é responsável está sendo convidado (a) como voluntário(a) a fazer parte deste estudo que tem como título: **"Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecção respiratória e/ou gastroenterite: estudo caso-controle"**.

Meu nome é Teresinha Teixeira de Sousa, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é de médica pneumologista, aluna de doutorado da UFG/IPTSP. A participação da criança é importante, mas antes de decidir se você quer que ela faça parte da pesquisa em que é preciso coletar fezes e secreção do nariz de crianças doentes (com infecções respiratórias e com gastroenterite-diarréia) e também daquelas sem estas doenças (que é o grupo controle, estudar a presença do vírus em quem não está doente), é preciso que o senhor ou a senhora, entenda o motivo da pesquisa: o convite esta sendo feito porque os vírus respiratórios e entéricos são causas comuns de infecções respiratórias e de gastroenterite em crianças.

Vários novos vírus estão sendo descobertos e pouco se conhece sobre seu impacto (importância) em pacientes com essas doenças. Esta pesquisa pretende estudar as infecções respiratórias e gastroenterite por vírus (bocavírus humano/HBoV) em crianças com idades abaixo de 5 anos. Durante o período de um ano atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia/Goiás. A pesquisa será realizada em crianças com sintomas clínicos (casos) de infecção respiratória e/ou gastroenterite e comparar o vírus também em pacientes sem estas doenças (que é o grupo controle, onde estudamos o vírus também em quem está sadio, pois em alguns casos a criança pode ser portadora dos vírus, mas não manifestar a doença). Após o atendimento do paciente pelos pediatras do hospital, um dos membros da equipe pedirá autorização para os pais e/ou responsáveis pelas crianças e explicará em detalhes todos os procedimentos para a pesquisa: haverá o preenchimento de um questionário e uma coleta de cada material (secreção nasal e fezes), em todas as crianças tanto as doentes como as sadias que estão no hospital por outros motivos. Todos estes procedimentos serão feitos pela pesquisadora responsável (Teresinha, médica) em sala ao lado do ambulatório no térreo e sala procedimentos no segundo andar / enfermarias do Hospital Materno Infantil, onde será garantida a privacidade da criança, por ocasião das consultas e/ou hospitalização, sem a necessidade de comparecimento ou retorno ao Hospital por motivo relacionado à Pesquisa.

Os exames de fezes e secreção nasal não substituirão os exames regularmente colhidos no Hospital como parte do seguimento médico dos pacientes. A participação de seu filho (a) ou a criança pela qual você é responsável é importante, mas você e a criança podem recusar participar da pesquisa a qualquer momento. Os procedimentos

apresentam riscos baixos à integridade física da criança, serão realizados pela pesquisadora (Teresinha) e consistem em: Coleta de lavado nasal é feita através de uma pequena sonda com soro fisiológico, introduzida nas narinas e aspirada ("como uma lavagem do nariz com soro, só que aspirado o líquido de volta"), podendo ocorrer desconforto local e muito raramente pequeno sangramento nasal, sem danos posteriormente para a criança. E a coleta de fezes é espontânea, durante a evacuação, a qual será recolhida em um frasco específico, sem a utilização de medicação ou instrumentos para tal. Não acarretando nenhum desconforto direto, podendo ser acompanhado pelo responsável legal da criança. Além da coleta das amostras de secreções nasais e de fezes, o responsável pela criança deverá responder um questionário para o registro das informações pessoais da criança e a pesquisadora poderá, também, anotar dados dos prontuários. O destino dessas amostras será para o Laboratório de Virologia Humano da UFG/IPTSP, onde por exames moleculares os vírus respiratórios e entéricos serão detectados através de técnicas laboratoriais sofisticadas chamadas de PCR em tempo real (material genético dos vírus, DNA e RNA).

Informo, aos pais ou responsáveis pela criança, que as amostras (material biológico de fezes e de secreções nasais) ficarão armazenadas (guardadas) no Instituto de Patologia e Doenças Tropicais da UFG seguindo todas as normas do regulamento aprovado pelo CEP/IPTSP a respeito de biorrepositório (segundo as normas da resolução do CNS 441 de 2011), e, caso eu tenha seu consentimento por escrito autorizando o uso para esta pesquisa e no futuro para qualquer outra pesquisa, não será necessário preencher um novo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE); sobre o bocavírus humano e também para os outros vírus como o: rotavírus (A), calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, aichivírus, salivírus/klassevírus, vírus respiratório sincicial, vírus influenza A e B, vírus da parainfluenza, adenovírus respiratório, rinovírus, metapneumovírus humano, coronavírus e os H1N1. Esta pesquisa estará sendo financiada com recurso do próprio laboratório e de convênios regularmente firmados sem nenhum custo para o SUS, familiares ou planos de saúde. É importante ressaltar, entretanto que a pesquisa está restrita aos procedimentos listados acima.

A participação no estudo NÃO IMPLICA na realização de outro exame e NÃO INTERFERE nas decisões sobre os remédios necessários para o tratamento do problema atual (o médico do hospital que atender seu filho (a) decidirão por procedimentos necessários, como os medicamentos ou outros exames). Estes dados procedimentos e/ou seus resultados, entretanto serão registrados para análise futura. Todos os pacientes serão convidados a participar do estudo, e a qualquer momento podem também deixar de participar, se assim o desejarem. Somente os pesquisadores e/ou equipe de pesquisa terão conhecimento de suas identidades e do questionário. Os pesquisadores pretendem publicar os resultados obtidos pela pesquisa, mas o nome e dados pessoais dos pacientes são TOTALMENTE CONFIDENCIAIS (não haverá identificação dos participantes) os dados também poderão ser utilizados em estudos futuros de outros vírus citados acima.

Em caso de recusa, você e seu filho (a) não serão penalizados (as) de forma alguma, esta recusa em nada implicará na assistência que seu filho (a) receberá. Se aceitar participar e depois retirar seu consentimento também, em nada será prejudicado. É importante destacar que, como não há despesas decorrentes da participação na pesquisa por parte do sujeito da pesquisa, neste caso, o responsável legal e a criança participante não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação. Este estudo tem início no ano de 2013 e previsão de encerramento em 2014.

Autorizo o armazenamento e guarda de amostras de secreção nasal e de fezes, formando um banco de dados/biorrepositório para investigações futuras, e que toda nova pesquisa a ser feita com o material será submetida à aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da CONEP e com a dispensa de novo consentimento a cada pesquisa (Res. CNS n.º 347/2005-1.1, 1.2, 1.3, 1.4).

Após receber os esclarecimentos e as informações, no caso de aceitar fazer parte do estudo, você deverá rubricar todas as páginas e assinar ao final deste documento e, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. A qualquer momento, antes e durante a pesquisa, você poderá solicitar esclarecimentos e em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Teresinha Teixeira de Sousa no telefone: (62) 81595675. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Materno Infantil de Goiânia Telefone (62) 3201-3374.

Local e Data: Goiânia,/...../.....

Nome e Assinatura do pesquisador _____

Consentimento da participação da criança como sujeito da pesquisa pelo responsável legal

Eu, _____, RG _____,
CPF _____, endereço _____,
abaixo assinado concordo que _____ cuja

responsabilidade legal me é conferida autorizo que a criança participe do estudo
“Detecção de Bocavírus Humano (HBoV) em crianças com infecções respiratórias e/ou gastroenterite: estudo caso-controle”, como sujeito de pesquisa.

Fui devidamente informado e esclarecido pelo Pesquisador _____
sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim com os possíveis riscos e
benefícios decorrentes da participação da criança pela qual sou responsável legal.

Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do seu acompanhamento assistência/tratamento e que todas as informações pessoais obtidas serão mantidas em sigilo. Recebi uma cópia deste documento com todas as páginas rubricadas e assinadas por mim e pelo pesquisador participante deste estudo. Autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo sobre o bocavírus humano e, ainda, a formação de um banco de dados e um biorrepositório das amostras (fezes e de secreções nasais) cujo regulamento foi aprovado pelo CEP/IPTSP/UFG, seguindo as normas da resolução do CNS 441 de 2011. E que as amostras obtidas poderão ser utilizadas em pesquisas futuras sem a necessidade do preenchimento de um novo termo de consentimento (TCLE); para o bocavírus humano e para outros vírus como o: rotavírus (A), calicivírus, adenovírus, astrovírus, enterovírus, aichi vírus, salivírus/klassevírus, vírus respiratório sincicial, vírus influenza A e B, vírus da parainfluenza, adenovírus respiratório, rinovírus, metapneumovírus humano, coronavírus e os H1N1.

Local e data: _____

Nome e assinatura do sujeito ou responsável legal: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas

Nome e assinatura: _____

Nome e assinatura: _____

Anexo B. Ficha de investigação clínica

Ficha de investigação clínica.

DATA:/...../..... Registro geral (.....) Nº Amostra (.....)

- | | | | |
|----|-----------|-----------------------------|--------------------------------|
| 1. | Controle: | 1.1 Fezes assintomático () | 1.2 Swab assintomático () |
| 2. | Caso: | 2.1 Sintomas GEA () | 2.2 Sintomas respiratórios () |
| 3. | Amostra: | 3.1 Fezes () | 3.2 Swab () |

Dados epidemiológicos

4. NOME:
5. COLETA: DATA (...../...../.....) HORA (.....)
6. UNIDADE COLETA: () PS () ENFERMARIA ADMISSÃO:
7. SEXO: () MASC. () FEM.
8. DATA DE NASCIMENTO:/...../..... IDADE:
9. Natural: Procedência:
- Endereço:
- Bairro: Cidade: UF:
- Telefone: () Nome responsável:
- Profissão: Mãe Pai:
- Renda familiar (em salário mínimo):
- Habitação: () própria () alugada
- Asfalto: sim() não() Água: () tratada () cisterna () poço Esgoto: sim() não()
10. RAÇA/COR: () branca, () morena, () negra, () indígena
11. ESCOLARIDADE: () pública, () creche, () particular
12. ASSISTÊNCIA MÉDICA: () SUS, () plano de saúde, () particular
13. ALIMENTAÇÃO: () leite materno, () leite materno e outro, () outro
14. TIPO PARTO: () normal, () cesariana

Sintomatologia:

15. A. Respiratório:

Febre: sim() não(), Tosse () sim () não, Dispneia/Chiado () sim () não
SaO₂:/ Rad TX:/ HMG:
Ausculta:/ Temperatura:

B. GASTROENTERITE:

Diarréia: sim() não()/ Frequência: 1 a 2x (), >2x ()
Aspecto: líquida(), semi-líquida(), pastosa(), sangue(), fétida()
Febre: sim() não()/ Vômitos: sim() não()/ Dor abdominal: sim() não()

Antecedentes epidemiológicos:

16. Contato caso suspeito (Respiratório e/ou GEA): ()domicílio, ()creche, () escola

17. Uso de medicação antes coleta: sim() não(), qual?

18. Vacinação completa: sim() não()

Vacina contra gripe: sim() não() Última dose:.....

Vacina rotavírus (VORH)(), Rotarix (), Rotatec() – 1ªdose(), 2ªdose ()

Comprovação: sim(), não()

19. Diagnóstico clínico prontuário:.....

20. Outras patologias/cirurgias:

ANEXO C. Parecer do Comitê de Ética.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISA DE VÍRUS NO TRATO RESPIRATÓRIO EM POPULAÇÃO PEDIÁTRICA

Pesquisador: Fabíola Souza Fiaccadori

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 37305314.7.0000.5078

Instituição Proponente: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.210.852

Apresentação do Projeto:

Este projeto constitui um estudo observacional transversal para avaliar a detecção dos vírus do trato respiratório propostos em crianças com infecção respiratória aguda comparando sua detecção em crianças assintomáticas, o qual ainda fornecerá subsídios na avaliação do papel dos Bocavírus Humanos, estudo desenvolvido em projeto paralelo.

A população será constituída por crianças com até cinco anos de idade do sexo feminino e masculino em atendimento no Hospital Materno Infantil de Goiânia, Goiás; em suas unidades de Pronto Socorro e Enfermaria de Pediatria por um período de um ano (05/2014-04/2015). Após o atendimento pelo clínico pediatra, que inclui anamnese e exame físico, o caso será definido como sintomático de infecção respiratória aguda viral (IRA) aquele que apresentar sinais e sintomas, com comprometimento de leve a grave e com início de até cinco dias de febre, coriza/espirros, tosse, dispnéia e sibilância. Para cada caso sintomático, um caso assintomático pareado por data de nascimento (+/- 6 meses) e sexo, será selecionado aleatoriamente a partir de uma lista de potenciais participantes (assintomáticos para infecções respiratórias ou qualquer outra doença infecto contagiosa) no mesmo dia e unidade em que for selecionado o caso sintomático. Uma visita diária do pesquisador será realizada objetivando buscar prováveis casos para atender o tamanho da amostra, que será composta por 400 indivíduos, sendo 200 de casos sintomáticos e 200 de assintomáticos, através da estimativa de prevalência de infecções respiratórias. A

população atendida neste hospital de referência em pediatria representa a amostragem da população acometida para estas doenças na cidade de Goiânia/ região Centro-Oeste. Seguindo um adequado preenchimento de protocolo do estudo proposto (coleta de dados e fluxo das amostras). As amostras serão coletadas conforme descrito por Lambert e cols (2008). Para os lavados, 1 mL de solução salina estéril será instilada em cada

narina e na sequência aspirado com sonda estéril, armazenando o produto em tubo também estéril e fechado adequadamente. Os swabs serão coletados e armazenados em tubo também estéril contendo meio MEM, fechado e identificado adequadamente. As amostras serão conservadas e transportadas refrigeradas (gelo 4°-8°C) em até duas-quatro horas para o Laboratório de Virologia Humana do IPTSP/UFG, onde serão imediatamente processadas e estocadas a -70°C, até a realização dos ensaios laboratoriais necessários. Em seguida serão submetidas a triagem molecular utilizando quatro reações de multiplex-PCR para investigação de vírus do trato respiratório.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a prevalência e a relação dos principais vírus do trato respiratório como possíveis agentes etiológicos de infecção aguda do trato respiratório através de um estudo realizado em crianças atendidas no Hospital Materno Infantil de Goiânia, durante o período de um ano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Será explicado de forma clara e através de figuras como será realizado a coleta da secreção nasal pela pesquisadora responsável, assim como esclarecer riscos e benefícios. Em relação a riscos, para a coleta de secreção nasal, está será através de lavado ou swab nasal realizado pela pesquisadora responsável (Teresinha, médica), podendo ocorrer desconforto e muito raramente pequeno sangramento nasal, sem danos posterior para as crianças. O procedimento de coleta da amostra clínica utilizando swab geralmente é indolor e não provoca sangramento, entretanto, o procedimento pode gerar um leve desconforto. Na ocorrência desse fato, caso a criança se sinta desconfortável, o pesquisador avaliará o tempo para o término do procedimento e a coleta poderá ser interrompida.

Benefícios:

Também será explicado aos pais e/ou responsáveis pelas crianças (objetos de estudos da pesquisa) a importância de sua participação neste estudo visando aumentar o conhecimento a respeito dos vírus respiratórios, onde sua ocorrência nesta população é elevada, por conseguinte, espera-se com nossos resultados a ampliação de medidas mais eficientes de controle para estas infecções, bem como a diminuição do uso desnecessário de medicamentos como antibióticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem descrito, os pesquisadores apresentam formação e qualificação adequadas para o estudo proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatórios estão presentes.

Recomendações:**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº. 466 de 2012 e na Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, através de Notificação via Plataforma Brasil, os relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações.

O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não