

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Detecção molecular de *Bocavirus humano* e *Metapneumovirus humano*
associados à infecção respiratória aguda**

Diogo André Pilger

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Leistner Segal

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Detecção molecular de *bocavírus humano* e *metapneumovírus humano*
associados à infecção respiratória aguda**

Diogo André Pilger

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Leistner Segal

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2009

P638d Pilger, Diogo André
Detecção molecular de bocavírus humano e
metapneumovirus humano associados à infecção respiratória
aguda / Diogo André Pilger ; orient. Sandra Leistner Segal. –
2009.
89 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do
Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Síndrome respiratória aguda grave 2. Infecções
respiratórias 3. Bocavírus 4. Metapneumovírus 5. Criança 6.
Modelos moleculares I. Segal, Sandra Leistner II. Título.

NLM: WC 505

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Agradecimentos

À Professora Dra. Sandra Leistner-Segal pela sua orientação em toda minha pós-graduação, contribuição na minha formação como pesquisador, permanente disponibilidade e confiança neste trabalho;

Ao Dr. Vlademir Vicente Cantarelli pela proposta, incentivo, orientação, ensinamentos diários e amizade;

Ao Dr. Sérgio Luis Amantéa por acreditar no projeto, generosidade com seus conhecimentos e viabilização do trabalho;

Aos colegas do Laboratório Weinmann, novamente, pela compreensão e oportunidade de realização de mais uma etapa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Hospital de Clínicas de Porto Alegre por oferecer oportunidade e condições para realização do trabalho.

Dedicatória

Àqueles que mais me incentivaram a investir na educação, minha família,
e à Daniela que novamente esteve ao meu lado.

Acredita no teu próprio pensamento (...)

Se não amanhã um estranho dirá, com magistral bom senso, exatamente o que pensamos e sentimos desde sempre, e seremos forçados a receber de outrem, envergonhados, a nossa própria opinião.

Ralph Waldo Emerson

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	9
Lista de Tabelas	10
Lista de Figuras	11
Resumo	12
Abstract	13
I. Introdução	
1. Infecção Respiratória Aguda	14
1.1 Importância da Infecção Respiratória Aguda em Lactentes	14
1.2 Aspectos Anatômicos	15
1.3 Aspectos Imunológicos	16
II. Revisão da Literatura	
1. Bronquiolite	18
1.1 Definição	18
1.2 Manifestações Clínicas	19
1.3 Epidemiologia	19
1.4 Distribuição Etária	19
1.5 Etiologia	20
1.6 Patofisiologia	21
1.7 Distribuição Sazonal	21
1.8 Tratamento	22
2. Sibilância Recorrente	23
2.1 Evolução Clínica da Sibilância	25
3. Bocavirus humano	26
3.1 Aspectos Gerais	26
3.2 Classificação Taxonômica	26
3.3 Biologia	27
3.4 Bocavirus humano e a Infecção Respiratória Aguda	27
3.5 Co-infecções com Bocavirus humano	29

3.6	Epidemiologia	29
3.7	Prevalência de Bocavirus humano	29
3.8	Sazonalidade	30
3.9	Transmissão	30
3.10	Sintomas Clínicos	31
4.	Metapneumovirus	32
4.1	Aspectos Gerais	32
4.2	Classificação Taxonômica	32
4.3	Biologia	32
4.4	Metapneumovirus humano e a Infecção Respiratória Aguda	33
4.5	Co-infecções com Metapneumovirus humano	33
4.6	Epidemiologia	34
4.7	Prevalência de Metapneumovirus humano	34
4.8	Sazonalidade	35
4.9	Patogênese	35
3.10	Sintomas Clínicos	36
5.	Outros Vírus Respiratórios	36
5.1	Vírus Respiratório Sincicial	36
5.2	Vírus Influenza	37
5.3	Vírus Parainfluenza	38
5.4	Adenovirus	39
5.5	Rinovirus	40
6.	Investigação laboratorial de Vírus Respiratórios	40
6.1.	Métodos Laboratoriais Disponíveis	41
6.1.1	Cultura Viral	41
6.1.2	Imunofluorescência	42
6.1.3	Deteção de Ácidos Nucléicos	42
6.1.4	PCR em Tempo Real	43
6.1.5	Diagnóstico Laboratorial de Bocavirus humano e Metapneumovirus humano	45
6.2	Coleta de Material	45

III. Justificativa	47
IV. Objetivos	48
V. Referências Bibliográficas	49
VI. Artigo 1	
<i>Multiplex, SYBR Green-based Real-Time PCR Assays Enhance Detection of Respiratory Pathogens</i>	56
VII. Artigo 2	
<i>Detection of human Bocavirus and human Metapneumovirus by Real-Time PCR from Patients with Respiratory Symptoms in Southern Brazil</i>	72
VIII. Considerações Finais e Perspectivas	86
IX. Anexo I	88

Lista de Abreviaturas e Siglas

IRA: Infecção Respiratória Aguda

IRAs: Infecções Respiratórias Agudas

VRS: Vírus Respiratório Sincicial

TRS: Trato Respiratório Superior

TRI: Trato Respiratório Inferior

Th1: Linfócitos T Auxiliares do tipo 1

Th2: Linfócitos T Auxiliares do tipo 2

IFN- γ : Interferon tipo gamma

IL: Interleucina

IgA: Imunoglobulina do tipo A

AAP: Academia Americana de Pediatras

IgE: Imunoglobulina do tipo E

hBoV: bocavirus humano

DNA: ácido desoxirribonucléico

ORF: *Open Reading Frames* (quadro de leitura aberto)

hMPV: metapneumovirus humano

Gene F: gene *fusion*

Gene G: gene *attachment*

Gene SH: gene *short hidrophobic*

SARS: Síndrome Respiratória Aguda Severa

RNA: Ácido Ribonucléico

H: Hemaglutinina

N: Neuraminidase

PCR: *Polymerase Reaction Chain* (Reação em Cadeia da Polimerase)

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transference (Tranferência de Energia Fluorescente Ressonante)

C: Citosina

G: Guanidina

Lista de Tabelas

Tabela 1. Prevalência de hBoV de 6 estudos realizados mundialmente 30

Tabela 2. Prevalência de hMPV de 5 estudos realizados mundialmente 35

Lista de Figuras

Figura 1. Organização gênica de um isolado ST1 de hBoV 32	27
Figura 2. Organização gênica do hMPV	32

Resumo

Introdução: os vírus são responsáveis por 50 a 90% das infecções respiratórias agudas (IRAs) em crianças pequenas, sendo a maioria das infecções atribuídas ao vírus respiratório sincicial (VRS), vírus influenza A e B, vírus parainfluenza 1, 2 e 3, rinovírus e adenovírus. Mais recentemente, com o advento de métodos moleculares, novos agentes foram identificados e relacionados com IRA, como o metapneumovírus humano (hMPV) e bocavírus humano (hBoV). O reconhecimento da importância da determinação do agente etiológico das IRAs em crianças está aumentando porque permite a implementação de medidas de controle de infecção adequadas e, eventualmente, uso de terapia anti-viral.

Objetivos: o objetivo principal deste trabalho é verificar a presença do hMPV e hBoV em amostras respiratórias de crianças com sintomas de infecção respiratória aguda do trato respiratório inferior através de método molecular. Além disso, verificar sua associação com outros patógenos respiratórios, distribuição sazonal, associação com variáveis climáticas e comparar a metodologia de PCR em Tempo real com a imunofluorescência direta (IFD) para identificação destes outros patógenos respiratórios.

Métodos: foram avaliadas 455 amostras de crianças com sintomas sugestivos de infecção respiratória aguda do trato respiratório inferior no período de maio de 2007 a junho de 2008. A presença de patógenos respiratórios foi analisada por PCR em Tempo Real e IFD.

Resultados: hMPV e hBoV foram identificados na população analisada em uma prevalência de 14.5% e 13.2%, respectivamente. A prevalência global de patógenos respiratórios foi 89.9% quando analisados por PCR em Tempo Real e 78.7% por IFD. O coeficiente kappa de concordância entre as duas metodologias foi de 0.241, evidenciando baixa concordância e o índice de coinfeções identificado por PCR em Tempo Real foi significativamente superior ao encontrado por IFD. Poucas medidas de associação foram observadas entre as variáveis climáticas e os patógenos analisados, entretanto uma clara distribuição sazonal foi observada para a maioria dos patógenos analisados.

Conclusões: os dois vírus pesquisados estão presentes no nosso meio, principalmente nos meses de inverno, frequentemente associados com outros patógenos respiratórios. Independentemente do patógeno respiratório analisado, a metodologia molecular mostrou-se mais eficaz para a identificação de amostras positivas.

Abstract

Introduction: viruses are responsible for 50 to 90% of acute respiratory infections (ARIs) in children, the majority of infections attributed to respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus A and B, parainfluenza viruses 1, 2 and 3, rhinovirus and adenovirus. More recently, with the advent of molecular methods, new agents have been identified and related to ARI, such as human metapneumovirus (hMPV) and human bocavirus (hBoV). The recognition of the importance of determining the etiologic agent of ARI in children is increasing because it allows the implementation of appropriate infection-control and, possibly, use of anti-viral therapy.

Objectives: the main objective of this work is to verify the presence of hMPV and hBoV in respiratory samples from children with symptoms of acute respiratory infection of the lower respiratory tract by molecular method. Also, verify its association with other respiratory pathogens, seasonal distribution, association with climatic variables and compare the methodology of real-time PCR with direct immunofluorescence (DIF) for identification of these others respiratory pathogens.

Methods: 455 samples were selected from children with symptoms suggestive of acute respiratory infection of the lower respiratory tract in the period May 2007 to June 2008. The presence of respiratory pathogens was analyzed by Real Time PCR and DIF.

Results: hMPV and hBoV were identified in the population analyzed in a prevalence of 14.5% and 13.2%, respectively. The overall prevalence of respiratory pathogens was 89.9% when analyzed by Real Time PCR and 78.7% for DIF. The kappa coefficient of agreement between the two methods was 0.241, showing low correlation and the index of coinfection identified by Real-time PCR was significantly higher than that found by DIF. Few measures of association were observed between the climatic variables and the pathogens tested, but a clear seasonal distribution was observed for most of the pathogens analyzed.

Conclusions: the two viruses studied are present in our environment, especially in the winter months, often associated with other respiratory pathogens. Regardless of the respiratory pathogen studied, the molecular approach was more effective for the identification of positive samples.

I. INTRODUÇÃO

1. Infecção Respiratória Aguda

A Infecção Respiratória Aguda (IRA) representa o maior problema de saúde pública no mundo devido a sua ampla distribuição, facilidade de disseminação na comunidade e elevada morbidade e mortalidade, especialmente entre pacientes pediátricos.^{1,2} A mortalidade resultante da IRA em indivíduos previamente saudáveis em países desenvolvidos é baixa, entretanto, em países em desenvolvimento estima-se que chegue a 5 milhões de crianças abaixo de 5 anos a cada ano, incluindo-se casos de pneumonia, bronquiolite e bronquite.^{1,3} A IRA acarreta elevados custos diretos e indiretos com assistência à saúde.² O impacto econômico anual nos Estados Unidos chega a 40 bilhões de dólares e hospitalizações somente por bronquiolite são estimadas em 300 milhões de dólares.⁴

Os vírus são responsáveis por 50 a 90% das infecções respiratórias agudas (IRAs) em crianças pequenas, sendo a maioria das infecções atribuídas ao vírus respiratório sincicial (VRS), vírus influenza A e B, vírus parainfluenza 1, 2 e 3, rinovírus e adenovírus.² Mais recentemente, novos agentes foram identificados e relacionados com IRA, como o metapneumovírus humano e bocavírus humano.

No Brasil, diversos trabalhos oriundos de diferentes localizações geográficas, confirmaram que os vírus são a principal causa de IRA, conforme os trabalhos de Arruda *et al.* (Fortaleza), Nascimento *et al.* (Rio de Janeiro), Miyao *et al.* e Vieira *et al.* (São Paulo) e Tsuchiya *et al.* (Curitiba)⁵ e Stralio *et al.* (Porto Alegre)⁶

A apresentação clínica da IRA viral é ampla e heterogênea, e varia desde um simples resfriado com congestão nasal e rinorréia, faringite e crupe até bronquiolite e pneumonia, dependendo principalmente da exposição prévia aos vírus e da idade da criança.^{1,3} A bronquiolite e a pneumonia são as duas manifestações graves mais comuns da IRA em crianças, podendo fazer parte do espectro de uma mesma patologia, frequentemente co-existindo e não claramente distinguíveis.⁷

1.1 Importância da Infecção Respiratória Aguda em Lactentes

Em média, a prevalência de IRA em crianças é duas a três vezes maior do que em adultos, sendo a infecção que mais acomete crianças previamente saudáveis.¹

Aproximadamente 3% de todas as crianças com menos de 1 ano de idade necessitam hospitalização por IRA moderada ou severa.⁷ Embora a IRA normalmente seja não complicada, o impacto cumulativo é considerável. A IRA do trato respiratório superior (TRS) ocorre entre 3 a 8 vezes ao ano em crianças e estima-se que entre 20

a 53% destas terão ao menos um episódio de IRA do trato respiratório inferior (TRI) no primeiro ano de vida.⁴

A bronquiolite é a IRA do TRI mais frequente no primeiro ano de vida. Nos Estados Unidos e Europa, as hospitalizações por bronquiolite chegam a 30 entre 1000 crianças nesta faixa etária.⁴

1.2 Aspectos Anatômicos

Diversos trabalhos demonstram alterações na função pulmonar de crianças hospitalizadas com IRA. Estas alterações incluem diminuição nas taxas de fluxo, aumento na resistência à inspiração e expiração e aumento no volume de ar torácico. Algumas destas alterações persistem por mais de 1 ano, porém normalmente retornam ao normal em torno de 1 mês após o evento.⁸

Alterações na função β -adrenérgica podem contribuir para a indução viral na função pulmonar. Por exemplo, os granulócitos de indivíduos asmáticos respondem menos aos estímulos por β -adrenérgicos, sugerindo uma interação entre os receptores deste sistema e a infecção respiratória viral.⁸

O dano viral também pode induzir a uma broncoconstrição pela alteração no metabolismo da substância P, um neuropeptídeo que contribui para o tônus bronco-motor.⁸

O pequeno calibre da via aérea presente nos lactentes é um dos principais responsáveis pelas manifestações clínicas associadas à doença. Nesta faixa etária tanto a traquéia quanto os brônquios principais são reforçados por placas de cartilagem envoltas por musculatura. No primeiro ano de vida, a musculatura lisa da via aérea se estende em espiral até os bronquíolos respiratórios, mais além do que é normalmente encontrado em pacientes de maior grupo etário. Outra consideração anatômica importante, diz respeito à circulação pulmonar. Enquanto o aporte sanguíneo para a via aérea é mantido pela circulação brônquica, a artéria pulmonar é responsável pela circulação pulmonar, fornecendo todo o suprimento sanguíneo envolvido nas trocas gasosas. Estas trocas são reguladas pela musculatura lisa vascular, que responde a modificações na concentração de oxigênio, para que a ventilação alveolar e a perfusão permaneçam balanceadas. Tanto na bronquiolite, quanto em outras doenças obstrutivas, podemos encontrar graves desequilíbrios na relação ventilação-perfusão que resultarão em piora da hipoxemia. Ainda nesta idade (lactentes), os espaços alveolares não estão completamente formados, e existem poucos poros e canais de ventilação colateral, responsáveis pela difusão gasosa entre um ácino e o outro. Por esta razão, a obstrução da via aérea, abaixo de dois anos de

idade, leva a colapsos segmentares da via aérea, ao contrário do que ocorre em pessoas mais velhas, capazes de manter o volume pulmonar pela difusão lateral.⁹

1.3 Aspectos Imunológicos

O sistema imunológico inato do trato respiratório compreende os componentes celulares e não celulares que limitam a disseminação de qualquer patógeno para o interior dos pulmões e ativam a resposta imune adaptativa para uma resposta específica.¹⁰

O sítio primário de infecção e defesa contra os vírus respiratórios que causam IRA é o epitélio respiratório do TRS. Os vírus causam dano neste epitélio por ação direta (principalmente aumento da permeabilidade ao antígeno, alterações na osmolaridade epitelial, diminuição na produção endógena de óxido nítrico e fatores broncodilatadores⁸) e necrose, ou indireta pela produção de resposta inflamatória, incluindo vários fatores que promovem o desenvolvimento das vias aéreas e alveolares.¹⁰ Por exemplo, o VRS ativa a via do fator de necrose tipo $\kappa\beta$. Este, por sua vez, induz quemoquinas, citocinas inflamatórias (CCL-5, CCL-2, CXCL-8 e CXCL-6) e fator de necrose tumoral que, conseqüentemente recrutam neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos.¹⁰ Os vírus promovem, ainda, inibição no gene supressor tumoral p53, o que causa uma regulação inibitória sobre o ciclo celular, prolongando sua sobrevivência nas células epiteliais e contínua replicação viral.¹⁰

Os linfócitos T têm sido relatados com importante papel na patogênese tanto de IRA em adultos como em crianças, particularmente na produção de citocinas.¹¹ Habitualmente, uma infecção viral induz uma resposta celular citotóxica, com linfócitos T auxiliares do tipo 1 (*T helper 1* - Th1), caracterizada por elevada produção de interferon-gama (IFN- γ). Porém, na bronquiolite viral aguda pelo VRS observa-se um desequilíbrio na relação entre esta resposta e a mediada por linfócitos T auxiliares do tipo 2 (*T helper 2* - Th2), com aumento da resposta destes últimos e/ou resposta Th1 deficiente.³ Os linfócitos Th1 secretam interleucinas tipo 2 (IL-2), interferon-gama e linfoxinas, enquanto que os linfócitos Th2 secretam interleucinas tipo 4 (IL-4), tipo 5 (IL-5), tipo 6 (IL-6) e tipo 10 (IL-10).⁸ A infecção por VRS durante a infância está associada a produção de Th2, que tem sido sugerida como fator de risco para o desenvolvimento não somente de asma mas também de sensibilização alérgica.¹¹

Mecanismos imunológicos podem atuar de modo antagônico, contribuindo para a gênese da sibilância associada à infecção viral. Por exemplo, a imunidade celular, ao mesmo tempo em que desempenha importante efeito protetor, pode levar a alterações permanentes. Enquanto a resposta celular intensificada é necessária para erradicar o vírus, paralelamente pode levar a danos nas vias aéreas, que podem

permanecer mesmo após a erradicação do agente agressor. Está bem estabelecido que há associação entre resposta celular exagerada e doença pulmonar grave com sibilância. Por outro lado, o leite humano pode conferir certo grau de proteção contra a sibilância, em particular a relacionada ao VRS. A neutralização da resposta linfoproliferativa ao VRS parece estar relacionada à IgA secretora e ao interferon alfa nele presentes.¹²

Parece que fatores genéticos e ambientais definem o tipo e a intensidade da resposta imune à infecção aguda pelos vírus respiratórios e estas repercutirão sobre os mecanismos de controle envolvidos no tônus muscular.¹² A hiperreatividade do epitélio pode se estender por até 6 a 7 semanas, com posterior normalização dos mecanismos de reparo.⁸

II. REVISÃO DA LITERATURA

1. Bronquiolite

1.1 Definição

O termo bronquiolite é uma descrição patológica que se tornou comum no diagnóstico clínico.¹³ É uma infecção respiratória aguda, de etiologia viral, que compromete as vias aéreas de pequeno calibre (bronquíolos), através de um processo inflamatório agudo, levando a um quadro respiratório do tipo obstrutivo com graus variáveis de intensidade. É caracterizada por edema e necrose das células epiteliais pequenas das vias respiratórias, aumentando a produção de muco e bronco-espasmo.¹⁴

Diversos estudos têm demonstrado uma ampla variação nos critérios diagnósticos e de tratamento da bronquiolite, demonstrando a ausência de um consenso em relação à definição do quadro clínico.¹³ A definição de bronquiolite como sendo o primeiro episódio de sibilância em crianças com menos de 2 anos de idade pode ser enganosa, principalmente por poder incluir alguns quadros de asma.¹³ No Reino Unido, o termo descreve uma doença que acomete crianças que se inicia no trato respiratório superior seguido com sinais de disfunção respiratória. Nos Estados Unidos e Europa, bronquiolite aguda é utilizada para descrever quadros de crianças com até 2 anos de idade apresentando sibilância associada à infecção do trato respiratório inferior.¹⁵ No Brasil, a maioria dos clínicos baseia seu diagnóstico de bronquiolite a partir de uma história de infecção de vias aéreas superiores, seguida de esforço respiratório e sibilância, em crianças menores de 12 meses de idade.³

A Academia Americana de Pediatras (AAP) recomenda a utilização somente de critérios clínicos para definição de bronquiolite.¹⁵ Embora a AAP não recomende a inclusão de exames radiológicos e laboratoriais para o diagnóstico, tradicionalmente, a pesquisa do agente viral é o critério mais difundido em nosso meio.

O grupo de risco para infecções severas são crianças com menos de 6 meses de vida, prematuras e aquelas com doença pulmonar crônica, insuficiência cardíaca congênita, doença neurológica e imunodeficiência. Os mecanismos que contribuem para a severidade da doença em cada grupo de risco ainda não estão totalmente entendidos, mas provavelmente estão relacionados a anormalidades nas respostas fisiológicas e imunológicas à infecção.

1.2 Manifestações Clínicas

Os sinais e sintomas típicos da bronquiolite são obstrução nasal, taquipnéia, dificuldade respiratória e sibilância. A doença severa é caracterizada pela persistência da dificuldade respiratória, apnéia, necessidade de hidratação intravenosa, oxigênio suplementar ou mecanismos de ventilação. Não está claro se a bronquiolite severa prematura predispõe à recorrência da doença ou se crianças com quadros mais complicados apresentam uma predisposição para recorrência.¹³

O pico da replicação viral acontece entre o quarto e quinto dia e a obstrução das vias aéreas e os sintomas típicos ocorrem oito a doze dias da infecção, quando a cascata inflamatória está bem estabelecida. A febre, quando persistente, costuma ser baixa. Dispnéia, tosse e utilização de musculatura acessória (subcostal, intercostal e supra-esternal), batimento das asas do nariz e dificuldade de mamar caracterizam o acometimento do TRI. A ausculta pulmonar se caracteriza por sibilos, aumento do tempo expiratório e crepitações.¹⁶

Os casos graves de bronquiolite que evoluem para insuficiência respiratória aguda estão associados à obstrução grave das vias aéreas de menor calibre, hipóxia moderada a grave e retenção de dióxido de carbono. A hipóxia é um dos principais sintomas da bronquiolite e evidente gravidade.¹⁶

1.3 Epidemiologia

A bronquiolite viral aguda é uma doença benigna. Entre os lactentes hígidos somente 0,5 a 2,0% necessitam hospitalização, dos quais 15% carecem de cuidados intensivos e destes somente 3 a 8% desenvolvem falência ventilatória.¹³

A taxa de mortalidade associada à bronquiolite nos Estados Unidos está em torno de 2 a cada 100.000 nascimentos vivos e vem se mantendo estável desde 1979.^{13, 16} Yanney *et al.* observaram uma taxa de mortalidade de 1% para crianças que não apresentam outro comprometimento e 3,5% para crianças com doença cardíaca ou pulmonar crônica.¹⁵

Existem poucos estudos epidemiológicos relacionados ao curso clínico da bronquiolite até o momento, ou mesmo quando existem, as diferenças na definição do quadro clínico causam dificuldades na comparação dos resultados.¹³

1.4 Distribuição Etária

Fatores de risco como a idade têm se mostrado relevantes para o aumento da incidência e/ou severidade das infecções respiratórias causadas pelos vírus em lactentes e crianças jovens.⁵

Alguns trabalhos têm mostrado que a distribuição etária dos pacientes difere de acordo com o tipo viral envolvido. Choi *et al.* relataram que IRA causada por VRS ocorre predominantemente em pacientes mais novos (média de 10 meses de idade) quando comparados a pacientes infectados por adenovirus, bocavirus humano, metapneumovirus humano ou influenza A. Já o rinovirus foi encontrado em uma proporção significativa de pacientes com menos de 3 meses de idade na comparação de pacientes com adenovirus. Este último, assim como metapneumovirus humano e influenza A foram encontrados em pacientes com mais de 24 meses de idade.¹⁷

De maneira geral, a bronquiolite é a principal doença do trato respiratório inferior do lactente, com pico de ocorrência aos dois meses de idade.³

1.5 Etiologia

As infecções virais sempre impuseram enormes dificuldades para saúde humana e seu conhecimento ainda permanece incompleto. Devido à natureza da infecção viral, a maioria dos estudos limita-se a investigar somente os vírus conhecidos e o descobrimento de novos agentes e seus sintomas clínicos permanecem raros.¹⁸

Em torno de 15 a 35% dos casos de bronquiolite e pneumonia em pacientes pediátricos permanecem com etiologia desconhecida, sugerindo que outros agentes possam existir e ainda permaneçam não identificados.¹⁹ Em um estudo realizado na Austrália, em torno de 40% dos pacientes com IRA apresentaram um agente etiológico desconhecido.²⁰

O VRS está presente em torno de 70% dos pacientes com bronquiolite. Outros vírus também estão normalmente associados à doença, como os vírus influenza, parainfluenza, rinovirus e adenovirus.¹³ Com a introdução de técnicas moleculares mais sensíveis, novos agentes virais têm sido descobertos, entre eles o metapneumovirus humano e bocavirus humano.⁴ Em um estudo prospectivo com 772 crianças com sintomas de IRA admitidas em um hospital de Viena, foram detectadas infecções únicas em 57% dos pacientes, e infecções com dois agentes virais em 20%, principalmente com a associação entre VRS, adenovirus e rinovirus.¹³ Mesmo tendo sido descoberto a pouco tempo, Yanney *et al.* apontaram o metapneumovirus humano como segundo agente etiológico mais importante como causa de bronquiolite.¹⁵

O papel de cada um destes agentes infecciosos como causadores de bronquiolite ainda não está precisamente definido, pois a maioria dos estudos realizados até o momento não têm considerado todos os patógenos em conjunto. Especificamente, ainda não estão claros quais são os agentes responsáveis pela IRA

severa que requer hospitalização ou que são importantes em crianças predispostas à IRA recorrente. A definição do papel de cada patógeno parece ser importante principalmente em crianças com menos de 1 ano de idade porque a IRA neste estágio normalmente requer hospitalização e está associada a futuros episódios.²¹

Mesmo a bronquiolite sendo considerada fundamentalmente de etiologia viral, a infecção por *Bordetella pertussis* eventualmente pode ser confundida com os sintomas da bronquiolite.¹

1.6 Patofisiologia

Independentemente do agente etiológico, o vírus coloniza o epitélio do trato respiratório e replica causando necrose epitelial e destruição dos cílios. As células epiteliais destruídas desencadeiam uma resposta inflamatória com infiltrado celular tanto neutrofílico quanto linfocítico com conseqüente edema da submucosa. Também há aumento da secreção de muco das células caliciformes, que se combina com o epitélio descamado para formar muco espesso. Este muco causa obstrução dos bronquíolos, o que resulta em bloqueio para passagem do ar e colapso lobular em vários graus. Essa alteração na perfusão da ventilação resulta em hipóxia. A mucosa do trato respiratório lesada pela necrose expõe os receptores do sistema nervoso autônomo, o que parece ser responsável pela estimulação dos receptores parassimpáticos levando à broncoconstrição.¹⁵

Quadros mais graves podem apresentar insuficiência ventilatória, com importante hipoxemia, retenção de CO₂ e acidose respiratória. Em casos não complicados, o epitélio bronquiolar regenera em três a quatro dias, porém, este tempo pode se prolongar, por duas ou mais semanas.³

A patogênese da bronquiolite viral depende tanto do efeito citopatológico direto do vírus como também da resposta inflamatória do hospedeiro. Ambos os fatores combinados induzem a patologia do TRI e os sinais e sintomas da doença.²²

1.7 Distribuição Sazonal

De maneira geral, qualquer infecção respiratória viral apresenta distribuição sazonal, especialmente em climas temperados, e o pico de incidência varia de ano para ano. O VRS e o vírus influenza apresentam maior incidência durante os meses de inverno e normalmente não são coincidentes, porém com sobreposição nas curvas de distribuição. Já os vírus parainfluenza 1 e 2 apresentam maior incidência no outono e início do inverno, enquanto o parainfluenza 3 somente no inverno. O rinovírus é mais

comum no inverno e primavera e o adenovirus apresenta mesma distribuição durante todo ano.¹

Neste sentido, a bronquiolite viral aguda é uma doença com padrão de distribuição sazonal. Em países com clima temperado, normalmente apresenta maior prevalência nos meses de outono e inverno. Entretanto, em climas semi-tropicais e tropicais, distribui-se de forma regular, com pouca influência da sazonalidade.²³

No Brasil, devido a sua abrangência continental, o perfil de circulação dos vírus respiratórios é diferente de acordo com as regiões analisadas. Em regiões tropicais como Salvador, os vírus respiratórios foram detectados principalmente na temporada de chuvas.²⁴ Em regiões subtropicais, como São Paulo e Porto Alegre, a maior prevalência viral ocorreu nos meses mais frios do ano.²⁵ Em um trabalho realizado em Uberlândia, Minas Gerais, Costa *et al.*, analisando crianças com IRA, verificaram uma maior prevalência viral durante os meses frios e secos entre os anos de 2001 e 2004. Esta região apresenta clima semi-tropical, caracterizado-se por alternância entre invernos secos e levemente úmidos e verões chuvosos.⁵

1.8 Tratamento

O manejo da bronquiolite varia bastante entre os diversos centros ao redor do mundo, e mesmo dentro de cada país. Existe muita controvérsia, confusão e ausência de evidências em relação ao melhor tratamento. Os ensaios clínicos envolvendo pacientes com bronquiolite têm sido criticados por serem muito pequenos e com seguimentos curtos.¹³

Os quadros leves e moderados são frequentemente tratados em casa, sendo importante a garantia de uma boa hidratação, do controle da febre e observação da equipe médica. Em virtude da frequência respiratória elevada, costuma-se recomendar uma dieta fracionada e com volumes reduzidos.¹⁴

Cerca de 1 a 2% das crianças com menos de um ano de idade podem necessitar hospitalização. O tratamento hospitalar está indicado para crianças com sofrimento respiratório significativo, apresentando dificuldade para se alimentar, hipoxemia progressiva e possibilidade de fadiga respiratória.¹⁴

Eventualmente, broncodilatadores são prescritos nos Estados Unidos e Europa. Uma revisão sistemática com 394 crianças mostrou que broncodilatadores estão associados a um significativo aumento dos escores clínicos, embora exista uma recomendação da AAP em relação a sua não utilização. A nebulização de epinefrina também é uma medida comum em emergências, assim como corticosteróides sistêmicos.¹³ Em uma metanálise, King *et al.* observaram que a taxa de hospitalização

após o uso destas medidas não foi reduzida significativamente.²⁶ Além disso, não existem evidências objetivas em relação às vantagens do uso de ribavirina, imunoglobulina, vitamina A, interferon e eritropoietina. Medidas de suporte como oxigênio e estratégias de reposição de fluido ainda também não foram validadas.^{13, 26}

A única recomendação da AAP em relação ao manejo da bronquiolite consiste em hidratação, oxigênio suplementar e ventilação mecânica quando necessária.²⁶

A utilização de terapia antibacteriana somente deve ser utilizada em crianças nas quais exista indicação específica de co-infecção bacteriana. Quando presente, a bronquiolite deve ser tratada da mesma forma que na sua ausência. O suplemento de oxigênio é indicado somente se a pressão de oxigênio cair abaixo de 90% em crianças previamente saudáveis.²⁷

2. Sibilância Recorrente

Diversos estudos indicam que em torno de 50% das crianças hospitalizadas com bronquiolite devido a infecções virais, especialmente VRS, apresentam quadros de sibilância recorrente. Estes episódios normalmente desaparecem em torno dos 3 a 4 anos de idade.²⁸

Sibilância recorrente é definida como a manifestação de pelo menos três episódios de sibilância após um quadro de bronquiolite viral aguda. Quando acomete crianças menores de dois anos de idade são denominados “lactentes sibilantes”.²⁹

A incidência da síndrome do lactente sibilante é difícil de ser estabelecida. Admite-se que pelo menos 20% das crianças menores de dois anos de idade apresentam sibilância transitória, estando relacionado ao tamanho das vias aéreas, à coexistência de infecções virais das vias aéreas superior, à exposição passiva ao tabagismo materno e fatores genéticos. Acredita-se que um terço dos que iniciaram a sibilância antes dos três anos de idade com ela persistirão e, dentre estes, 60% se manifestarão atópicos aos seis anos de vida.²⁹

A elevada frequência destas alterações sugere que exista uma forte relação entre bronquiolite e sibilância recorrente. O fator mais importante é saber se os vírus são responsáveis pelo curso clínico ou meramente marcadores de predisposição para crises de sibilância. O interesse em esclarecer esta questão reside na possibilidade de emprego de terapêutica adequada. Caso a bronquiolite viral predisponha ao desenvolvimento de sibilância recorrente, justificaria-se a utilização de medicação para diminuir o processo inflamatório e, conseqüentemente, contribuir para diminuição dos episódios de sibilância. Ao contrário, se os vírus forem simples marcadores presentes

em crianças com sibilância recorrente, a identificação precoce deste pacientes tornaria-se importante para o aconselhamento e manejo.²⁸

De fato, alguns trabalhos demonstram que existe uma associação entre bronquiolite viral e sibilância recorrente. Esta associação não depende da gravidade da infecção, uma vez que foi evidenciada em pacientes hospitalizados e ambulatoriais. Algumas hipóteses explicam esta associação:

- a) A infecção respiratória severa – tendo bronquiolite como manifestação clínica – ocorre em indivíduos que apresentam uma predisposição, sendo responsável pelos sintomas subsequentes;
- b) A infecção viral nos estágios iniciais da vida causa danos aos pulmões imaturos ou altera a resposta imunológica, contribuindo diretamente para sibilância recorrente.²⁸

A importância de se investigar os pacientes com sibilância recorrente reside no fato de apresentarem elevado risco de desenvolvimento de asma persistente ao atingirem a adolescência. Assim, os diferentes fenótipos de sibilância e sua expressão futura de asma tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores.²⁹

O Consenso PRACTALL, documento conjunto elaborado por especialistas das Academias Européia e Americana de Asma, Alergia e Imunologia, recentemente publicado, descreve quatro padrões distintos de sibilância durante a infância, assim como sua evolução.²⁹ São eles:

a) sibilância transitória (sibilos durante os dois a três primeiros anos de vida e não mais após essa idade):²⁹ geralmente associados aos processos infecciosos de etiologia viral. Este grupo tem como uma de suas características a exposição ao tabaco, alterando o desenvolvimento pulmonar fetal, resultando em diminuição do calibre das vias aéreas e maior possibilidade de aparecimento de sintomas em situações onde há processo inflamatório das vias aéreas inferiores, como nas infecções virais;³⁰

b) sibilância não-atópica²⁹ (crianças com histórico de sibilância nos primeiros anos de vida e cuja sintomatologia marcadamente está relacionada a um primeiro episódio de bronquiolite viral aguda): tende a desaparecer com o avançar da idade;³⁰

c) asma persistente (crises iniciam no primeiro ano de vida e se mantêm até pelo menos a idade escolar)³⁰: caracterizada por sibilância associada a um dos seguintes itens:

- manifestações clínicas de atopia: eczema; rinite e conjuntivite; alergia alimentar; eosinofilia e/ou níveis séricos elevados de imunoglobulina E (IgE) total;

- sensibilização comprovada pela presença de IgE específica a alimentos na infância precoce e a seguir IgE específica a aeroalérgenos;

- sensibilização a aeroalérgenos antes dos três anos de idade especialmente se exposto a níveis elevados de alérgenos perenes no domicílio;

- ter pai e/ou mãe com asma.²⁹

d) sibilância intermitente grave (episódios pouco frequentes de sibilância aguda associados a poucos sintomas fora dos quadros agudos e com a presença de características de atopia: eczema; sensibilização alérgica; e eosinofilia em sangue periférico)²⁹

Além da simples caracterização clínica desta classificação de fenótipos de sibilância, é possível estabelecer o valor prognóstico de cada uma delas. Os tipos “a” e “b”, em geral, são de evolução benigna e confirmação retrospectiva.²⁹

A maior suscetibilidade às infecções virais acontece justamente na fase de lactente, quando há um grande crescimento das vias aéreas e multiplicação alveolar. Durante o processo infeccioso são liberados mediadores que podem afetar o processo de reparação dos pulmões ainda em crescimento e determinar sequelas na função pulmonar a longo prazo.³⁰

2.1 Evolução Clínica da Sibilância

Na análise de um conjunto de trabalhos, foi observado que 42 a 71% das crianças com bronquiolite viral por VRS apresentaram quadros de sibilância recorrente até os 6 a 10 anos de idade. Com exceção de um trabalho, foi demonstrado que as alterações nos testes para avaliação da função pulmonar persistiam muitos anos após o evento de bronquiolite.²⁸ Em um estudo prospectivo, Stein *et al.* acompanharam crianças com menos de 3 anos apresentando quadros de infecção viral do TRI até 13 anos de idade. Comparativamente às crianças saudáveis, estas apresentaram 3 a 4 vezes mais chance de desenvolver sibilância recorrente. Esta associação foi mais significativa para VRS, porém também apresentou significância para os vírus influenza, adenovirus e rinovirus.³¹

Três metanálises, incluindo 22 trabalhos, procuraram a associação entre bronquiolite e sibilância recorrente subsequente. Na primeira revisão em 2000, Bont *et al.* incluíram 13 estudos prospectivos com um total de 1.161 crianças com menos de 2 anos de idade. Em 11 dos 13 estudos, encontraram uma forte associação entre as duas patologias.³² Resultados semelhantes foram observados em um pequeno sub-grupo do coorte de Tucson em 2007.³³

Em 2001, em um estudo prospectivo, realizado na Holanda, com duração de um ano, foi observado uma incidência de 47% de sibilância recorrente após o evento agudo de bronquiolite por VRS.³⁴ Já em um estudo longitudinal realizado na Suécia no qual foram avaliadas 47 crianças após hospitalização devido a bronquiolite viral aguda pelo VRS, além de 93 controles, a asma (definida como “três ou mais episódios de sibilância verificados por um médico”) foi mais frequente no grupo VRS em todos os períodos de análise.³⁵

Devido à falta de consenso quanto à definição de sibilância recorrente após bronquiolite viral aguda e dada a semelhança desta com os sintomas de asma brônquica, persiste uma confusão em relação a estes dois termos.^{3 10}

3. Bocavirus humano

3.1 Aspectos Gerais

Bocavirus humano (hBoV) foi descrito pela primeira vez em 2005 por Tobias Allander *et al.*, detectado predominantemente em pacientes com IRA. Desde sua descoberta, a presença mundial do hBoV foi confirmada em mais de 120 trabalhos. Entretanto, sua associação com IRA ainda não é clara, pois na maioria dos estudos de prevalência foi detectado um elevado número de co-infecções com outros vírus respiratórios.³⁶ Devido ao fato do hBoV ter sido inicialmente detectado em amostras de pacientes com IRA, sugere-se que ele desempenhe um papel importante nas infecções do trato respiratório.³⁷ As células do hospedeiro nas quais o hBoV replica ainda não estão bem determinadas, porém vários estudos têm encontrado a presença de cópias do DNA viral em secreções do trato respiratório.³⁶

Os trabalhos que indicam uma associação entre IRA e infecção por hBoV, mostram o predomínio de casos de bronquiolite, bronquite, pneumonia e exacerbação dos sintomas em quadros de asma.^{18, 38-40}

3.2 Classificação Taxonômica

O hBoV é um membro da família *Parvoviridae* (sub-família *Parvovirinae*, gênero *Bocavirus*). Até sua identificação, o único patógeno humano desta família era o

parvovirus humano B19. O hBoV recebeu esta nomenclatura devido a sua estrutura genômica apresentar similaridade aos gêneros parvovirus bovino e vírus minute canino.³⁶

3.3 Biologia

Os membros da família *Parvoviridae* são vírus pequenos e não-envelopados. Apresentam nucleocapsídeo com diâmetro entre 18 a 26 nm que contém uma fita simples de DNA. O genoma completo apresenta aproximadamente entre 4000 a 6000 nucleotídeos e contém três quadros de leitura abertos (*ORF – Open Reading Frames*) que codificam duas proteínas não estruturais (NS1 e NP1) e duas proteínas do capsídeo viral (VP1 e VP2). Acredita-se que a proteína NS1 apresente papel importante na replicação viral. A heterogeneidade gênica das regiões VP1 e VP2 é bem maior do que as das regiões NP1 e NP2, sendo as duas primeiras preferidas para as análises filogenéticas do vírus.⁴¹ Apesar destas pequenas variações, o hBoV é considerado um vírus conservado.⁴² Na figura 1 é possível a visualização da organização gênica completa do vírus.

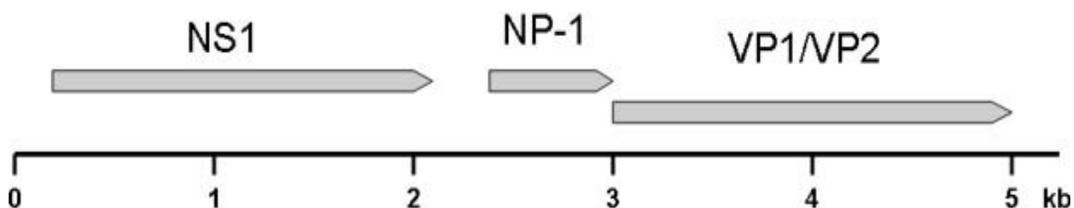


Figura 1: Organização gênica de um isolado ST1 de hBoV. As setas representam as três ORF: NS1 (1920 nucleotídeos); NP1 (660 nucleotídeos); VP1/VP2 (2016 nucleotídeos). Adaptado de Allander *et al.*, 2005.¹⁸

3.4 Bocavírus humano e Infecção Respiratória Aguda

Até o momento, 5 estudos incluíram grupos controles de crianças assintomáticas para comparação com aquelas que apresentavam sintomas de IRA. Todos encontraram diferenças significativas entre os grupos. É importante ressaltar que nestes trabalhos, o tipo de amostra coletada variou bastante, com um impacto desconhecido nos resultados.³⁶ Kesebir *et al.* detectaram hBoV em 22 dos 245 aspirados de nasofaringe de crianças com sintomas de IRA e em nenhuma em crianças assintomáticas.⁴³ Allander *et al.* não encontraram nenhum caso positivo de hBoV nas 64 crianças assintomáticas quando comparadas com os 19% das crianças com sintomas de IRA.⁴⁴ No único estudo em que as amostras foram coletadas da

mesma maneira nos dois grupos, Fry *et al.* avaliaram 1.168 pacientes com pneumonia e sintomas característicos de infecção por vírus influenza, comparando-os com 280 crianças assintomáticas. A prevalência do hBoV foi de 2% no grupo assintomático, significativamente diferente do grupo sintomático, sendo este trabalho considerado o mais robusto até o momento.⁴⁵ O trabalho que obteve a maior prevalência de hBoV em crianças assintomáticas foi realizado na Espanha em 2007 por Garcia-Garcia *et al.*, no qual o vírus foi detectado em 5% das crianças. Entretanto, outros vírus, sabidamente relacionados à IRA também foram descritos nesta população, como rinovírus (9%) e adenovírus (4,3%). Ressalta-se que algumas crianças referidas como assintomáticas, desenvolveram sintomas relacionados à IRA antes ou posteriormente ao estudo, indicando que o vírus pode estar presente em baixas concentrações de indivíduos assintomáticos.⁴⁶

Como mencionado anteriormente, o principal problema em relação aos estudos comparando a prevalência viral em amostras do trato respiratório de indivíduos sintomáticos e assintomáticos é a diferença em relação à metodologia de coleta de amostras. Um processo inflamatório produz secreção rica em muco facilmente obtida, enquanto que em indivíduos assintomáticos a secreção é rara ou mesmo inexistente. Em função disto, resultados de comparação entre estes dois grupos devem ser vistos com extremo cuidado.³⁶

Em contrapartida, diversos estudos apontam o hBoV como agente etiológico de IRA. Allander *et al.*, utilizando critérios moleculares para determinação de casualidade, elencaram diversos pontos que podem ser um indicativo do papel do hBoV em pacientes com IRA:

1. O hBoV está presente no sítio dos sintomas (trato respiratório);
2. O hBoV é mais prevalente em pacientes com IRA do que em pacientes assintomáticos;
3. Esta associação foi verificada somente em pacientes com elevada carga viral, ou seja, é “dose-dependente”. A infecção com baixas cargas virais sugere a persistência do agente após recuperação clínica.⁴⁴

Arnold *et al.* propuseram a associação entre a detecção do hBoV com infecção do trato respiratório inferior e superior de crianças. Os pesquisadores demonstraram que a presença de hBoV estava associada a casos de asma, otite média, pneumonia e bronquiolite.⁴⁷

3.5 Co-infecções com Bocavirus humano

O fato do hBoV estar presente em pacientes infectados com outros vírus respiratórios tem tornado difíceis as conclusões em relação a sua patogenicidade.³⁷ Atualmente, o hBoV tem sido detectado juntamente com outros patógenos respiratórios em 33 a 56% dos casos de infecções respiratórias.⁴⁴

Os resultados de Schildgen *et al.* mostram uma frequência de co-infecção de 36%.³⁶ Manning *et al.* detectaram pelo menos um outro vírus respiratório em 43% das amostras positivas para hBoV, enquanto que a prevalência de co-infecção em amostras negativas foi de 17%.³⁸ Uma explicação para esta amplitude de resultados é a não padronização da identificação viral. Além disso, diferenças nas sensibilidades entre os métodos devem ser consideradas.³⁶

Em um dos poucos estudos que avaliaram os impactos sócio-econômicos da infecção por hBoV, Esposito *et al.* selecionaram 1332 crianças com sintomas de infecção aguda em geral admitidas em um serviço de emergência. A infecção única por hBoV parece ser mais leve quando comparada com pacientes que apresentavam outros vírus respiratórios, considerando desta maneira o hBoV como agente marginal em relação aos impactos clínicos e sócio-econômicos das crianças infectadas, estando relacionado somente a IRA e sintomas gastrointestinais.⁴⁸

3.6 Epidemiologia

Diversos estudos demonstram que o hBoV está amplamente distribuído em todo mundo. Já foi detectado em vários países, incluindo Suécia, Austrália, Estados Unidos, Japão, Alemanha, África do Sul, França, Canadá, Espanha, Iran, Jordânia, Holanda, Coréia do Sul, China, entre outros.³⁶ Os trabalhos que avaliaram a presença do vírus na América do Sul, especialmente no Brasil, são raros.

Baseado na análise filogenética, o hBoV presente nos diferentes países é composto de uma única linhagem com dois subtipos distintos.³⁶

3.7 Prevalência do Bocavirus humano

A prevalência do hBoV em amostras respiratórias de indivíduos sintomáticos tem variado entre 1,5 e 19%. A maioria das crianças infectadas é menor de 24 meses, porém o vírus já foi encontrado também em crianças mais velhas. Existem poucos estudos sistemáticos envolvendo adultos, porém os dados disponíveis indicam uma baixa prevalência.³⁶

Conforme previsto, a maioria dos estudos inclui crianças hospitalizadas apresentando sintomas severos de IRA. Na tabela 1, é possível observar os resultados dos principais estudos realizados até o momento.

Tabela 1: Prevalência de hBoV de 6 estudos realizados mundialmente

Estudo	Local	Número de amostras (aspirado de nasofaringe)	Positividade hBoV (%)
Allander <i>et al.</i> , 2005 ¹⁸	Suécia	540	3,1
Arnold <i>et al.</i> , 2006 ⁴⁷	Estados Unidos	1474	5,6
Bastien <i>et al.</i> , 2006 ⁴⁰	Canadá	1209	1,5
Foulongne <i>et al.</i> , 2006 ⁴⁹	França	589	4,4
Kaplan <i>et al.</i> , 2006 ⁵⁰	Jordânia	312	18,3
Kleines <i>et al.</i> , 2007 ⁵¹	Alemanha	94	12,8

3.8 Sazonalidade

De acordo com os dados disponíveis na literatura, o pico de distribuição das infecções respiratórias varia de ano para ano. Dessa maneira, não é fácil estabelecer a distribuição sazonal de um novo vírus baseado somente na avaliação de um ano.³⁶ Diferentes autores têm demonstrado, em países de clima temperado, uma elevada prevalência de hBoV durante os meses de inverno e primavera.^{18, 52} Esses resultados são reforçados por Kesebir *et al.*⁴³ Entretanto, na avaliação global dos diversos trabalhos já publicados, não existe uma distribuição regular sazonal do hBoV.³⁷ Pozo *et al.* encontraram hBoV ao longo de todo ano, com um perfil epidemiológico semelhante ao adenovírus e rinovírus.⁵³ Em 2006, Arnold *et al.* detectaram hBoV em 5,6% das crianças com IRA, com pico de prevalência de infecção na primavera.⁴⁷ A ausência de um padrão no perfil sazonal do vírus indica que outros fatores, além dos geográficos, possam desempenhar um papel importante na distribuição do vírus.

3.9 Transmissão

Não se conhece nada até o momento em relação às vias de transmissão do hBoV. Mecanismos tradicionais como contato direto, contato com superfícies e auto-inoculação certamente desempenham papel importante como em qualquer outra infecção respiratória. Em função de alguns trabalhos terem encontrado o vírus nas fezes, a via fecal-oral também deve ser considerada.

Nenhum estudo avaliou ainda a tenacidade do vírus em relação aos desinfetantes comuns utilizados nos hospitais. Em função de outros parvovirus serem resistentes aos desinfetantes, é importante realizar esta avaliação em modelos culturais e animais.³⁶

Até o momento, somente três autores relataram casos de transmissão nosocomial causada por hBoV em crianças com mais de 1 mês de idade. Bastien *et al.* relataram transmissão nosocomial em 12 crianças, e o vírus foi detectado mais do que 10 dias após a admissão hospitalar.⁴⁰ Weissbrich *et al.* também demonstraram a existência de infecção nosocomial em 3 pacientes que desenvolveram sintomas durante o período de hospitalização realizado por motivos não respiratórios.⁵⁴ Finalmente, Kesebir *et al.* publicaram o relato de uma série de casos no qual também está evidente o mecanismo nosocomial de transmissão.⁴³

3.10 Sintomas Clínicos

Os sintomas clínicos mais comuns associados à infecção por hBoV são chiado, rinorréia e febre, ou seja, sintomas não-específicos e comuns a maioria das infecções respiratórias virais em crianças. Os sintomas observados persistem entre 1 a 2 semanas.³⁶ Nos diversos trabalhos, a obstrução respiratória parece ser o sintoma mais característico da infecção pelo hBoV.³⁷

Allander *et al.* demonstraram a incidência de 42% de otite em pacientes infectados pelo hBoV.¹⁸ Os fatores de risco para severidade dos sintomas parecem ser similares aos do VRS (prematuridade, doença cardíaca congênita e asma).⁵⁵

A possibilidade do hBoV, assim como o bocavirus canino e bovino, causarem gastroenterites tem sido considerada. Sintomas gastrointestinais já foram relatados em até 25% dos pacientes com IRA, porém os resultados têm variado bastante.³⁶ Lee *et al.* encontraram hBoV em somente 0,8% das 942 amostras de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda.⁵⁶ Vicente *et al.* também investigando pacientes com quadros agudos de gastroenterite encontraram 9,1% de positividade para hBoV.⁵⁷ Albuquerque *et al.* relataram a detecção de hBoV em crianças brasileiras com gastroenterite na ausência de sintomas respiratórios.⁵⁸ Deve ficar claro que diarréia é um sintoma comum associado à resposta sistêmica à infecção e que a presença do hBoV não pode ser automaticamente relacionado como agente de gastroenterites.³⁷

4. Metapneumovirus humano

4.1 Aspectos Gerais

Em 2001, van den Hoogen *et al.* detectaram um novo agente viral em secreção respiratória que estaria relacionado ao pneumovirus aviário sendo chamado de metapneumovirus humano (hMPV). A partir de então, diversos trabalhos têm indicado o hMPV como um patógeno respiratório.⁵⁹ Foi inicialmente isolado em cultura celular de amostras respiratórias demonstrando a formação de um sincício seguido de rápida destruição interna da célula, em torno de 10 a 14 dias após a inoculação.⁶⁰

Alguns estudos indicam que o hMPV não é um patógeno novo, visto que evidências sorológicas de infecção humana datam de 1958 na Holanda.⁶¹

4.2 Classificação Taxonômica

O hMPV é membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Metapneumovirus*, sendo considerado o primeiro patógeno humano deste gênero.⁶² O VRS e o vírus parainfluenza também pertencem a esta família, sendo o VRS o patógeno humano mais relacionado ao hMPV.⁵⁹

4.3 Biologia

O hMPV é constituído de uma fita simples de RNA com mais ou menos 13 Kb que contém ORFs que codificam três glicoproteínas do envelope viral, gene F (*fusion*), gene G (*attachment*) e SH (*short hydrophobic*). O gene F é o mais conservado, apresentando 33% de homologia entre hMPV e VRS. A principal diferença entre o hMPV e VRS é a ausência de dois genes não estruturais (NS – *nonstructural*), NS1 e NS2 no hMPV, além da ordem gênica alterada, conforme visualizado na figura 2.^{19, 59} É um vírus pleomórfico, filamentosos e esférico, com diâmetro de 209 nm.¹⁹

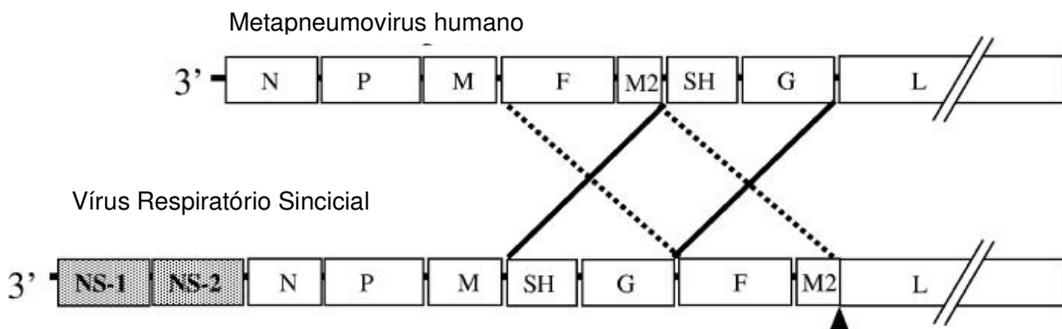


Figura 2: Organização gênica do hMPV. Na primeira linha, o genoma do hMPV e na segunda linha, o genoma do RSV, demonstrando a translocação entre arranjos gênicos entre os dois vírus. Adaptado de Kahn *et al.*, 2006.⁵⁹

4.4 Metapneumovirus humano e Infecção Respiratória Aguda

Diversos estudos têm demonstrado que o hMPV é responsável por uma elevada proporção de casos de IRA do TRI em crianças com idade abaixo de 5 anos. A incidência estimada varia entre 5 e 15% na maioria dos estudos, porém taxas mais altas já foram relatadas. Infecções assintomáticas com presença de hMPV parecem ser incomuns.⁵⁹ Williams *et al.* avaliaram crianças com menos de 5 anos de idade e observaram a associação de coriza, conjuntivite, faringite e otite média com infecção por hMPV.⁶³ Os índices de infecção por hMPV em adultos são menores dos que os observados em crianças, porém ocorrem em todas as faixas etárias. Falsey *et al.* detectaram o vírus em 3,4% do adultos com IRA.⁶⁴

A associação entre infecção por hMPV e IRA no trato respiratório inferior é uma frequente causa de hospitalização, com taxas em torno de 10% dos pacientes infectados. Os diagnósticos mais comuns nas crianças com menos de 5 anos de idade são bronquite, pneumonia e bronquiolite. Os riscos associados à severidade da infecção são os mesmos observados nos pacientes infectados por hBoV. O papel do hMPV na iniciação e progressão da asma ainda permanece controverso.⁵⁹

A infecção por hMPV parece ser rara tanto em crianças como e adultos assintomáticos.^{65, 66} Williams *et al.* encontraram somente 1 caso de infecção por hMPV em 86 crianças avaliadas sem sintomas de infecção respiratória.⁶⁵ Heikkinen *et al.* avaliaram uma coorte de 1458 crianças, das quais nenhuma sem sintoma de IRA apresentou positividade para hMPV.⁶⁷

4.5 Co-infecção

Diversos estudos têm demonstrado uma taxa de co-infecção em torno de 10% e ainda divergem quanto sua associação com a infecção por VRS.⁵⁹ Em alguns trabalhos, o nível de co-infecção tem variado até 44,3%.⁶⁸ A co-infecção entre hMPV e VRS parece indicar quadros de IRA severa.⁶² Um estudo realizado por Semple *et al.* demonstrou que a co-infecção entre hMPV e VRS está associada à bronquiolite severa e aumento no risco de admissão hospitalar em unidades de terapia intensiva.⁶⁹ Assim como para o VRS, co-infecção entre hMPV e bactérias parece ser raro⁷⁰, porém há alguns relatos de infecção entre vírus respiratórios e bactérias causadoras de infecções respiratórias tradicionais, como *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis* e *Mycoplasma pneumoniae*.⁷¹

4.6 Epidemiologia

O hMPV apresenta uma distribuição global, tendo já sido descrito em todos os continentes. Baseado na análise filogenética existem dois genótipos principais, A e B, que normalmente circulam ao redor do mundo. A organização genômica destes dois genótipos é idêntica, diferindo apenas por alguns polimorfismos nas proteínas G e SH. Ao contrário do que acontece com o vírus influenza, no qual duas ou três cepas circulam ao redor do mundo, a infecção por hMPV parece ser um fenômeno local, diferindo minimamente de comunidade para comunidade.⁵⁹ Em um trabalho realizado na região de Campinas, o subtipo mais prevalente foi o B.⁷² Alguns autores têm sugerido que o genótipo B seria mais patogênico, porém outros dados apontam no sentido de não haver diferença em relação à severidade da doença.⁷³ Contrariamente, Vicente *et al.* atribuíram maior virulência ao genótipo A em relação ao B, devido a diferenças entre as proteínas virais destes dois sorotipos.

Além disso, parece que a infecção por um genótipo confere proteção futura para possíveis contaminações com outro genótipo.⁷⁴

4.7 Prevalência do Metapneumovirus humano

A infecção por hMPV corresponde entre 2 a 12% dos casos de IRA em crianças e um percentual muito menor em adultos.^{60, 62} Entretanto, em um estudo na Itália, a prevalência de hMPV chegou a 43%.⁷⁵ A prevalência em crianças e adultos assintomáticos é significativamente menor do que em crianças com IRA.¹⁹

Num dos poucos trabalhos realizados no Brasil, o hMPV foi encontrado em 6,4% das crianças com IRA.⁷⁶ Em outro trabalho, Silva *et al.* encontraram uma prevalência de 5,6% em crianças hospitalizadas com IRA.⁷²

A incidência da infecção do hMPV tem variado entre os diferentes trabalhos, conforme tabela 2.

Tabela 2: Prevalência de hMPV de 5 estudos realizados mundialmente

Estudo	Local	Número de amostras (aspirado de nasofaringe)	Positividade hMPV (%)
Biovin <i>et al.</i> , 2003 ⁷⁷	Canadá	208	5,8
van den Hoogen <i>et al.</i> , 2001 ⁶¹	Holanda	68	10,0
Freyemouth <i>et al.</i> , 2003 ⁷⁸	França	337	6,6
Falsey <i>et al.</i> , 2003 ⁷⁹	Estados Unidos	984	4,5
Viazov <i>et al.</i> , 2003 ⁸⁰	Alemanha	63	17,5

4.8 Sazonalidade

O hMPV tem sido identificado principalmente nos meses de inverno e primavera e o pico de sua atividade coincide com a do VRS.⁵⁹ No Brasil, estes dados foram confirmados por Debur *et al.*⁷⁶ e Thomazelli *et al.*² A distribuição sazonal do vírus sugere a presença de um reservatório para os períodos inter-epidêmicos. Entretanto, até o momento, não existe nenhum estudo em relação à latência ou persistência do vírus em humanos.⁸¹

Hamelin *et al.* relataram que surtos de hMPV ocorrem no início da primavera, com duração de 4 a 6 semanas, pouco depois dos surtos comuns de VRS, que apresentam duração um pouco mais estendida.¹⁹

No Brasil, a presença do vírus foi diagnosticada durante o ano todo no estado do Sergipe, caracterizado pelo clima tropical. Porém, estudos mais longos não foram realizados para esclarecer a época de maior transmissibilidade do vírus.

4.9 Patogênese

Trabalhos utilizando modelos animais indicam que o pico da replicação viral acontece entre 4 e 5 dias após a inoculação do vírus. Uma significativa inflamação pulmonar foi observada com presença de alveolite e peribronquiolite. Em humanos, parece ocorrer liberação de interleucina 8, embora em menores concentrações daquelas observadas na infecção por VRS.⁸²

4.10 Sintomas Clínicos

Os sintomas clínicos da infecção por hMPV não diferem daqueles de outros vírus que causam IRA tanto no TRS quanto TRI.⁶² Dependendo da severidade da infecção, as crianças infectadas normalmente apresentam rinorréia, tosse, taquipnéia,

obstrução respiratória e febre. Em alguns casos é acompanhada de vômitos, *rash* cutâneo, conjuntivite e otite média. Um número considerável de crianças admitidas em hospitais apresentam hipoxemia. Os diagnósticos clínicos relacionados à infecção por hMPV são principalmente bronquiloite, pneumonia e otite média.⁶⁸ Parece que os sintomas de infecção por hMPV ocorrem em crianças mais velhas e são menos severos do que a infecção por VRS.¹⁹

Na avaliação realizada em 2009 crianças com sintomas de IRA para os diversos vírus respiratórios, o hMPV mostrou ser o mais associado a casos de bronquiolite, com ou sem pneumonia.^{65, 82}

Alguns trabalhos sugerem a presença de hMPV em casos de Síndrome Respiratória Aguda Severa (*SARS – Severe Acute Respiratory Syndrome*).^{83, 84}

5. Outros Vírus Respiratórios

5.1 Vírus Respiratório Sincicial

O VRS pertence à família *Paramyxoviridae*, gênero *Pneumovirus*. É um vírus envelopado, com fita simples de RNA. A análise antigênica identificou a presença de dois subgrupos, A e B, que normalmente circulam na mesma área geográfica, com predominância do subgrupo A.¹ Não está clara a importância clínica ou epidemiológica destas variantes antigênicas.⁸⁵

O VRS é responsável por aproximadamente 50% de todos os casos de pneumonia e até 90% dos casos de bronquiolite na infância.⁸⁶ Dados epidemiológicos têm demonstrado que o VRS representa a causa mais importante de doença no trato respiratório inferior, principalmente bronquiolite e pneumonia, particularmente aquelas com menos do que 6 meses de idade. É o principal responsável pelos casos severos de doenças do TRI, liderando o número de hospitalizações.^{1, 5} O VRS pode causar pneumonia severa e morte em pessoas com imunodeficiência.¹ Bosis *et al.* demonstraram que o VRS é o principal patógeno envolvido nos casos de primeiro episódio de sibilância recorrente em crianças com menos de 12 meses de idade.²¹ Virtualmente todas as crianças já desenvolveram anticorpos contra o VRS até os 3 anos de idade, porém são comuns as re-infecções em todas as idades, ocorrendo algumas vezes há poucas semanas uma da outra.⁷

As crianças infectadas por VRS apresentam elevada replicação viral durante vários dias após o início dos sintomas clínicos, o que provoca frequentes infecções nosocomiais, especialmente entre lactentes.¹ O período de incubação é estimado em 5 dias. No início da infecção, o vírus replica-se na nasofaringe atingindo títulos de 10⁶ cópias do vírus por mililitro de secreção nasal. O mecanismo pelo qual o vírus atinge o

TRI não está claro, presumindo-se que aconteça pela aspiração da secreção. Outro mecanismo proposto é que a migração viral aconteça através da movimentação dos macrófagos para o TRI.⁸⁶

Os sinais de infecção do TRI aparecem em torno de 1 a 3 dias após a presença de rinorréia, indicando a presença do vírus nos brônquios e bronquíolos. Durante a bronquiolite, as células do epitélio ciliado são destruídas e necrose é observada nos casos mais severos. O tropismo do VRS pelo epitélio respiratório é característico e a formação de um grande sincício dá origem ao nome do vírus.⁸⁶

O VRS tem uma distribuição mundial, com surtos anuais, padrão regular e geralmente previsível. Em climas temperados, o VRS causa epidemia anual durante os meses de inverno, enquanto que os dados epidemiológicos das regiões tropicais demonstram uma associação entre os surtos de VRS e a época das chuvas.² Os resultados do trabalho de Thomazelli *et al.* demonstram que em São Paulo os surtos começam no final do outono ou no início do inverno, com picos em maio e com duração de 5 meses. Nos surtos epidêmicos foi observado um padrão dependente da temperatura e nenhuma associação com precipitação volumétrica, com pico nos meses mais frios do ano. Esse padrão é semelhante ao observado nos países sul-americanos do extremo sul, como Chile, Uruguai e a Argentina.²

O diagnóstico do VRS é normalmente realizado pelo exame direto da secreção respiratória através de imunofluorescência ou enzimaímunoensaio. A imunofluorescência direta e indireta com anticorpos poli ou monoclonais demonstrou ser de grande utilidade para a detecção de antígenos do vírus nas células nasofaríngeas. Um número grande de testes *point-of-care* estão disponíveis para identificação de VRS em secreção respiratória, com relativa especificidade e sensibilidade. O VRS também pode crescer em cultura celular, porém é extremamente lábil e um grande cuidado deve ser tomado no transporte até a inoculação.¹

5.2 Vírus Influenza

O vírus influenza A foi isolado em 1933 e o influenza B em 1940. Pertencem à família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavirus*. Os vírions do influenza são partículas encapsuladas rodeadas por uma bicamada lipídica. Seu genoma é constituído por uma fita simples de RNA envolvido por um capsídeo. O envelope viral é constituído por duas glicoproteínas, hemaglutinina (H), que está relacionado à ligação do vírus às células para iniciar a infecção e a neuraminidase (N), que facilita a liberação de novos vírions. Essas glicoproteínas apresentam uma variação antigênica grande, com mais de 16 tipos de H e 9 tipos de N reconhecidas até hoje. A ocorrência de epidemias

anuais de influenza é devido a alta taxa de variação antigênica e mutações nos genes das proteínas H e N.¹

A infecção se apresenta na forma de epidemias explosivas e com uma disseminação rápida do vírus. A causa fundamental de ocorrência das epidemias do influenza é a contínua geração de novas cepas, derivadas de cepas anteriores, para as quais os indivíduos não apresentam imunidade.⁸⁷

O vírus influenza é um sério problema de saúde pública em todo o mundo, no qual as crianças constituem o grupo etário mais afetado. Embora muitas infecções causadas por influenza possam ser prevenidas por programas efetivos de vacinação, existem indicativos que teremos uma infecção pandêmica em um futuro próximo, devido a uma cepa variante não coberta pela vacinação atual, necessitando assim programas de vigilância epidemiológica permanentes.⁵

A metodologia padrão para o isolamento do vírus é a cultura celular. Detecção direta do antígeno viral também pode ser realizada e é uma alternativa rápida e sensível. Somente as técnicas moleculares atualmente disponíveis permitem a diferenciação entre influenza A e B, além da subtipagem de H e N.¹

5.3 Vírus Parainfluenza

O vírus parainfluenza é membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Paramyxovirus* (subtipos 1 e 3) e *Rubulavirus* (subtipos 2 e 4).⁸⁸ O genoma do vírus é composto por uma fita simples de RNA não segmentada e o envelope viral contém duas glicoproteínas (hemaglutinina e neuraminidase) e proteínas de fusão.⁸⁹ As proteínas de fusão permitem ao vírus hemolisar certos tipos eritrocitários, o que os diferenciam do vírus influenza.⁸⁷

Os subtipos 1, 2 e 3 são importantes patógenos humanos e estão entre os principais agentes da crupe, bronquiolite e pneumonia em crianças e lactentes.⁸⁸ O subtipo 4 tem tradicionalmente sido associado a manifestações moderadas do TRS em crianças e adultos.⁸⁸ Ao menos dois terços das crianças com idade inferior a 2 anos são infectadas com o vírus parainfluenza 3.

O risco de doença é de aproximadamente 30% e decai após esta faixa etária.⁸⁹ A infecção primária por parainfluenza pode proporcionar certo grau de imunidade, porém não é completa e re-infecções são comuns, mas menos severas que a infecção inicial.¹

O perfil sazonal de distribuição varia de acordo com os subtipos e localização geográfica. Nos Estados Unidos, o parainfluenza 2 causa surtos epidêmicos anuais ou bianuais juntamente com o parainfluenza 1 durante o outono, enquanto que o

parainfluenza 3 ocorre anualmente na primavera e verão. Em um trabalho realizado na cidade de Fortaleza, Fé *et al.* observaram uma distribuição sazonal somente para o subtipo 3, predominando entre os meses de setembro a novembro, numa relação inversa com a temporada de chuvas.⁹⁰ Parece que, de uma maneira geral, epidemias de parainfluenza 1 acontecem normalmente no outono em anos alternados, parainfluenza 2 ocorrem esporadicamente e parainfluenza 3 tendem a ocorrer anualmente no inverno de locais com clima temperado.¹

O diagnóstico etiológico não pode estar baseado exclusivamente nos sinais e sintomas clínicos devido à sua similaridade dentro do grupo e mesmo entre outros vírus respiratórios.⁸⁸ O diagnóstico laboratorial do vírus parainfluenza é baseado no isolamento viral em cultura, permanecendo ainda como padrão-ouro. O vírus cresce com relativa lentidão (em torno de 3 a 5 dias) e não causa citotoxicidade, sendo detectado por hemoadsorção. O diagnóstico rápido para detecção do antígeno viral pode ser realizado por imunofluorescência direta e é específico para cada tipo de parainfluenza. Da mesma maneira, métodos moleculares podem detectar os vírus individualmente ou mesmo como um grupo único, com elevada sensibilidade e especificidade.¹

5.4 Adenovirus

Adenovirus é um vírus não envelopado que contém fita dupla de DNA envolta por um capsídeo. A infecção por adenovirus ocorre mundialmente e a transmissão varia de esporádica à epidêmica. Uma vez que o vírus é muito estável, pode ser facilmente transmitido no ambiente através de fomites. São importante causa de doença no TRS e TRI com os tipos 1, 2, 3, 5 e 7 correspondendo a 85% das infecções.¹ Atualmente, 52 tipos de adenovirus humanos foram identificados, estando agrupados em 6 sub-gêneros, designados de A a F, de acordo com o conteúdo de guanidina e citosina do seu DNA.¹

Infecções por adenovirus são comuns em todos os grupos etários, causando tanto infecções hospitalares quanto epidemias comunitárias. Tem sido associado com quadros de asma quase-fatal e quadros de otite média em crianças com menos de 2 anos de idade.⁵

A infecção por adenovirus pode ser diagnosticada diretamente na secreção respiratória através de cultura celular, imunofluorescência, enzimaensaio, imunocromatografia e análise molecular.¹

5.5 Rinovirus

O rinovirus é um grupo de mais de 100 sorotipos distintos. Pertence à família *Picornaviridae* que são vírus pequenos, não-envelopados e com fita simples de RNA. Ao contrário dos enterovirus (membros da mesma família) é inativado quando expostos ao meio ácido ($\text{pH} < 5$), justificando sua inabilidade em infectar o trato gastrointestinal.¹

O rinovirus é responsável pela maioria dos casos de resfriado durante o inverno, causando principalmente IRA no TRS. Também é considerado fator de risco para quadros de otite média. Além disso, inúmeros trabalhos apontam este vírus como importante causa de doenças do TRI, como displasia broncopulmonar e exacerbação dos sintomas da asma.⁵ Um número grande de fatores contribuem para o vírus desempenhar este papel: sua habilidade para replicação nas células do trato respiratório inferior e estímulo da resposta inflamatória. Acredita-se que o paciente com asma apresenta maior suscetibilidade à infecção por rinovirus.⁹¹

Estudos recentes associaram rinovirus com a exacerbação dos sintomas da asma com IRA no trato respiratório inferior, principalmente em pessoas com doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística ou imunocomprometidas.¹

O cultivo do rinovirus apresenta melhor desempenho quando em temperaturas inferiores aos outros vírus (33 a 34°C) e cresce menos na temperatura mais alta do pulmão do que nas vias aéreas superiores.¹

O diagnóstico da infecção raramente necessita testes laboratoriais, porém o isolamento viral, detecção do RNA, detecção do antígeno por imunofluorescência ou titulação de anticorpos podem ser realizados. A cultura celular requer vários dias para confirmação do sorotipo envolvido, não sendo utilizado como método de rotina.¹

6.0 Investigação Laboratorial de Vírus Respiratórios

Tanto pais quanto médicos satisfazem-se em atribuir um determinado agente etiológico às manifestações clínicas da IRA e frustram-se com as palavras “provavelmente é uma infecção viral”.⁴

O reconhecimento da importância da determinação do agente etiológico da IRA em crianças está aumentando porque permite a implementação de medidas de controle de infecção adequadas e, eventualmente, uso de terapia anti-viral. O diagnóstico correto pode prevenir internações hospitalares e o uso inapropriado de antibióticos. Do ponto de vista de saúde pública, permite o manejo correto de eventuais surtos epidemiológicos.⁹²

Entretanto, existe um debate a respeito da validade da pesquisa dos agentes etiológicos virais para os quadros de bronquiolite na alteração do manejo dos pacientes. Muitos hospitais solicitam os testes no sentido de reduzir os riscos de infecção de outros pacientes, embora não existam evidências de quão efetivo seja este procedimento.¹³ Além disso, nos Estados Unidos, existe uma controvérsia se crianças com bronquiolite devam ser investigadas para presença de infecção bacteriana. Isto é especialmente importante para situações nas quais os testes rápidos para agentes virais não estão disponíveis.¹³

O diagnóstico etiológico viral das doenças do trato respiratório requer confirmação laboratorial, pois a inespecificidade dos sinais e sintomas clínicos não permitem o reconhecimento do agente envolvido.^{1 93}

Os métodos tradicionais de detecção viral em amostras respiratórias incluem a cultura, a detecção do antígeno viral e amplificação de ácidos nucleicos.⁹²

Embora o método de cultura celular seja considerado essencial para detecção e propagação dos vírus respiratórios, apresenta limitações em termos de sensibilidade e rapidez. Além disso, os vírus que não produzem efeitos citopáticos não podem ser identificados por esta metodologia. Já a detecção dos antígenos virais por imunofluorescência carece muitas vezes de adequada sensibilidade.²¹ Com a utilização destes métodos, um número grande de infecções permanece não diagnosticada. Recentes avanços na área de biologia molecular têm ampliado a detecção de patógenos virais respiratórios. Ainda assim, somente 40 a 60% das infecções podem ser consistentemente associadas a um agente etiológico específico.⁶⁰ Por estas razões o desenvolvimento de métodos moleculares têm se tornado uma alternativa rápida, específica e sensível para identificação dos agentes etiológicos de pacientes com IRA.²¹

6.1 Métodos Laboratoriais Disponíveis

6.1.1 Cultura Viral

A cultura viral é o método de referência utilizado para o diagnóstico das infecções virais. A principal vantagem do método tradicional de cultura em células imobilizadas é a possibilidade de isolar e identificar um leque bastante amplo de vírus. Entretanto, o método é extremamente trabalhoso e medidas de cuidado relacionadas à coleta, transporte e manipulação devem ser tomadas. As amostras que permitem a cultura viral incluem aspirados de nasofaringe, *swabs* de nasofaringe e orofaringe, lavados bronco-alveolares, escarro e biópsias pulmonares. A detecção dos vírus em cultura requer uma considerável experiência e é realizada através de análise

microscópica onde são avaliadas as alterações morfológicas degenerativas na camada celular resultante do efeito citopático do vírus. Nem todos os vírus crescem em todos os tipos celulares, então as amostras são normalmente inoculadas em diferentes meios de modo a permitir o isolamento viral mais adequado. Recentemente, têm-se utilizado células criopreservadas disponíveis comercialmente. Mesmo assim, o tempo necessário para o adequado crescimento viral pode ultrapassar 72 horas.¹ A detecção precoce de proteínas virais, através da utilização de anticorpos monoclonais, anteriores às alterações celulares diminuiu bastante o tempo dos exames culturais, embora possam ainda chegar a 48 horas.¹

6.1.2 Imunofluorescência

A capacidade de detecção de vírus aumentou bastante com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais diretamente contra proteínas virais ligados a fluorocromos. Esta marcação fluorescente permite detecção rápida (1 a 3 horas) dos antígenos virais com sensibilidade e especificidade adequadas. Além disso, a possibilidade de realização dos testes de triagem em conjunto permite a otimização da técnica, o que apresenta grande impacto em períodos epidêmicos e em centros de referência.

A performance do teste depende do tipo de amostra, idade do paciente, duração da doença, qualidade do anticorpo monoclonal e experiência do profissional. Normalmente, com exceção do VRS, a imunofluorescência apresenta menor sensibilidade do que a cultura. A sensibilidade da imunofluorescência para detecção de vírus respiratórios varia amplamente, de 90% para VRS, 80% para influenza A e B, 70% para parainfluenza 1 a 3 e 50% para adenovírus.¹

Ainda não estão disponíveis comercialmente anticorpos monoclonais para os vírus respiratórios recentemente descritos como o bocavirus humano. No caso do metapneumovírus humano, os kits disponíveis apresentam baixa sensibilidade e especificidade.

6.1.3 Detecção de Ácidos Nucléicos

Os métodos moleculares se tornaram amplamente difundidos e preencheram as lacunas das IRA sem diagnóstico. Um exemplo recente das vantagens dos métodos moleculares em relação aos outros anteriormente disponíveis foi a descoberta de novos agentes virais como o metapneumovírus humano e bocavirus humano.⁴

Os métodos moleculares para detecção de vírus respiratórios se desenvolveram a partir da limitação de sensibilidade e lentidão da cultura e da variada sensibilidade dos métodos de imunofluorescência.

Os vírus podem ser detectados em amostras clínicas com iniciadores (*primers*) complementares à seqüência do DNA ou RNA viral, através de técnicas de reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR). Esta técnica já está amplamente difundida nos laboratórios e permite a análise de múltiplos vírus. A maior desvantagem ainda é o custo elevado em comparação às técnicas anteriores, entretanto apresenta maior sensibilidade.¹

Um teste de amplificação de ácidos nucléicos envolve três etapas: a preparação das amostras, que inclui a extração dos ácidos nucléicos, a amplificação dos ácidos nucléicos propriamente dita (PCR) e a detecção e identificação dos amplicons produzidos.⁹⁴

A PCR é uma técnica rápida de amplificação *in vitro* de uma seqüência específica do DNA genômico (ou RNA, antecedido de uma reação de transcrição reversa) entre uma região 5´ e 3´ flanqueada por *primers*, complementares a uma das fitas de DNA. Permite a síntese enzimática de seqüências específicas gerando até 10⁹ cópias a partir de uma única molécula alvo. O resultado desta amplificação é o acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas terminações 5´ dos *primers*.

A detecção do produto amplificado da PCR originalmente é detectado em uma eletroforese em gel de agarose na presença de brometo de etídio através da visualização de bandas durante a irradiação com luz ultra-violeta e comparação com um produto de referência.⁹⁴

Em uma reação de PCR *multiplex*, diversas reações de amplificação acontecem simultaneamente no mesmo tubo através de uma mistura de pares de *primers*, cada par específico para um tipo viral. Estas reações são desenvolvidas para pesquisa simultânea de 2, 6 e até 14 patógenos. Entretanto, existe um indicativo que o aumento no número de patógenos pesquisados implica em perda de sensibilidade.⁹⁴

6.1.4 PCR em Tempo Real

A introdução da PCR em Tempo Real utilizando sondas fluorescentes não só permitiu a ampliação do número de agentes pesquisados como também eliminou a necessidade de análises complementares.²¹

O princípio embutido na técnica de PCR em Tempo Real é que a etapa de amplificação está combinada com a etapa de detecção em uma única reação. Não

existe a necessidade de manipulação do produto amplificado, o que minimiza os problemas de contaminação e resultados falso-positivos.⁹⁵ Existem muitas variações da técnica, a maioria delas utilizando sondas especificamente marcadas de acordo com o alvo que se quer amplificar. Vários tipos de marcadores químicos (fluoróforos) estão disponíveis para marcação das sondas.⁹⁵ Diversos métodos de detecção de ácidos nucleicos têm sido utilizados nas plataformas de PCR em Tempo Real: *TaqMan probes*, *molecular beacons*, probes de hibridização *FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)* e *Sybr Green*.

A combinação do uso de capilares de vidro aquecidos pelo ar, encurtando significativamente os tempos dos ciclos, juntamente com a utilização de sondas marcadas com substâncias fluorescentes permitindo a detecção imediata dos produtos de amplificação, resultam em diminuição considerável no tempo de reação.⁹⁴ Normalmente as etapas de amplificação e detecção se completam em 1 hora, correspondendo a um terço do tempo do PCR convencional.⁹⁶

A combinação de excelente sensibilidade e especificidade, baixo risco de contaminação, facilidade de manipulação e rapidez tornaram o PCR em Tempo Real uma alternativa para os testes tradicionais no diagnóstico das doenças infecciosas.⁹⁶

As metodologias *TaqMan* utilizam uma sonda (*quencher*) hibridizada ao lado de uma outra marcada com substância fluorescente (*reporter*). Na medida em que a reação se completa, a enzima separa o *quencher* do *reporter*, fazendo com que o mesmo emita fluorescência.⁹⁴ A tecnologia *FRET* consiste de duas sondas separadas, na qual há excitação de fluoróforos adjacentes, emitindo sinal quando hibridizados. Já na tecnologia de *Molecular Beacons*, as sondas são auto-aneladas em estado normal não-hibridizado não emitindo sinal; quando hibridizam ocorre separação do *quencher* do fluoróforo e ocorre emissão de luz.

O método de detecção *Sybr Green* permite a detecção do acúmulo de qualquer dupla fita de DNA, proporcionando elevada sensibilidade e relativa especificidade. A utilização desta plataforma aliada a um equipamento que fornece a análise de temperatura de fusão (*melting curve*) permite a diferenciação dos produtos amplificados através de sua concentração de citosina e guanidina (%CG). É um método similar a separação do produto amplificado de acordo com seu comprimento em gel de agarose.⁹⁶

6.1.5 Diagnóstico Laboratorial de Bocavirus humano e Metapneumovirus humano

Até o momento, a detecção de hBoV tem sido realizada somente através de métodos baseados na PCR visto que nenhum método de cultura, modelo animal de infecção ou anticorpo estão disponíveis. Para o diagnóstico molecular, as regiões mais conservadas do genoma viral são analisadas, incluindo normalmente o gene NP1.^{36, 37}

O diagnóstico laboratorial do MPV pode ser realizado por cultivo celular, detecção antigênica direta, sorologia ou PCR.⁹⁷ O vírus evidencia replicação pouco eficiente em células comumente utilizadas nos laboratórios. A baixa suscetibilidade dos cultivos celulares, juntamente com a necessidade da presença de fatores de enriquecimento, talvez possa explicar o fato de o vírus estar circulando na população humana há tanto tempo e ter sido detectado somente em 2001. A replicação do hMPV em cultivo celular é lenta e o efeito citopático somente é observado após 10 a 14 dias e indistinguível do efeito do VRS.

As dificuldades de cultivo e o tempo necessário para a realização do isolamento tornam esta técnica pouco viável para sua aplicação na rotina. A transcrição reversa e a PCR são as técnicas que têm apresentado os melhores resultados para detecção do hMPV.

6.2 Coleta de Material

Está bem estabelecido que o aspirado de nasofaringe e o lavado de nasofaringe são superiores aos outros tipos de coleta de amostras para detecção viral devido a grande quantidade de células epiteliais que são aspiradas durante o processo de coleta.⁹⁸ A sensibilidade do *swab* nasal é em torno de 90% quando comparado ao aspirado de nasofaringe. Desta maneira, em alguns casos de indivíduos sem secreção nasal, para os quais são utilizados *swabs*, a detecção do agente etiológico fica comprometida.^{92, 99}

Na prática clínica, o método ideal de coleta deve balancear o conforto do paciente, custos, efetividade e risco aos outros pacientes.¹⁰⁰ Alguns estudos têm demonstrado que o *swab* nasal seria tão efetivo quanto o aspirado de nasofaringe para detecção viral.¹⁰¹ Entretanto, a sensibilidade obtida com a utilização de *swab* nasal ainda é controversa. É possível que o melhor tipo de amostra dependa do vírus analisado e da natureza do teste empregado.¹⁰⁰ Numa análise de 475 amostras pareadas entre os dois métodos, Sung *et al.* observaram uma maior sensibilidade do aspirado de nasofaringe em comparação ao *swab* nasal na avaliação por

imunofluorescência indireta e cultura. Quando a avaliação foi realizada por PCR, somente o VRS apresentou uma sensibilidade inferior no swab nasal.¹⁰⁰

Atualmente, estão sendo desenvolvidos *swabs* nasais floculados que, em estudos preliminares, têm indicado boa sensibilidade e especificidade na comparação com aspirado de nasofaringe. Esta seria uma boa alternativa tanto ao aspirado como o lavado de nasofaringe que muitas vezes se tornam desconfortáveis aos pacientes.⁹⁸

Em função dos testes moleculares não necessitarem a presença de altas concentrações de células infectadas, é possível que o *swab* de garganta ou a saliva se tornem alternativas para análise. Entretanto, são necessários mais estudos para estabelecer critérios de sensibilidade de modo a reproduzir os resultados de outros tipos de amostras.⁹²

III. JUSTIFICATIVA

O conhecimento da epidemiologia dos agentes causadores de Infecção Respiratória Aguda é fundamental para o tratamento adequado dos pacientes infectados. Estudos demonstrando a prevalência dos diversos patógenos responsáveis pela Infecção Respiratória Aguda no Brasil, e especialmente na região sul, são escassos. Além disso, as metodologias existentes nos laboratórios clínicos especializados detectam apenas uma fração destes patógenos.

Embora já existam alguns estudos demonstrando a prevalência de Bocavirus humano e Metapneumovirus humano em pacientes da Ásia, Europa e Austrália, em nosso meio não há nenhum estudo demonstrando a presença destes novos patógenos em pacientes com Infecção Respiratória Aguda.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivos Gerais

- Realizar análise epidemiológica dos vírus bocavírus humano e metapneumovirus humano em amostras respiratórias de pacientes com sintomas de IRA.

2. Objetivos Específicos

- Determinar a incidência de hBoV e hMPV em uma população de crianças com sintomas de IRA;
- Verificar a associação do hBoV e hMPV com outros patógenos associados ao trato respiratório;
- Avaliar a distribuição sazonal de hBoV e hMPV no período estudado;
- Verificar a associação entre hBoV e hMPV e variáveis climáticas (temperatura, chuva e umidade);
- Comparar as metodologias de PCR em Tempo Real e Imunofluorescência direta em relação ao diagnóstico das infecções virais.

V. Referências Bibliográficas

1. Kesson AM. Respiratory virus infections. *Paediatr Respir Rev* 2007;8(3):240-8.
2. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 2007;83(5):422-8.
3. Silva R. Sibilância Recorrente após Bronquiolite Viral Aguda pelo Vírus Sincicial Respiratório [Doutorado]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2007.
4. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Undiagnosed respiratory viruses in children. *Pediatrics* 2008;121(3):e631-7.
5. Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, et al. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(3):301-6.
6. Stralioatto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(4):283-91.
7. van Woensel JB, van Aalderen WM, Kimpen JL. Viral lower respiratory tract infection in infants and young children. *Bmj* 2003;327(7405):36-40.
8. Balfour-Lynn IM. Why do viruses make infants wheeze? *Arch Dis Child* 1996;74(3):251-9.
9. Amantéa SL PJ, Garcia PC. Bronquiolite. In: *Medicina Intensiva em Pediatria: Revinter LTDA*; 2005:401-25.
10. Halfhide C, Smyth RL. Innate immune response and bronchiolitis and preschool recurrent wheeze. *Paediatr Respir Rev* 2008;9(4):251-62.
11. Kristjansson S, Bjarnarson SP, Wennergren G, et al. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses during the first 3 months of life promote a local TH2-like response. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(4):805-11.
12. Fontes MF, MTM, Camargos, PAM, Affonso, AGA, Calazans, GMC. Asma em menores de cinco anos: dificuldades no diagnóstico e na prescrição da corticoterapia inalatória *J Bras Pneumol* 2005;31(3):244-53.
13. Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet* 2006;368(9532):312-22.
14. Amantea SL, Silva FA. [Acute viral bronchiolitis - still subject for controversy]. *J Pediatr (Rio J)* 1998;74 Suppl 1:S37-47.
15. Yanney MP, Vyas HG. The treatment of bronchiolitis. *Arch Dis Child* 2008. 93 (9) 793-798
16. Barcellos L. Bronquiolite Viral Aguda: fatores prognósticos em lactentes hospitalizados previamente hígidos [Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

17. Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005. *Clin Infect Dis* 2006;43(5):585-92.
18. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(36):12891-6.
19. Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 2004;38(7):983-90.
20. Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, et al. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003;41(1):100-5.
21. Bosis S, Esposito S, Niesters HG, et al. Role of respiratory pathogens in infants hospitalized for a first episode of wheezing and their impact on recurrences. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(7):677-84.
22. Jafri HS. Treatment of respiratory syncytial virus: antiviral therapies. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(2 Suppl):S89-92; discussion S-3.
23. Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes EA. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(2 Suppl):S21-32.
24. Moura FE, Borges LC, Portes SA, Ramos EA, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(6):739-43.
25. Stralioatto SM, Nestor SM, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(2):155-8.
26. King VJ, Viswanathan M, Bordley WC, et al. Pharmacologic treatment of bronchiolitis in infants and children: a systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004;158(2):127-37.
27. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* 2006;118(4):1774-93.
28. Fonseca Cde B, Grisi S. Bronchiolitis, respiratory syncytial virus, and recurrent wheezing: what is the relationship? *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2003;58(1):39-48.
29. Solé D. Sibilância na infância. *J Bras Pneumol* 2008;34(6):337-9.
30. Bussamra M. Lactente com sibilância. In: Sociedade Paulista de Pneumologia e Tisiologia; 2007.
31. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354(9178):541-5.
32. Bont L, Alderen WM, Kimpen JL. Long-term consequences of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Paediatr Respir Rev* 2000;1(3):221-7.

33. Piipo-Salolainen EK, M; Korhonen, K, Remes, S. . Adult asthma after non-respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy: subgroup analysis of the 20 year prospective follow up study. *Pediatr Int* 2007;49:190-5.
34. Bont L, Van Aalderen WM, Versteegh J, et al. Airflow limitation during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection predicts recurrent wheezing. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20(3):277-82.
35. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(2):137-41.
36. Schildgen O, Muller A, Allander T, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev* 2008;21(2):291-304.
37. Allander T. Human bocavirus. *J Clin Virol* 2008;41(1):29-33.
38. Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus. *J Infect Dis* 2007;195(9):1345-52.
39. Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol* 2006;35(1):99-102.
40. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006;12(5):848-50.
41. Neske F, Blessing K, Tollmann F, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2007;45(7):2116-22.
42. Chieochansin T, Chutinimitkul S, Payungporn S, et al. Complete coding sequences and phylogenetic analysis of Human Bocavirus (HBoV). *Virus Res* 2007;129(1):54-7.
43. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006;194(9):1276-82.
44. Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44(7):904-10.
45. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007;195(7):1038-45.
46. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Pozo F, et al. Human bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27(4):358-60.
47. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children's hospital. *Clin Infect Dis* 2006;43(3):283-8.

48. Esposito S, Bosis S, Niesters HG, et al. Impact of human bocavirus on children and their families. *J Clin Microbiol* 2008;46(4):1337-42.
49. Foulongne V, Olejnik Y, Perez V, Elaerts S, Rodiere M, Segondy M. Human bocavirus in French children. *Emerg Infect Dis* 2006;12(8):1251-3.
50. Kaplan NM, Dove W, Abu-Zeid AF, Shamooh HE, Abd-Eldayem SA, Hart CA. Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg Infect Dis* 2006;12(9):1418-20.
51. Kleines M, Scheithauer S, Rackowitz A, Ritter K, Hausler M. High prevalence of human bocavirus detected in young children with severe acute lower respiratory tract disease by use of a standard PCR protocol and a novel real-time PCR protocol. *J Clin Microbiol* 2007;45(3):1032-4.
52. Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2006;12(9):1457-8.
53. Pozo F, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Cuesta I, Perez-Brena P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol* 2007;40(3):224-8.
54. Weissbrich B, Neske F, Schubert J, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis* 2006;6:109.
55. Bastien N, Chui N, Robinson JL, et al. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2007;45(2):610-3.
56. Lee JI, Chung JY, Han TH, Song MO, Hwang ES. Detection of human bocavirus in children hospitalized because of acute gastroenteritis. *J Infect Dis* 2007;196(7):994-7.
57. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg Infect Dis* 2007;13(4):636-7.
58. Albuquerque MC, Rocha LN, Benati FJ, et al. Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007;13(11):1756-8.
59. Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(3):546-57.
60. Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD. Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol* 2008;42(3):233-43.
61. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7(6):719-24.
62. Alto WA. Human metapneumovirus: a newly described respiratory tract pathogen. *J Am Board Fam Pract* 2004;17(6):466-9.
63. Williams JV, Wang CK, Yang CF, et al. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *J Infect Dis* 2006;193(3):387-95.

64. Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol* 2006;35(1):46-50.
65. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004;350(5):443-50.
66. van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis* 2003;188(10):1571-7.
67. Heikkinen T, Osterback R, Peltola V, Jartti T, Vainionpaa R. Human metapneumovirus infections in children. *Emerg Infect Dis* 2008;14(1):101-6.
68. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002;186(9):1330-4.
69. Semple MG, Cowell A, Dove W, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005;191(3):382-6.
70. Levine DA, Platt SL, Dayan PS, et al. Risk of serious bacterial infection in young febrile infants with respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* 2004;113(6):1728-34.
71. Ong BH, Gao Q, Phoon MC, Chow VT, Tan WC, Van Bever HP. Identification of human metapneumovirus and *Chlamydia pneumoniae* in children with asthma and wheeze in Singapore. *Singapore Med J* 2007;48(4):291-3.
72. da Silva LH, Spilki FR, Riccetto AG, de Almeida RS, Baracat EC, Arns CW. Variant isolates of human metapneumovirus subgroup B genotype 1 in Campinas, Brazil. *J Clin Virol* 2008;42(1):78-81.
73. Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol* 2007;38(3):221-6.
74. Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. *Clin Infect Dis* 2006;42(12):e1111-3.
75. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):2987-91.
76. do Carmo Debur M, Bordignon J, Duarte dos Santos CN, et al. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol* 2007;39(1):59-62.
77. Boivin G, De Serres G, Cote S, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003;9(6):634-40.

78. Freymouth F, Vabret A, Legrand L, et al. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(1):92-4.
79. Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003;187(5):785-90.
80. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3043-5.
81. Alvarez R, Jones LP, Seal BS, Kapczynski DR, Tripp RA. Serological cross-reactivity of members of the Metapneumovirus genus. *Virus Res* 2004;105(1):67-73.
82. Hamelin ME, Boivin G. Human metapneumovirus: a ubiquitous and long-standing respiratory pathogen. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(11 Suppl):S203-7.
83. Lee N, Chan PK, Yu IT, et al. Co-circulation of human metapneumovirus and SARS-associated coronavirus during a major nosocomial SARS outbreak in Hong Kong. *J Clin Virol* 2007;40(4):333-7.
84. Chan PK, Tam JS, Lam CW, et al. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* 2003;9(9):1058-63.
85. Salomon HE, Avila MM, Cerqueiro MC, Orvell C, Weissenbacher M. Clinical and epidemiologic aspects of respiratory syncytial virus antigenic variants in Argentinian children. *J Infect Dis* 1991;163(5):1167.
86. Domachowske JB, Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(2):298-309.
87. Rocha ITM. Prevalência de vírus respiratório em pacientes atendidos por asma aguda na sala de emergência. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
88. Aguilar JC, Perez-Brena MP, Garcia ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarria JE. Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1191-5.
89. Vainionpää R, Hyypia T. Biology of parainfluenza viruses. *Clin Microbiol Rev* 1994;7(2):265-75.
90. Fé MMM MA, Moura FEA. Parainfluenza Virus Infections in a Tropical City: Clinical and Epidemiological Aspects. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2008;23(3):192-7.
91. Khetsuriani N, Kazerouni NN, Erdman DD, et al. Prevalence of viral respiratory tract infections in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(2):314-21.
92. Robinson JL, Lee BE, Kothapalli S, Craig WR, Fox JD. Use of throat swab or saliva specimens for detection of respiratory viruses in children. *Clin Infect Dis* 2008;46(7):e61-4.

93. Jafri HS, Ramilo O, Makari D, Charsha-May D, Romero JR. Diagnostic virology practices for respiratory syncytial virus and influenza virus among children in the hospital setting: a national survey. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26(10):956-8.
94. Ieven M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *J Clin Virol* 2007;40(4):259-76.
95. Fox JD. Nucleic acid amplification tests for detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 2007;40 Suppl 1:S15-23.
96. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1):165-256.
97. Reina J, Ferrer F, Mena A, Figuerola J, Alcoceba E. [Clinical and epidemiological characteristics of respiratory infections caused by human metapneumovirus in pediatric patients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(2):72-6.
98. Abu-Diab A, Azzeh M, Ghneim R, et al. Comparison between pernasal flocced swabs and nasopharyngeal aspirates for detection of common respiratory viruses in samples from children. *J Clin Microbiol* 2008;46(7):2414-7.
99. Heikkinen T, Marttila J, Salmi AA, Ruuskanen O. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4337-9.
100. Sung RY, Chan PK, Choi KC, et al. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for diagnosis of acute viral respiratory infection. *J Clin Microbiol* 2008;46(9):3073-6.
101. Heikkinen T, Salmi AA, Ruuskanen O. Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of influenza. *Bmj* 2001;322(7279):138.

VI. ARTIGO 1

Artigo submetido ao periódico “*Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*” em
07 de maio de 2009, conforme Guide for Authors.

**Multiplex, SYBR Green-based Real-Time PCR Assays Enhance Detection of
Respiratory Pathogens**

Running Title: PCR Enhance Detection of Respiratory Pathogens

Diogo André Pilger^{a,e}, Vlademir Vicente Cantarelli^{b,e}, Sérgio Luis Amantea^c, Sandra
Leistner-Segal^{a,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

^bCentro Universitário Feevale, Novo Hamburgo

^cUniversidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

^dServiço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

^eLaboratório Weinmann LTDA, Porto Alegre

Corresponding author:

Sandra Leistner-Segal, PhD
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Genética Médica
Rua Ramiro Barcelos 2350
CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil.
Phone: +55-51-2101-8011
Fax: +55-51-21018010
E-mail address: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Abstract

We developed SYBR Green-based real-time PCR assays to detect 12 respiratory pathogens, including 10 viruses (respiratory syncytial virus (RSV), influenzaviruses (FLU) A and B, parainfluenzaviruses (PIV) 1, 2 and 3, adenoviruses (ADV), human rhinoviruses, human metapneumovirus and human bocavirus) and two bacteria (*Bordetella pertussis* and *Mycoplasma pneumoniae*). A total of 455 nasopharyngeal aspirates from children with bronchiolitis and recurrent wheezing diagnosis were tested by the real-time PCR assays and results were compared with those by direct immunofluorescence assays (DIF). The methodologies had an agreement of 63.5% in detecting 7 viruses (FLU A, B, PIV 1, 2, 3, RSV and ADV) showing a weak agreement (kappa coefficient = 0.241). The PCR assays identified specimens with mixed viral infections with a 39-fold greater frequency than DIF, resulting in a coinfection rate of 43.7%. The new real-time PCR assay considerably improved the diagnostic yields for respiratory viruses from patients admitted with respiratory symptoms within a clinically relevant time frame.

Keywords: Real-Time PCR, virology, respiratory tract infection

Introduction

Respiratory tract infections in humans can be a result of infection caused by a heterogeneous group of viruses and bacteria that may produce similar clinical presentations (Lam et al., 2007). Accurate detection of respiratory viruses is important to guide antiviral therapy, prevent nosocomial spread, provide surveillance, and in some cases, decrease hospital cost and lengths of patient stay (Kuypers et al., 2005). Determining etiological diagnoses for patients admitted to the hospital with respiratory symptoms remains a clinical and laboratory challenge. Infections with respiratory virus are traditionally diagnosed using viral culture and direct immunofluorescence (DIF) tests (van de Pol et al., 2007). Viral culture has been considered the gold standard for detection of respiratory viruses, but its limitation is that it can only detect a small number of known viral types. Furthermore, the yield of viral cultures depend on the quality of sampling, the correct transport and storage of samples, as well as the type of cells used for culture. In addition, the technique has a turnaround time of several days to weeks, and is therefore unable to guide initial patient management (van de Pol et al., 2006). Disadvantages of DIF include: requiring multiple reagents which may vary in sensitivity, potential variability in technical reading and the need for an adequate number of cells to examine each specimen (Kuypers et al., 2005). Over the last 2 decades, nucleic acid amplification techniques, particularly real-time PCR, became available as diagnostic tool (van de Pol et al., 2007). PCR has been shown to be more sensitive and faster than conventional techniques. Additional advantages of PCR include its ability to identify multiple viruses simultaneously, and to detect viruses and other atypical pathogens that cannot be cultured *in vitro* or for which no DIF is commercially available (van de Pol et al., 2006). The present study aimed to develop and evaluate the use of real-time PCR to detect 10 different respiratory viruses, including respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus (FLU), A and B, parainfluenza virus (PIV) 1, 2 and 3, adenovirus (ADV), human rhinovirus (RNV), human metapneumovirus (hMPV) and human bocavirus (hBoV). A SYBR Green

detection format was chosen since reagents cheaper and ready available, avoiding the need of synthesizing more expensive detection probes, which reduces the cost of reactions making it more appropriate for laboratories in resource-limited countries. Moreover, the results from real-time PCR assay were compared with those obtained with DIF for 7 respiratory viruses commonly found in children who presented with clinical signs of viral respiratory tract infection.

Materials and Methods

Study population

For this study, infants (<24 months) admitted to the pediatric emergency room of Santo Antônio Children's Hospital (Porto Alegre – Brazil), who presented with clinical signs of viral respiratory tract infection with lower airways obstruction accompanied by widespread crackles and/or wheezing were included. Nasopharyngeal aspirates were prospectively collected from May 2007 to June 2008. This routine has been applied for all patients whenever viral respiratory tract infection was suspected. For all eligible cases a specific questionnaire was filled. An exclusion criterion was bacterial respiratory infection, as suggested by radiological investigation. The study was approved by Ethic Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (n. 06-549).

Samples

A total of 455 nasopharyngeal aspirates (NPA) were tested immediately for the presence of RSV, influenzaviruses, parainfluenzaviruses and adenoviruses by a DIF assay. The remaining NPA was stored at – 70°C until further testing by real time PCR.

Direct immunofluorescence tests

All samples were routinely screened for common respiratory viral agents by the hospital's virology laboratory by DIF, which detects RSV, FLU A and B, PIV 1, 2 and 3 and ADV, according to the manufacturer's protocol. Briefly, NPAs were mixed with

phosphate buffer and cells were collected after centrifugation, and then spotted onto slides, air-dried, fixed in acetone and incubated with a specific mouse anti-respiratory virus monoclonal antibody, prior to reading using a fluorescent microscope. The presence of bright green fluorescence within intact cells was considered positive.

Nucleic acid extraction and cDNA synthesis

NPA samples that were kept frozen at -70°C were used for total nucleic acids extraction, which were isolated from 200 μL of each buffered respiratory specimen using the QIAmp UltraSens Virus Kit (Qiagen). To ensure that negative results were not due to poor nucleic acid extraction or inhibition of PCR assay, amplification of β -globin gene was applied for each sample.

Real-time PCR

A two-step reverse-transcriptase PCR method was used for amplification and detection of RNA viruses (RSV, FLU A and B, PIV 1, 2 and 3, RNV and hMPV). The reverse transcription step was performed using random hexamers and SuperScript III First-Strand (Invitrogen), in accordance with manufacture's recommended protocol: incubation for 10 minutes at 25°C , 30 minutes at 50°C , followed by 5 minutes at 85°C . Multiplex real-time PCR assays were developed in two panels: RSV, influenza A and B (panel 1) and parainfluenza 1, 2 and 3 (panel 2). The other viruses (RNV, ADV, hBoV and hMPV) were detected by a singleplex virus-specific PCR. Two μL of cDNA (RNA viruses) or the same amount of extracted DNA (DNA viruses) were assayed in a 20 μL reaction mixture containing 10.0 μL Platinum Syber Mix (SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR kit with Syber Green, Invitrogen), 1.0 μL of bovine serum albumin, 1.0 μL (10 μM) of forward and reverse primers. Glicosylase and dUTP were included in the PCR master mix to prevent false-positive reactions due to amplicon carry-over. All amplifications and detections were performed using the LightCycler instrument (Roche Diagnostics) and identification of individual viruses were assessed by melting curve

analysis (see table 1). . Additionally, the presence of two atypical pathogens, *Bordetella pertussis* and *Mycoplasma pneumoniae*, were determined by a specific, lab-developed, real-time PCR assay.

Primer design and preparation

Primers were especially designed from consensus genome regions obtained from DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>). Typically, sequences of 50 to 100 representative strains of each pathogen were downloaded and the sequences were aligned using Clustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html>). The program OligoPerfect Designer (Invitrogen) was used to predict the compatibility of primer pairs and to estimate the optimal annealing temperatures (table 1). Primer pairs were selected to ensure that sizes of amplicons of different pathogens could be easily differentiated by melting curves on the LightCycler platform (table 1).

Specificity of the assay

The ability of PCR assays to detect the presence of one or more pathogen in the specimen was initially assessed using samples that tested positive for respiratory viruses by DIF. This was also performed to confirm that the primer sets did not produce false-positive or nonspecific results. DNA sequencing was used to further check positive samples. Amplicons were purified using a spin column kit (Accuprep, BioNeer) according to the manufacturer's instructions and were then eluted into a final volume of 30µL and prepared with the ABI PRISM BigDye cycle sequencing kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Sequences were determined by an 377 DNA sequencer (Applied Biosystems). To validate the amplification process and to exclude the presence of carryover contamination positive and negative controls were run in each PCR.

Statistical analysis

The association between the groups was determined by X^2 test, t -test for comparison of means and kappa coefficient for agreement evaluation. Data Analysis was performed using SPSS version 14 for Windows. All reported p values are two-sided and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Four hundred and fifty five NPA were consecutively collected from 433 patients from May 2007 to June 2008. The average age was 5.46 months (4.90 – 6.02) and 57.6% were male. For real-time PCR, 409 (89.9%) out of the 455 samples tested were positive for at least one of the 10 respiratory viruses tested in this study. When the real-time PCR results were analyzed considering only the 7 viruses detected by DIF, 358 (78.7%) were positive for at least one of those viruses, while the DIF test detected these viruses in 247 (54.3%) samples. These data are summarized in table 2.

By real-time PCR, RSV was detected in 222 samples (49.3%), FLU A in 94 (20.9%), FLU B in 30 (6.7%), PIV 1 in 7 (1.6%), PIV 2 in 2 (0.4%), PIV 3 in 26 (5.8%), ADV in 9 (2.0%), RNV in 112 (24.9%), hMPV in 66 (14.5%) and hBoV in 60 (13.2%). We identified a unique causative viral agent in 210 (46.2%) samples. Among the 409 virus-positive samples, 199 were also positive for additional viruses, resulting in a coinfection rate of 43.7%. Double infections were detected in 144 (31.6%) samples, triple infections in 47 (10.3%) samples and 8 (1.8%) samples showed 4 different viruses. The two bacteria (*Bordetella pertussis* and *Mycoplasma pneumoniae*) were detected in 29 (6.4%) and 14 samples (3.1%), respectively.

The average time necessary to analyze all 10 viruses by real-time PCR was as follow: nucleic acid extraction (1 hour), reverse transcription for RNA viruses (1 hour), PCR for panel 1 (30 minutes), PCR for panel 2 (30 minutes), PCR for adenovirus (30 minutes), PCR for human rhinovirus (30 minutes), PCR for human metapneumovirus (30

minutes) and PCR for human bocavirus (30 minutes), adding 5 hours to complete the whole process. When samples arrived in the laboratory before 12:00 am, the results were available in the same day by 6:00 pm. When samples arrived later, results were available by 12:00 am next morning.

The costs of the reactions were also evaluated. For total acid nucleic extraction, the average costs was U\$6.50. For each real-time PCR, the average costs were U\$9.10, totalizing U\$61.10 (6 different reactions). The values reflect prices of reagents and other consumables in Brazil.

By DIF test, RSV was detected in 209 samples (46.8%), influenza A in 15 (3.4%), influenza B in 1 (0.2%), parainfluenza 1 in 0 (0.0%), parainfluenza 2 in 1 (0.22%), parainfluenza 3 in 11 (2.5%) and adenovirus in 7 (1.6%). We identified a unique causative viral agent in 242 (53.1%) samples. Among the 247 virus-positive samples, 5 were also positive for an additional virus, resulting in a coinfection rate of 1.1%.

The average time necessary to analyze all 6 viruses by DIF was 2.0 hours for negative or RSV-positive samples (single infection). For other respiratory viruses, an additional 1.5 hours had to be added to complete the analysis. When samples arrived to the laboratory before 9:00 am, the results were available by 12:00 am. If samples arrived before 3:00 pm, results were available the same day by 6:00 pm. After this time, the samples were processed in the following morning.

The cost of a DIF assay for all 6 viruses was U\$ 9.40. In both cases (DIF and real-time PCR), only the reactions costs were accounted for, as hands-on time and staff costs, were considered similar for both cases, and were not taken into consideration.

Comparison between DIF and real-time PCR methods

Differences between the two methodologies were individually and globally analyzed for each virus. For the global analysis, just 7 viruses were considered by real-time PCR. The results are shown on tables 3. The diagnostic yields of Real-time PCR compared to that of DIF, used here as reference method, are presented in table 4. The sensitivity and specificity of Real-time PCR compared to DIF were 0.89 and 0.34, respectively.

Analyzing only the 7 compared viruses, the real-time PCR identified respiratory viruses in 358 (78.7%) samples, whereas DIF detected viruses in 247 (54.35%). When the viruses were individually analyzed, only for parainfluenza 2 we observed no statistical difference. All the others viruses were more prevalent when real-time PCR was used for their detection, as compared with DIF. All kappa coefficients demonstrated a weak agreement, indicating no concordance between the two methods. The number of samples that were positive by real-time PCR and negative by DIF was 137 whereas the number of samples that were positive by DIF and negative by real-time PCR was only 26. Overall, the kappa coefficient of agreement between DIF and real-time PCR was 0.241.

When we compare the reactions costs, the real-time PCR was 6.5-fold more expensive than DIF and was slightly more laborious too (1.4-fold).

Discussion

In the present study, we showed that real-time PCR for RSV, FLU A and B, PIV 3 and ADV substantially increased the diagnostic yields of these viruses in the clinical practice, when compared to the yield of DIF. The high diagnostic yield of real-time PCR compared with conventional techniques is in agreement with the literature (Bellau-Pujol et al., 2005; Jennings et al., 2004; Kehl et al., 2001). The real-time PCR also identified specimens with multiple viral infections with a 39-fold greater frequency than DIF.

Different studies have shown that PCR increases the diagnostic yield by up to 25% as compared to conventional methods (viral culture and DIF) (Fox, 2007; van de Pol et al., 2006). Kuypers et al., described a significantly more sensitive PCR compared to DIF for the detection of respiratory viruses in clinical specimens from children, detecting 40% more positive specimens and missing only a few DIF-positive specimens (Kuypers et al., 2006). In our study, one-hundred and thirty-seven specimens were positive by PCR and negative by DIF, while 26 were positive by DIF and negative by PCR, confirming that DIF significantly misses more true positive samples than real-time PCR.

An additional advantage of real-time PCR over traditional methods is that it allows high-throughput screening of patient samples for the presence of many different pathogens. Thus, real-time PCR allows for maximal detection of multiple viral and atypical infections in children with low respiratory tract infection, with a negligible risk for false-positive results (van de Pol et al., 2006; van den Hoogen et al., 2001; van der Hoek et al., 2004). In our study, when we utilized real-time PCR, coinfections were detected in 43.7% of cases and only in 1.1% by DIF. Van de Pol et al. described a high prevalence of multiple viral coinfections (35%) in their population (van de Pol et al., 2006). In other previous studies the detection rates varied considerably, ranging from 0.6 to 27% (Erdman et al., 2003; Weinberg et al., 2004). The total number of coinfections found in our work were not previously reported by other researchers working in this field, possibly reflecting the fact that respiratory pathogens, such as human bocavirus, human metapneumovirus and rhinoviruses, were not tested for, and hence not included, in other recent studies (Kuypers et al., 2006; Stralio et al., 2002). Similar results were observed only in one study where human bocavirus has been included (Weissbrich et al., 2006). When a single sample can contain as many as four or more viruses it becomes much more difficult to evaluate the clinical significance and the individual role of each and every virus present. Quantification of each individual viral nucleic acids present in a particular sample could give some clues on the relative

importance of these viruses for the infectious process. Quantitative analyses of NAPs is methodologically difficult because the quality of the specimens obtained varies from person to person depending on sampling technique and the condition of the patients' nasal mucosa (Christensen et al., 2008).

Apart from being more sensitive than DIF, real-time PCR is also able to detect microorganism that are difficult to culture, as well as microorganisms for which no DIF assay is commercially available (van de Pol et al., 2007). For instance, for the recently-described, human bocavirus was described (2005) and no commercial kits yet are available to identify its presence in clinical samples. In our case, hBoV, hMPV and RNV were identified by the real-time PCR assay only. Detection of hBoV, which was not included in the DIF panel, accounted for about 13.2% of the increased in virus identification. The hMPV and RNV accounted for an increased of 14.5% and 24.9%, respectively. Allander et al. suggest that 5% of all suspected respiratory virus infections are still unaccounted for, but this estimate is highly uncertain as 5% of patients may not actually experience virus infections or may be infected by a known virus which is not detected due to assay limitations (Allander et al., 2007).

In the average hospital laboratory, molecular amplification tests are done at most once a day and usually only on weekdays or are sent to a reference laboratory (Fox, 2007; Landry et al., 2008). In our laboratory, PCR for respiratory viruses is done from Monday to Saturday, once a day. The real-time PCR for all 10 viruses increased turnaround time in 42%. However, if we consider only the 4 most prevalent viruses (RSV, RNV, FLU A and hMPV) the turnaround time decreased from 5.0 hours to 3.0 hours, and no differences between DIF and real-time PCR are observed.

We also believe that PCR may be reserved for DIF-negative patients that corresponded to 15.8% of our samples. In the present study we observed that the costs of a real-time PCR assay for 10 respiratory viruses were much higher than screening by DIF assay. Even if we compare the detection of only the same viruses (RSV, FLU, PIV and ADV), the difference is still high (3.9-fold). Based on this, we designed a screening panel for real-time PCR that could be used in DIF negative samples. It contains the most prevalent viruses observed in our experience and also the main confounding cases. Accordingly, our recommendation is a four-viruses screening PCR assay that includes: RNV, FLU A, hMPV and hBoV. The costs of these reactions are 2.6-fold higher than DIF. The RSV was not included because the incidences by real-time PCR and DIF were similar and the gain would not be advantageous. A nucleic acid extraction kit that can extract both viral DNA and RNA simultaneously was used in our study. This can minimize the amount of samples required for the detection of both DNA and RNA viruses. At the same time, this can minimize the time, labor, and materials involved in nucleic acid extraction (Lam et al., 2007). Although reagent and instrument costs are higher for PCR than for DIF, real-time PCR requires less hands-on time per specimen than DIF, which is labor-intensive. Real-time PCR assays offer advantages over conventional PCR by providing lower risk of false-positive results due to amplicon contamination and identification of the etiologic agent in a clinically relevant time period (Kuypers et al., 2006).

Rapid and sensitive testing for a broad range of respiratory viruses is vital in the pediatric intensive care unit, and it can improve our understanding of severe viral respiratory infections (van de Pol et al., 2006). The multiplex nested PCR assays developed in this study improved the diagnostic yield in terms of the overall sensitivity as well as the spectrum of coverage for respiratory infections. Furthermore, the assay provided a rapid turnaround time, with results being available within the same day of specimen collection. The overall cost reduction may justify the routine use of these

broader-spectrum, rapid molecular diagnostic assays (Lam et al., 2007). Even if used on a limited basis, with its high sensitivity and specificity, ability to multiplex and rapid turnaround time, DIF still retains a clinical advantage over PCR as a first-line test (Landry et al., 2008). At our center, we suggest that PCR should be performed in negative DIF samples.

In conclusion, a real-time PCR considerably increases the diagnostic yields for respiratory viruses from patients admitted with respiratory symptoms within a clinically relevant time frame. This allows clinicians to initiate optimal patient management and to initiate adequate use of antiviral therapy or infection control (van de Pol et al., 2007).

References

- Allander, T., Jarthi, T., Gupta, S., Niesters, H.G., Lehtinen, P., Osterback, R., Vuorinen, T., Waris, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., van den Hoogen, B.G., Hyypia, T. and Ruuskanen, O., 2007. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 44, 904-10.
- Bellau-Pujol, S., Vabret, A., Legrand, L., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean-Lecherbonnier, J., Pozzetto, B., Ginevra, C. and Freymuth, F., 2005. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* 126, 53-63.
- Christensen, A., Nordbo, S.A., Krokstad, S., Rognlien, A.G. and Dollner, H., 2008. Human bocavirus commonly involved in multiple viral airway infections. *J Clin Virol* 41, 34-7.
- Erdman, D.D., Weinberg, G.A., Edwards, K.M., Walker, F.J., Anderson, B.C., Winter, J., Gonzalez, M. and Anderson, L.J., 2003. GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. *J Clin Microbiol* 41, 4298-303.
- Fox, J.D., 2007. Nucleic acid amplification tests for detection of respiratory viruses. *J Clin Virol* 40 Suppl 1, S15-23.
- Jennings, L.C., Anderson, T.P., Werno, A.M., Beynon, K.A. and Murdoch, D.R., 2004. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J* 23, 1003-7.
- Kehl, S.C., Henrickson, K.J., Hua, W. and Fan, J., 2001. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. *J Clin Microbiol* 39, 1696-701.
- Kuypers, J., Wright, N., Corey, L. and Morrow, R., 2005. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. *J Clin Virol* 33, 299-305.
- Kuypers, J., Wright, N., Ferrenberg, J., Huang, M.L., Cent, A., Corey, L. and Morrow, R., 2006. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol* 44, 2382-8.
- Lam, W.Y., Yeung, A.C., Tang, J.W., Ip, M., Chan, E.W., Hui, M. and Chan, P.K., 2007. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 45, 3631-40.
- Landry, M.L., Cohen, S. and Ferguson, D., 2008. Prospective study of human metapneumovirus detection in clinical samples by use of light diagnostics direct immunofluorescence reagent and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 46, 1098-100.

- Straliotto, S.M., Siqueira, M.M., Muller, R.L., Fischer, G.B., Cunha, M.L. and Nestor, S.M., 2002. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35, 283-91.
- van de Pol, A.C., van Loon, A.M., Wolfs, T.F., Jansen, N.J., Nijhuis, M., Breteler, E.K., Schuurman, R. and Rossen, J.W., 2007. Increased detection of respiratory syncytial virus, influenza viruses, parainfluenza viruses, and adenoviruses with real-time PCR in samples from patients with respiratory symptoms. *J Clin Microbiol* 45, 2260-2.
- van de Pol, A.C., Wolfs, T.F., Jansen, N.J., van Loon, A.M. and Rossen, J.W., 2006. Diagnostic value of real-time polymerase chain reaction to detect viruses in young children admitted to the paediatric intensive care unit with lower respiratory tract infection. *Crit Care* 10, R61.
- van den Hoogen, B.G., de Jong, J.C., Groen, J., Kuiken, T., de Groot, R., Fouchier, R.A. and Osterhaus, A.D., 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7, 719-24.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J. and Berkhout, B., 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 10, 368-73.
- Weinberg, G.A., Erdman, D.D., Edwards, K.M., Hall, C.B., Walker, F.J., Griffin, M.R. and Schwartz, B., 2004. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* 189, 706-10.
- Weissbrich, B., Neske, F., Schubert, J., Tollmann, F., Blath, K., Blessing, K. and Kreth, H.W., 2006. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *BMC Infect Dis* 6, 109.

Tables Legends

Table 2 Legend: 0: negative sample; 1: one positive virus; 2: two positive viruses; 3: three positive viruses; 4: four positive viruses).

Table 3 Legend: FLUA: influenza A; FLUB: influenza B; RSV: respiratory syncytial virus; PIV1: parainfluenza 1; PIV2: parainfluenza 2; PIV3: parainfluenza 3; ADV: adenovirus. Kappa coefficient: 0-0.3 weak agreement, 0.3-0.6 regular agreement, 0.6-0.9 strong agreement, 0.9-1.0 very strong agreement, 1.0 ideal/perfect agreement. NA: no statistics is possible.

Table 1: Primer sequences designed for real-time PCR and melting temperatures of each pathogen

Pathogen	Sequence (5' → 3')	Target gene	Melting Temperature	Reference
RSV	RSV-LC-F1: TGGGAGAGGTAGCTCCAGAA RSV-LC-R: CAGATCTRCCCCCTGCTGCT	Nucleo-capsid protein	± 78,4°C	This study
Influenza A	INFA-LC-F: TCACCATTGCCTTCYCTTCC INFA-LC-R: CTGCTTCTCCAAGCGAATCT	Nuclear export protein (NEP)	± 80,8°C	This study
Influenza B	INFB-LC-F: CTGATGTCCATCAAGCTCCA INFB-LC-R: CCTTTGACATCTGCATCAGC	Nucleoprotein (NP)	± 84,9°C	This study
Parainfluenza 1	PIV1-LC-F: GGAAAACAAWTAGTTCATATTGGTC PIV1-LC-R: TGCATTGTTGTTGCAATCAGT	Hemagglutinin-neuraminidase	± 79,9°C	This study
Parainfluenza 2	PIV2-LC-F: TGATGGAATCAATCGCAAAA PIV2-LC-R: GAAAGCAAGTCTCAGTTCAGCTA	Hemagglutinin-neuraminidase	± 76,9°C	This study
Parainfluenza 3	PIV3-LC-F: AATCGAGAGTRAACCCAGTCATAA PIV3-LC-R1: TGTTATAGTGTGTAATGCAGCTYGT	Hemagglutinin-neuraminidase	± 82,0°C	This study
Adenovirus	ADNU-LC-F: TTCCCCATGGCNCACAAYAC ADNU-LC-R: TGCCKRCTCATRGGCTGRAAGTT	Hexon protein	± 84,7°C	This study
Rhinovirus	RNV-A-LC-F1: TAGTAGACCTGGCAGATGAGG RNV-A-LC-R1: ACACGGGGCTCTTCRCAC RNV-A-LC-F2: TACTAAACCTGGCAGATGAGG RNV-A-LC-R2: ACAATAGGCTCTTCACAC	5'UTR	± 86,0°C	This study
Human Metapneumovirus	HMPV-LC-F11: ATGGCAAAGCATTAGGCTCA HMPV-LC-R11: TGTTGGATGACCTGGCAAT HMPV-LC-R12: TGTTAGATGACCTGGCAAT HMPV-LC-R13: TGTTAGATGACCTGGCGAT	Nonfunctional nucleoprotein (N)	± 81,3°C	This study
Human Bocavirus	HBOV-LC-F1: GTCCAGAAAGAGGGGAGAGG HBOV-LC-R1: GCTGATTGGGTGTTCCCTGAT	NP-1	± 86,1°C	This study
Bordetella pertussis	BPT2 F1 – ACGCAGTGGCCTAGTACCAG BPT2 R1 – GCGGTAAGGTCCGGTAAAG	IS481	± 90,0°C	This study
Mycoplasma pneumoniae	MPN1 F1 - AAGGACCTGCAAGGGTTCGT MPN2 R1 - CTCTAGCCATTACCTGCTAA	16S	± 78,0°C	This study

Table 2: Real-time PCR and DIF results

Number of viruses	Real-time PCR for all 10 viruses	Real-time PCR for 7 viruses	DIF for 7 viruses
	n.of samples (percent)	n.of samples (percent)	n.of samples (percent)
0	46 (10.1)	97 (21.3)	208 (45.7)
1	210 (46.2)	321 (70.6)	242 (53.2)
2	144 (31.6)	37 (8.1)	5 (1.1)
3	47 (10.3)	-	-
4	8 (1.8)	-	-
Total	455 (100.0)	455 (100.0)	455 (100.0)

Table 3: Individual comparison between DIF and real-time PCR.

Measure of Agreement	Pearson Chi-Square	Kappa
FLUA	< 0.05	.117
FLUB	< 0.05	.060
RSV	< 0.05	.463
PIV1	NA	NA
PIV2	0.962	.002
PIV3	< 0.05	.412
ADV	< 0.05	.491

Table 4: Globally comparison between DIF and real-time PCR, considering 7 viruses analyzed for both methodologies (FLU A; FLU; RSV; PIV1, 2 and 3, ADV)

		<i>DIF</i>		Total
		Negative	Positive	
Real-time PCR	Negative	71 (73.2%)	26 (26.8%)	97 (100.0%)
	Positive	137 (39.1%)	213 (60.9%)	350 (100.0%)
Total		208 (46.5%)	239 (53.5%)	447 (100.0%)

VII. ARTIGO 2

Artigo submetido ao periódico “*Journal of Clinical Virology*” em 12 de maio de 2009, conforme Guide for Authors.

Detection of human Bocavirus and human Metapneumovirus by Real-Time PCR from Patients with Respiratory Symptoms in Southern Brazil

Diogo André Pilger ^{a,e}, Vlademir Vicente Cantarelli ^{b,e}, Sérgio Luis Amantea ^c, Sandra Leistner-Segal ^{a,d,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo – RS239, 2755, CEP 93510-250, Novo Hamburgo, RS, Brazil

^c Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – Rua Sarmiento Leite, 245, CEP 90055-170, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Laboratório Weinmann LTDA, Porto Alegre – Rua Ramiro Barcelos 910, CEP 90035-902, Porto Alegre, RS, Brazil

Abbreviattons: hMPV, human metapneumovirus; hBoV, human bocavirus; RSV, respiratory syncytial virus; FLU, influenza virus; PIV, parainfluenza virus; ADV, adenovirus, RNV, rhinovirus; PERT, *Bordetella pertussis*; MYC, *Mycoplasma pneumoniae*, ARTI, acute respiratory tract infection; NAP, nasopharyngeal aspirate; NAT, nucleic acid test; PCR, polymerase chain reaction.

* *Corresponding author:* Tel: +55-51-2101-8011 ; Fax: +55-51-2101-8010
E-mail address: ssegal@hcpa.ufrgs.br (Sandra Leistner-Segal)

Words in the abstract: 232

Words in the text: 2240

Abstract

Backgrounds: The introduction of newer molecular methods led to the discovery of new respiratory viruses, such as the human metapneumovirus (hMPV) and human bocavirus (hBoV) in respiratory tract specimens.

Objectives: We have studied the occurrence of hMPV and hBoV in Porto Alegre metropolitan area, one of the southernmost cities of Brazil, evaluating children suspecting low respiratory tract infection in a 13-months period (May 2007 to June 2008). *Study Design:* A Real-Time PCR method was used for amplification and detection of hMPV and hBoV, evaluate coinfections with others respiratory pathogens, temporal distribution and climatic variables.

Results: Of the 455 nasopharyngeal aspirates tested, hMPV was detected in 14.5% of samples and hBoV in 13.2%. A unique causative viral agent was identified in 46.2% of samples and the coinfection rate of was 43.7%. For hBoV, 98.3% of all positive samples were from patients with mixed infections. Similarly, 84.8% of all hMPV-positive results were also observed in mixed infection. Both, hBoV and hMPV normally appeared associated with RSV, mainly in winter months. No correlations were observed between hMPV and hBoV distributions and temperature, humidity and rainy season.

Conclusions: In summary, this study is the first study that confirms that hMPV and hBoV circulate in Porto Alegre and provide evidences of frequent involvement of both viruses in children with clinical signs of viral respiratory tract infection with lower airways obstruction acute, but exist merely as coinfection agents.

Key-words: Human Metapneumovirus, Human Bocavirus, Real-Time PCR, Respiratory Tract Infection

Background

Respiratory tract infections are caused by a broad spectrum of microbial agents, mostly viruses. The classical spectrum of respiratory viruses includes respiratory syncytial virus (RSV), influenza viruses A (FLU A) and B (FLU B), parainfluenzaviruses (PIV), adenovirus (ADV), and rhinoviruses (RNV). In recent years, the introduction of newer molecular methods led to the discovery of new respiratory viruses, such as the human metapneumovirus (hMPV) and human bocavirus (hBoV) in respiratory tract specimens.¹

hBoV is a newly discovered parvovirus that was first identified in Sweden from pooled nasopharyngeal aspirate specimens.² The virus was detected in respiratory samples of children with acute respiratory disease, with incidence rates ranging from 3% to 19%. However, the pathogenic role of hBoV is uncertain because others viruses have been frequently detected in hBoV-positive samples from children with acute respiratory tract infection (ARTI).³

hMPV is a new member of the family *Paramyxoviridae*, subfamily *Pneumovirus*.⁴ Prospective studies based on young children with ARTI showed that 3.9-9% of respiratory infections are related to hMPV.⁵

The use of nucleic acid testing (NAT) by diagnostic virology laboratories provides the scope for much more effective testing of samples obtained from individuals with respiratory and other infection.⁶

Objectives

We have studied the occurrence of hBoV and hMPV in Porto Alegre metropolitan area, one of the southernmost cities of Brazil, evaluating children suspecting low respiratory tract infection in a 13-months period.

Study Design

Study population

Infants (<24 months) admitted to the pediatric emergency room of Santo Antônio Children's Hospital (Porto Alegre – Brazil), who presented with clinical signs of viral respiratory tract infection with lower airways obstruction accompanied by widespread crackles and/or wheezing were included. Nasopharyngeal aspirates were prospectively collected from May 2007 to June 2008. This routine has been applied for all patients whenever a viral respiratory tract infection was suspected. For all eligible cases a specific questionnaire was filled.

Nucleic acid extraction and cDNA synthesis

A total of 455 nasopharyngeal aspirates (NPA) were kept frozen at – 70°C were used for total nucleic acids extraction, which were isolated from 200µL of each buffered respiratory specimen using the QIAmp UltraSens Virus Kit (Qiagen).

Real-time PCR

A two-step reverse-transcriptase PCR method was used for amplification and detection of RNA viruses (RSV, FLU A and B, PIV 1, 2 and 3, RNV and hMPV). The reverse transcription step was performed using random hexamers and SuperSript III First-Strand (Invitrogen), in accordance with manufacture's recommended protocol. Multiplex real-time PCR assays were developed in two panels: RSV, FLU A and B (panel 1) and PIV 1, 2 and 3 (panel 2). The other viruses (RNV, ADV, hBoV and hMPV) were detected by a singleplex virus-specific PCR. All amplifications and detections were performed using the LightCycler instrument (Roche Diagnostics) and identification of individual viruses was assessed by melting curve analysis. Additionally, the presence of two atypical pathogens, *Bordetella pertussis* (PERT) and *Mycoplasma pneumoniae* (MYC) were determined by a specific, lab-developed, real-time PCR

assay. Primers were especially designed from consensus genome regions obtained from DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (Manuscript prepared).

Results

Four-hundred and fifty-five NPA collected from 433 patients spanning a one-year period were tested. The average age of the study population was 5.46 (4.90 – 6.02) months and 57.6% were male. The age analyses showed that only hBoV was influenced by this variable. The average age of hBoV-positive children was 7.5 months, while hBoV-negative was 5.1 months ($p < 0.05$). The average age of hMPV-positive was 5.9 months, while hMPV-negative was 5.4. hMPV and the other viruses and the two bacteria included in this study showed no statistically significant difference between positive and negative samples. When we evaluated the influence of gender, we observed no statistical significance for all viruses and the two bacteria, even considering the fact that male patients were more prevalent for all viruses.

Of the 455 samples tested, 409 (89.9%) were positive for at least one of 10 respiratory viruses tested in this protocol. RSV was detected in 222 samples (49.3%), FLU A in 94 (20.9%), FLU B in 30 (6.7%), PIV 1 in 7 (1.6%), PIV 2 in 2 (0.4%), PIV 3 in 26 (5.8%), ADV in 9 (2.0%), RNV in 112 (24.9%), hMPV in 66 (14.5%) and hBoV in 60 (13.2%). A unique causative viral agent was identified in 210 (46.2%) samples. Of these 409 viruses-positive samples, 199 were also positive for additional viruses, resulting in a coinfection rate of 43.7%. Double infections were detected in 144 (31.6%) samples, triple infections in 47 (10.3%) samples and 8 (1.8%) samples showed 4 different viruses. The two bacterial pathogen PERT and MYC were detected in 29 (6.4%) and 14 samples (3.1%), respectively. The 10 most prevalent pathogens profile of our positive samples are shown in table 1.

Insert Table 1.

Among the 210 samples positive for a single virus, 122 (26.8%) were positive only for RSV, 40 (8.8%) only for FLU A, 18 (4.0%) only for RNV, 10 (2.2%) only for hMPV, 6 (1.3%) only for PERT, 4 (0.9%) only for FLU B, 4 (0.9%) only for PIV 3, 2 (0.4%) only for PIV 1 and 1 (0.2%) only for hBoV. The others pathogens were not identified alone.

Interestingly, both hBoV and hMPV were far more frequently found in mixed viral infections, together with other respiratory viruses. For hBoV, 98.3% of all positive samples (59 cases) were from patients with mixed infections. Similarly, 84.8% of all hMPV-positive (56 cases) results were also observed in mixed infection. Both, hBoV and hMPV normally appeared associated with RSV.

The analysis temporal distribution analysis during the 2007-2008 period for all viruses showed that the majority of the viral episodes were more frequent in June-July 2007 and June 2008 (61.1% of all cases), which represents the winter months in the Southern Hemisphere. In this period, hMPV showed a peak of infection ($n = 18$) coinciding with the RSV-associated peak ($n = 56$). The temporal distribution of RSV and hMPV infections in the following season showed that the episodes shifted 1 month forward for hMPV compared to RSV. In the hBoV analyses, we observe that the pick of infection ($n = 22$) coincided with the RSV distribution in both years, again correlating with the winter season. The monthly distributions of the viruses detected over a 13-months period in this study are shown in figure 1 and table 2.

Other aspects evaluated were the correlation between average temperature, rainy season, and relative humidity with the distribution of the respiratory viruses and the two bacteria. A significant positive association between RSV frequency and average temperature was observed, displaying a maximum peak correlated to the minimum mean monthly temperature (14.2°C). Interestingly, we observed an association

between the detection of *B.pertussis* and the average temperature and precipitation. A significant positive association between *B.pertussis* frequency and average temperature was observed, appearing when temperature was slightly higher (17.4°C). A similar profile was observed for rainy season, with *B. pertussis* appearing when the rainy was high (9.5 mm). The two viruses (hBoV and hMPV) not showed any association with climatic variables. All meteorological data were obtained from 8th Meteorology District, Porto Alegre, Brazil.

Insert Figure 1

Insert Table 2

Conclusions

In this study, hMPV was found in 14.5% of all children suspecting low respiratory tract infection. The prevalence found in our study is similar to the 4 -18% prevalence reported by others in different parts of the world, using real-time PCR methods.⁷⁻¹⁰ Debur *et al.*, analyzing hospitalized children with ARTI in Curitiba (Brazil), found a prevalence of 6.4% for hMPV.¹¹ The fact that we found a much higher prevalence in our study could probably reflect the heterogeneity of the population being analyzed. Silva *et al.*, investigating the presence of hMPV in NAPs from children with ARTI, demonstrated that this virus caused 5.6% of cases in the region of Campinas (Brazil).¹² It is interesting to note that Curitiba and Campinas are located North of Porto Alegre and the lower infection rates found by these authors could be related to other variables, such as the population density of those cities, socioeconomic factors, climate changes, etc.

Among the 84.8% of hMPV-positive specimens that were found in association with another respiratory pathogen, RSV was the most prevalent, which is similar to the

findings reported by others.^{8, 13} Greensill *et al.* analyzed bronchoalveolar lavage fluids collected from infants with RSV bronchiolitis and found that 70% of them were co-infected with hMPV.¹⁴ In contrast, Vicente *et al.* found no hMPV coinfections with any other respiratory viruses in a pediatric population with ARTI; however, this study is discordant from the majority of recently published studies.¹⁵ The simultaneous presence of hMPV and RSV may simply reflect a considerable seasonal distribution overlap of the two viruses.¹⁰ In the present report, hMPV was detected as a unique respiratory pathogen in 2.2% of the cases only. Some recent studies also indicate that hMPV could play a role as a cofactor, especially in association with RSV, and that this dual respiratory infection may increase the severity of the respiratory disease.¹⁶ Surprisingly, the results obtained by Cuevas *et al.* in Aracaju (Northwest of Brazil) showed that hMPV alone was responsible for 17.0% of the respiratory acute respiratory tract infection.¹⁷ Although the detection of viral nucleic acid in respiratory specimens does not prove that hMPV is responsible for the patients' illness, the association between a respiratory tract disease and the presence of the virus suggests a causative role.

During this study, hMPV seasonal distribution was characterized by two peaks within the winter period, similar to those previously observed in others works.^{9, 18, 19} In another Brazilian study, Debur *et al.* also observed that hMPV circulated during winter and spring.¹¹ The seasonal occurrence of hMPV infection largely overlaps with that of RSV infections.⁴ Despite this, no correlation between the hMPV and low temperatures, rainy periods and elevate humidity was observed. In the Curitiba's study, hMPV circulation could only be correlated with low temperatures.¹¹

The average age of 5.9 months for hMPV-positive children in our study is different to that reported by others, where the average age was 11.5 months^{7, 9, 20} However, in another study performed in Brazil, the average age was 4.4 months, which is similar to that observed in this work. In both studies, the distribution oh hMPV infection was the

same for boys and girls.¹¹ Similar results were observed by Reina *et al.* in Spain.²¹ Williams *et al.* showed that male gender was associated with a increased risk of lower respiratory tract disease.²⁰

The prevalence of hBoV infection among hospitalized children with respiratory tract infection range between 1.5% and 18.3%.^{2, 22, 23} The prevalence found in this study (13.2%) is one of the highest reported so far. This result may be explained by the preselection of severely diseased young children. Besides, rather than geographic differences in hBoV circulation, this discrepancy may be explained by differences observed in the patients studied so far. Several investigations included exclusively hospitalized children while others enrolled either hospitalized and outpatient children.²⁴

The results of our study show a coinfection rate of 98.3%, with only one case of a single hBoV infection. The percentage found in the majority of the studies, show coinfection rates ranging from 18% to 72%.^{23, 25} The RSV was the most prevalent pathogen associated with hBoV in all studies, including ours. Esposito *et al.* demonstrated that the role of hBoV alone seems to be marginal in children attending an emergency room for acute disease and that it becomes important only when it is associated with other viral pathogens.²⁶ The high coinfection rates may also suggest that hBoV could increase the pathogenicity potential of others viruses. An alternative hypothesis is that hBoV infection results in long-term shedding of the virus, even long after symptoms have subsided. This shedding could facilitate the infection by other pathogens.²⁷

According to the current literature, hBoV occur in children across a range of months. The peak “respiratory season” varies from year to year. Therefore, it is not feasible to draw conclusions concerning the epidemiology of a newly identified virus based on snapshot analyses of a single season or even multiple respiratory seasons.²⁸ Most

authors observed a higher prevalence of hBoV infection in cold winter and spring months.²⁹ Our study suggests that hBoV also have a seasonal distribution, similar to hMPV, occurring in winter months. Human parvovirus B19, the only parvovirus that is pathogenic for humans, is also seasonal, with peak occurrences in spring and summer.³⁰ Bastien *et al.* observed no seasonal prevalence, but this may have been caused by the low prevalence in this study.²²

Most children infected with hBoV have been younger than 24 months, but older children may also be affected.²⁸ Our work indicates that the average age is 7.5 months for hBoV-positive children.

In our study, hMPV and hBoV exist merely as coinfection agents, in mixed infections with other respiratory viruses, a finding that has only been occasionally reported.^{31, 32} When a single sample can contain as many as three or more viruses it becomes difficult to evaluate the individual significance of each virus. One way to solve this problem would be to quantify the viral nucleic acids. Quantitative analysis of nasopharyngeal aspirates is methodologically difficult because the quality of the specimens obtained varies from person to person depending on sampling technique and condition of patients' nasal mucosa.³³

In summary, using a real-time PCR-based detection, this study has confirmed that hMPV and hBoV circulate in Porto Alegre metropolitan area and provided evidences of frequent involvement of both viruses in ARTI, although a casual relationship still needs to be demonstrated by including a control group of healthy persons.

Conflict of Interest

None competing interests

Ethics

Ethical approval: the study was approved by Ethic Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (n. 06-549)

References

1. Neske F, Blessing K, Tollmann F, et al. Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2007;45(7):2116-22.
2. Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44(7):904-10.
3. Longtin J, Bastien M, Gilca R, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis* 2008;14(2):217-21.
4. Chan PC, Wang CY, Wu PS, et al. Detection of human metapneumovirus in hospitalized children with acute respiratory tract infection using real-time RT-PCR in a hospital in northern Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2007;106(1):16-24.
5. Manoha C, Espinosa S, Aho SL, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol* 2007;38(3):221-6.
6. Manning A, Russell V, Eastick K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 2006;194(9):1283-90.
7. Kuypers J, Wright N, Corey L, Morrow R. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. *J Clin Virol* 2005;33(4):299-305.
8. Boivin G, De Serres G, Cote S, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003;9(6):634-40.
9. Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, et al. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2004;10(4):700-5.
10. Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, et al. Human Metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Virol* 2004;30(3):267-70.
11. do Carmo Debur M, Bordignon J, Duarte dos Santos CN, et al. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol* 2007;39(1):59-62.
12. da Silva LH, Spilki FR, Riccetto AG, de Almeida RS, Baracat EC, Arns CW. Variant isolates of human metapneumovirus subgroup B genotype 1 in Campinas, Brazil. *J Clin Virol* 2008;42(1):78-81.
13. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3043-5.
14. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003;9(3):372-5.
15. Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Trallero E. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9(5):602-3.
16. Bouscambert-Duchamp M, Lina B, Trompette A, Moret H, Motte J, Androletti L. Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2005;43(3):1411-4.

17. Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003;9(12):1626-8.
18. van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23(1 Suppl):S25-32.
19. Gray GC, Capuano AW, Setterquist SF, et al. Human metapneumovirus, Peru. *Emerg Infect Dis* 2006;12(2):347-50.
20. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004;350(5):443-50.
21. Reina J, Ferres F, Mena A, Figuerola J, Alcoceba E. [Clinical and epidemiological characteristics of respiratory infections caused by human metapneumovirus in pediatric patients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(2):72-6.
22. Bastien N, Brandt K, Dust K, Ward D, Li Y. Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006;12(5):848-50.
23. Kaplan NM, Dove W, Abu-Zeid AF, Shamoan HE, Abd-Eldayem SA, Hart CA. Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg Infect Dis* 2006;12(9):1418-20.
24. Pozo F, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Cuesta I, Perez-Brena P, Casas I. High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J Clin Virol* 2007;40(3):224-8.
25. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(36):12891-6.
26. Esposito S, Bosis S, Niesters HG, et al. Impact of human bocavirus on children and their families. *J Clin Microbiol* 2008;46(4):1337-42.
27. Naghipour M, Cuevas LE, Bakhshinejad T, Dove W, Hart CA. Human bocavirus in Iranian children with acute respiratory infections. *J Med Virol* 2007;79(5):539-43.
28. Schildgen O, Muller A, Allander T, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev* 2008;21(2):291-304, table of contents.
29. Volz S, Schildgen O, Klinkenberg D, et al. Prospective study of Human Bocavirus (HBoV) infection in a pediatric university hospital in Germany 2005/2006. *J Clin Virol* 2007;40(3):229-35.
30. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(3):485-505.
31. Ong BH, Gao Q, Phoon MC, Chow VT, Tan WC, Van Bever HP. Identification of human metapneumovirus and *Chlamydia pneumoniae* in children with asthma and wheeze in Singapore. *Singapore Med J* 2007;48(4):291-3.
32. Semple MG, Cowell A, Dove W, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005;191(3):382-6.
33. Christensen A, Nordbo SA, Krokstad S, Rognlien AG, Dollner H. Human bocavirus commonly involved in multiple viral airway infections. *J Clin Virol* 2008;41(1):34-7.

Table 1: Pathogens profile by real-time PCR.

	Pathogens	Frequency	Percent
1	RSV	122	26.8
2	FLU A	40	8.8
3	RSV + RNV	25	5.5
4	RNV	18	4.0
5	RSV + hBoV	15	3.3
6	RSV + hMPV	14	3.1
7	FLU A + RNV	13	2.9
8	hMPV	10	2.2
9	RSV + PERT	7	1.5
10	RSV + hBoV + RNV	6	1.3
	Total	270	59.3

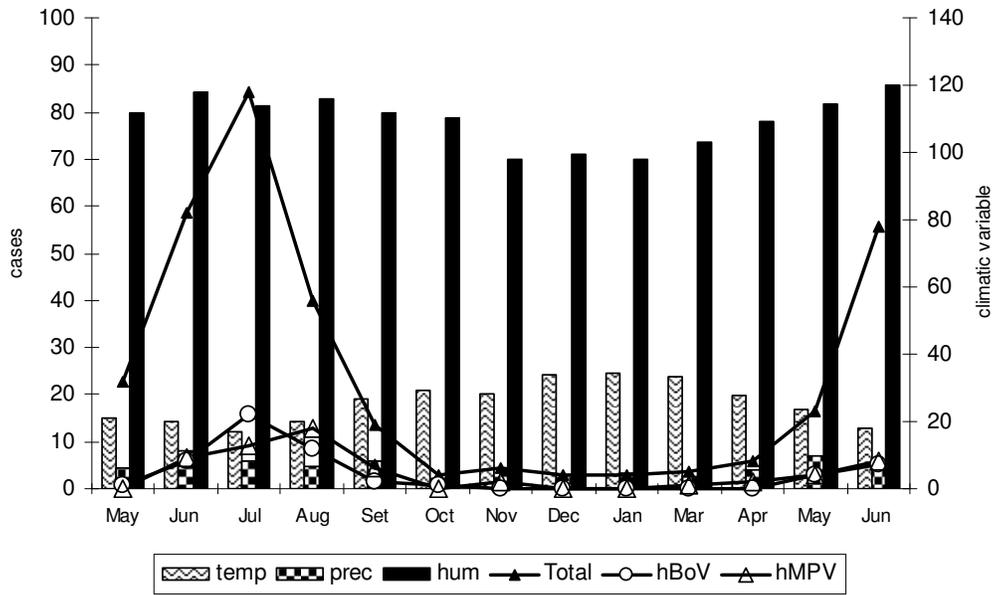
Legend: 1: RSV only; 2: FLU A only; 3: RSV and RNV; 4: RNV only; 5: RSV and hBoV; 6: RSV and hMPV; 7: FLU A and RNV; 8: hMPV only; 9: RSV and PERT; 10: RSV, hBoV and RNV.

Table 2: Monthly distributions for all viruses over 13-months study period.

		Total	hBoV	hMPV	RNV	FLUA	FLUB	RSV	PIV 1	PIV 2	PIV 3	ADV	PERT	MYC
2007	May	32	1	0	10	3	1	16	1	1	0	0	2	2
	Jun	82	8	9	12	21	1	40	2	0	1	1	5	2
	Jul	118	22	13	18	32	8	56	2	1	12	1	1	5
	Aug	56	12	18	22	13	7	21	1	0	10	2	0	1
	Sep	19	2	6	10	5	2	2	0	0	3	1	2	0
	Out	4	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Nov	6	0	2	3	0	1	0	0	0	0	0	2	0
	Dec	4	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	4	0
2008	Jan	4	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	4	0
	Mar	5	0	1	4	0	0	3	0	0	0	0	2	0
	Apr	8	0	2	8	1	0	4	0	0	0	0	0	1
	May	23	4	4	9	3	3	13	0	0	0	1	1	0
	Jun	78	7	8	10	10	4	53	1	0	0	2	9	3

Observation: February 2008 there are no samples collected.

Figure 1: Monthly distributions for hBoV and hMPV.



Legend: Temp: average temperature (°C); Prec: accumulated rainy (mm); Hum: humidity (%); hBoV: human bocavirus; hMPV: human metapneumovirus; Total: all detected viruses.

VIII. Considerações Finais e Perspectivas

O objetivo inicial deste trabalho consistia em verificar se hBoV e hMPV, recentemente descritos, estavam presentes em nosso meio nos pacientes com sintomas de IRA. Em função de tratar-se de dois vírus ainda pouco estudados em nossa realidade, sua avaliação foi realizada em conjunto com patógenos tradicionalmente relacionados à IRA, com o objetivo de verificar uma possível associação entre os mesmos.

O conhecimento prévio de que os agentes etiológicos comumente relacionados à IRA distribuem-se de maneira desigual ao longo do ano sugeriu também de que o hBoV e hMPV pudessem, eventualmente, seguir o mesmo padrão, realizando-se uma avaliação no período de 13 meses.

Em função de estarmos inseridos em uma região climática que apresenta uma grande amplitude térmica, desequilíbrio na distribuição de chuvas e umidade ao longo do ano, foi proposto também verificar de que maneira estas medidas afetavam a distribuição dos agentes pesquisados.

Por último, avaliando inúmeros trabalhos que realizaram a comparação entre diversas metodologias para pesquisa de patógenos respiratórios, buscou-se confrontar a metodologia comumente empregada em nossos laboratórios – a imunofluorescência - com o PCR em Tempo Real, uma técnica que está sendo difundida cada vez mais na pesquisa de agentes infecciosos.

Neste sentido, as principais conclusões deste estudo foram:

- O hBoV e o hMPV estão presentes em nosso meio numa proporção elevada nesta população de pacientes analisados;
- Normalmente, estão associados a outros patógenos respiratórios, sugerindo um papel como coadjuvante na etiologia da IRA;
- Assim como observado nos outros agentes virais e bacterianos, seguem uma distribuição sazonal, com picos de prevalência nos meses de inverno, embora o número de pacientes pesquisados nas outras estações tenha decaído muito;
- Os dois vírus não apresentaram nenhuma associação com variações na temperatura, quantidade de chuva e umidade;
- É indiscutível a maior sensibilidade da metodologia molecular em relação à imunofluorescência na identificação de patógenos respiratórios.

Na conjugação de todos os resultados obtidos, algumas lacunas necessitam ser mais exploradas e podem servir como perspectivas para continuidade desta linha de pesquisa:

- Avaliação dos aspectos clínicos dos pacientes que se apresentavam infectados pelo hBoV e hMPV;
- Inclusão de grupo-controle para avaliação se o hBoV, hMPV e demais patógenos respiratórios estão presentes na população sadia. Destacam-se os aspectos relativos à seleção correta do grupo-controle: tipo de amostra, forma de coleta das amostras, idade dos indivíduos controles, época do ano em que serão coletados e ambiente aos quais estarão expostos;
- Desenvolvimento de uma técnica de PCR em Tempo Real quantitativa, ou mesmo semi-quantitativa, que permita o estabelecimento de um ponto de corte entre a viremia e a manifestação dos aspectos clínicos relativos à IRA.

IX. Anexo I

Perfil Epidemiológico das Infecções Virais do Trato Respiratório Inferior em Lactentes

Nome: _____ Idade: _____ meses

Hipótese Diagnóstica:

Tempo do início dos sintomas: _____ dias

Tratamento prévio: () sim () não

Qual tratamento: _____

Aleitamento materno: () sim () não

Prematuridade: () sim () não

Queixas:

() febre () tosse () dispnéia/chiado () cianose

() dificuldade para dormir () dificuldade para mamar

Outros: _____

Exame Físico:

Saturação O₂: _____

Temperatura axilar: _____

Total do Escore: _____

	0	1	2	3
FR	< 30	31 - 45	46 - 60	> 60
Sibilância	ausência	Exp final aud estet	Exp aud s/ estet	Ins / exp aud s/ est
Retrações	ausência	intercostal	furcular	Severa + BAN

Distensão abdominal: () sim () não

RX tórax: () hiperinsuflado () atelectasia () infiltrado () pneumonia

Pesquisa de Virus: () negativo () positivo - Qual? _____

Tratamento:

() O₂ CN () O₂ máscara () VM () BD neb () BD spray

() CE () ATB () Outro: _____

Destino:

() casa – horas de emergência: _____ () internação andar () UTI

Legenda:

Exp. Final Aud s/ Estet: expiração audível sem estetoscópio

Exp. Aud s/ Estet: expiração audível sem estetoscópio

Ins / Exp Aud s/ Estet: inspiração/expiração audível sem estetoscópio

BAN: batimentos das asas no nariz

CN: cateter nasal

CE: corticosteróide

VM: ventilação mecânica

BD: bronco-dilatador