

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Epidemiologia dos vírus respiratórios e avaliação das características genéticas
do vírus sincicial respiratório entre crianças atendidas no Hospital de Clínicas
de Porto Alegre

Fernanda de Paris

Porto Alegre, dezembro de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Epidemiologia dos vírus respiratórios e avaliação das características genéticas
do vírus sincicial respiratório entre crianças atendidas no Hospital de Clínicas
de Porto Alegre

Fernanda de Paris

Orientador: Dr. Afonso Luís Barth

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, dezembro de 2012.

CIP - Catalogação na Publicação

de Paris, Fernanda

Epidemiologia dos vírus respiratórios e avaliação das características genéticas do vírus sincicial respiratório entre crianças atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Fernanda de Paris. -- 2012. 120 f.

Orientador: Afonso Luís Barth.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. vírus sincicial respiratório. 2. influenzavirus. 3. adenovírus. 4. parainfluenza. 5. epidemiologia molecular. I. Barth, Afonso Luís, orient. II. Título.

Dedicatória

À minha família, especialmente a minha Júlia.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Afonso Luís Barth, pela confiança e estímulo a este meu retorno à pós-graduação desbravando um pouco da apaixonante Virologia.

Ao Prof. Ricardo de Souza Kuchenbecker, pelas sugestões aos trabalhos e palavras de incentivo.

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo companheirismo e pelo apoio neste trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa pela troca de experiências e pela amizade. Em especial a Caroline Beck e Luciana de Souza Nunes por embarcarem comigo na dedicação a este trabalho.

Aos meus pais, José & Odair, e minhas irmãs, Marina & Paula, por **TUDO**. Nunca agradecerei o suficiente a vocês.

Ao meu esposo, Ranier, e minha filha, Júlia, por todo o amor que me inspiram.

“What we observe is not nature itself, but nature exposed to our method
of questioning.”

Werner Heisenberg

Resumo

Introdução: As infecções respiratórias causam elevada morbidade e mortalidade, sendo os vírus os principais agentes destas doenças. O monitoramento e vigilância de vírus respiratórios, desde os mais conhecidos até os emergentes, são importantes para a gestão em saúde, orientando tempo de profilaxia e minimizando o impacto de epidemias nas comunidades.

Objetivos: Estudar a epidemiologia molecular do vírus sincicial respiratório (VSR) e descrever a epidemiologia dos seguintes vírus: influenza (IF), influenza A (H1N1), adenovírus (AdV) e parainfluenza (PIV) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para isso foram conduzidos três estudos: (1) caracterização das infecções respiratórias causadas por VSR, IF, AdV e PIV em crianças; (2) validação de uma técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para detecção de VSR A/B e IF A/B e (3) caracterização de genótipos do VRS em crianças com infecções comunitárias e hospitalares.

Métodos: No primeiro estudo foram levantadas as seguintes variáveis: casos de infecções respiratórias por VSR, AdV, PIV ou IF e H1N1; internações em enfermarias hospitalares e internações em unidades de terapia intensiva (UTI); infecções hospitalares e taxas de letalidade. As variáveis foram coletadas durante o atendimento de crianças (idade 0-12 anos) no HCPA entre 2007 e 2010. No segundo estudo, os alvos do ensaio de RT-PCR foram: o gene da proteína da matriz de IFA, o gene da hemaglutinina do IFB e o gene da nucleoproteína de RSVA/B. A especificidade do ensaio e seu limite de detecção foram determinados. Uma comparação entre RT-PCR e imunofluorescência indireta foi realizada. No terceiro estudo, 63 isolados de VSR (21 de origem nosocomial e 42 adquiridos na comunidade) foram sequenciados para estabelecer uma análise filogenética deste vírus.

Resultados: Cada um dos vírus estudados apresentou um comportamento diferente. O VSR demonstrou ser o principal agente envolvido em infecções nosocomiais. Já os pacientes com AdV, bem como o VSR, apresentaram altas taxas de admissão em UTI em 2007 e 2010. O AdV e o H1N1 tiveram as maiores taxas de letalidade. O ensaio de RT-PCR mostrou-se específico e foi mais sensível do que a imunofluorescência, sendo capaz de detectar co-infecções. Os seguintes limites de detecção foram obtidos: 1

cópia/mL para a IFA, 10 cópias/mL para IFB, 5 cópias/mL para RSVA e 250 cópias/mL para RSVB. A investigação dos genótipos de VSR revelou que todos os isolados VSRA circulantes eram do mesmo grupo filogenético, o genótipo NA1 de origem japonesa. Por outro lado, os isolados VSRB foram distribuídos em grupos diferentes: BA4, POA1, POA2, POA3 e POA4. Este estudo foi o primeiro que descreveu a circulação do genótipo NA1 no Brasil, bem como quatro novos genótipos (POA1, POA2, POA3 e POA4).

Conclusão: Os resultados obtidos no primeiro estudo demonstram o impacto das epidemias sazonais de vírus respiratórios. O segundo estudo corroborou relatos da literatura que técnicas moleculares, como RT-PCR, são adequadas para a detecção de vírus respiratórios. O terceiro estudo relatou genótipos emergentes de VSR. Estudos de vigilância como os descritos acima deveriam ser conduzidos periodicamente para acompanhar o padrão de comportamento dos vírus na população alvo.

Palavras-chave: vírus sincicial respiratório; vírus influenza; influenza A (H1N1); adenovírus; vírus parainfluenza; reação em cadeia da polimerase em tempo real; epidemiologia molecular.

Abstract

Background: Respiratory tract infections of viral origin are a major cause of morbidity and mortality worldwide. Surveillance of well-known viruses and emerging threats is important for management, prophylaxis and to minimize impact on the community.

Objective: To study the molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) and describe the epidemiology of viruses: influenza (IF), influenza A (H1N1), adenovirus (AdV) and parainfluenza (PIV) at Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Three studies were performed: (1) characterization of respiratory infections caused by RSV, IF, AdV and PIV in children, (2) validation of a technique of polymerase chain reaction in real-time (RT-PCR) to detect RSVA/B and IFA/B and (3) detection of genotypes of RSV in children with community- and hospital-acquired infection.

Methods: In the first study, variables such as number of cases of viral (RSV, AdV, PIV or IF and H1N1) infection, hospitalizations in general wards and intensive care units (ICUs), nosocomial infections and lethality rates were collected. These variables obtained from each children (age 0-12 years) between 2007 and 2010. In the second study the assay RT-PCR was used to target the matrix gene of IFA, the hemagglutinin gene of IFB and the nucleoprotein gene of RSVA/B. The specificity of the assay and its limit of detection were determined. A comparison of RT-PCR and indirect immunofluorescence was performed. In the third study, 63 RSV isolates (21 nosocomial and 42 community-acquired) were submitted to sequencing to establish a phylogenetic analysis of this virus.

Results: The different viruses presented a diversity of behaviors according to hospitalization, nosocomial outbreaks or lethality in children. RSV accounted for most nosocomial infections. Rates of ICU admission for AdV and RSV infection were highest in 2007 and 2010. During 2008–2009, H1N1 and AdV had the highest ICU admission rates. AdV and H1N1 had the highest lethality rates. The RT-PCR assay was more sensitive than immunofluorescence and it was able to detect viral co-infections. Furthermore, the limits of detection were 1 copy/ μ L for IFA, 10 copies/ μ L for IFB, 5 copies/ μ L for RSVA, and 250 copies/ μ L for RSVB. The genotyping study showed that hospital- and community-acquired RSVA isolates were from the same

phylogenetic group (the same group of the NA1 Japanese isolates). Conversely, RSVB isolates were distributed across different groups: BA4, POA1, POA2, POA3 and POA4. This was the first study to describe circulation of the NA1 genotype in Brazil, as well as four RSVB genotypes: POA1, POA2, POA3 and POA4.

Conclusion: The results obtained in the first study demonstrate the impact of seasonal epidemics of respiratory viruses. The second study confirmed that molecular techniques such as RT-PCR, are suitable for the detection of respiratory viruses. The third study reported emerging genotypes of RSV. Surveillance studies such as this should be performed periodically to monitor the behavior pattern of the virus in the target population.

Keywords: respiratory syncycial virus; influenza virus; influenza A (H1N1); adenovirus; parainfluenza virus; real time polymerase chain reaction; molecular epidemiology.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Descrição de espécies e sorotipos do gênero <i>Mastadenovirus</i>	18
Tabela 2 - Manifestações clínicas das adenoviroses, sorotipos virais mais frequentemente envolvidos e seus hospedeiros	21
Tabela 3 - Descrição das proteínas virais do influenza A, seus segmentos codificantes e funções	25
Tabela 4 - Descrição das proteínas virais dos vírus parainfluenza e funções	32
Tabela 5 – Descrição das proteínas virais do VSR e suas funções	37

Lista de Abreviaturas e Siglas

AdV: adenovírus

bDNA: *branched-DNA* (DNA ramificado)

CPE: efeito citopático

DNA: ácido desoxirribonucléico

EUA: Estados Unidos da América

FDA: *Food and Drug Administration* (Órgão governamental responsável pelo controle de alimentos e medicamentos nos EUA)

HA: hemaglutinina

HIV: human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)

HN: hemaglutinina-neuraminidase

IF: influenza

IFA: influenza A

IFB: influenza B

IFC: influenza C

LAMP: *Loop-mediated isothermal amplification* (amplificação isotérmica “loop”-mediada)

NA: neuraminidase

NASBA: *Nucleic acid sequence based amplification* (técnica de amplificação baseada em sequência de ácido nucléico)

NP: nucleoproteína

NS: proteína não-estrutural

Orf: *open reading frame* (fase de leitura aberta)

PA: componente ácido da polimerase viral

PB: componente básico da polimerase viral

PCR: *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pH: potencial de hidrogênio iônico

PIV: parainfluenza vírus

proteína F: proteína de fusão

proteína G: glicoproteína

proteína L: *large protein* (proteína grande)

proteína M: proteína da matriz

proteína N: nucleoproteína

proteína P: fosfoproteína

proteína SH: *small hydrophobic protein* (proteína hidrofóbica pequena)

RFLP: *restriction fragment length polymorphism* (análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição)

RNA: ácido ribonucléico

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

VSR: vírus sincicial respiratório

VSRA: vírus sincicial respiratório A

VSRB: vírus sincicial respiratório B

Sumário

1.0 Introdução	15
2.0 Revisão da Literatura	17
2.1 Adenovírus	17
2.1.1 <u>Aspectos gerais</u>	17
2.1.2 <u>Taxonomia</u>	17
2.1.3 <u>Descrição do agente e patogênese</u>	18
2.1.4 <u>Transmissão e Epidemiologia</u>	19
2.1.5 <u>Significância Clínica</u>	20
2.1.6 <u>Profilaxia e Tratamento</u>	22
2.2 Influenza	23
2.2.1 <u>Aspectos gerais</u>	23
2.2.2 <u>Taxonomia</u>	24
2.2.3 <u>Descrição do agente e patogênese</u>	24
2.2.4 <u>Transmissão e Epidemiologia</u>	26
2.2.5 <u>Significância Clínica</u>	28
2.2.6 <u>Profilaxia e Tratamento</u>	29
2.3 Parainfluenza	31
2.3.1 <u>Aspectos gerais</u>	31
2.2.2 <u>Taxonomia</u>	31
2.2.3 <u>Descrição do agente e patogênese</u>	32
2.2.4 <u>Transmissão e Epidemiologia</u>	33
2.2.5 <u>Significância Clínica</u>	34
2.2.6 <u>Profilaxia e Tratamento</u>	35
2.4 Vírus Sincicial Respiratório	36
2.4.1 <u>Aspectos gerais</u>	36
2.4.2 <u>Taxonomia</u>	36
2.4.3 <u>Descrição do agente e patogênese</u>	37
2.4.4 <u>Transmissão e Epidemiologia</u>	39
2.4.5 <u>Significância Clínica</u>	40
2.4.6 <u>Profilaxia e Tratamento</u>	40
2.5 Investigação laboratorial de vírus respiratórios	42
2.5.1 <u>Coleta e armazenamento de material</u>	42
2.5.2 <u>Métodos laboratoriais disponíveis</u>	43

2.5.2.1 Cultura viral	43
2.5.2.2 Testes imunológicos	44
2.5.2.3 Testes moleculares	45
2.5.3 <u>Métodos moleculares para tipagem viral</u>	47
3.0 Objetivos	49
3.1 Objetivos gerais	49
3.2 Objetivos específicos	49
4.0 Referências bibliográficas	50
5.0 Artigos	62
5.1 Artigo 1	
<i>Viral epidemiology of pediatric respiratory infections at a tertiary hospital in Southern Brazil</i>	62
5.2 Artigo 2	
<i>Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates</i>	80
5.3 Artigo 3	
<i>Emerging respiratory syncytial virus subgroups A and B among nosocomial and community-acquired pediatric infections in Southern Brazil</i>	95
6.0 Considerações finais	117
7.0 Informações complementares	119
8.0 Anexo	120

1.0 Introdução

As infecções respiratórias representam um grave problema de saúde pública no mundo devido a sua ampla distribuição e facilidade de disseminação na comunidade. A morbidade causada por estas infecções são elevadas, especialmente em grupos populacionais mais suscetíveis. A carga de doença por infecção respiratória é maior do que em outras infecções.¹ Por exemplo, mundialmente no ano de 2002, 18% da mortalidade em crianças menores de 5 anos de idade foi causada por infecções respiratórias, contra 15% de mortalidade por doenças diarreicas e 11% por malária.² Adicionalmente, infecções do trato respiratório inferior são a primeira causa de mortes em países de baixa renda e a terceira causa mundial em óbitos.³ Entre crianças, um estudo de revisão sistemática realizada por Black e colaboradores estimou em aproximadamente 1,5 milhões de mortes por infecções respiratórias em todo o mundo durante o ano de 2008.⁴ Anualmente, as infecções respiratórias apresentam impactos devastadores nas nossas sociedades, tais como altos custos de assistência médica, perda de produtividade e mortes.⁵

As infecções respiratórias incluem uma diversa gama de manifestações clínicas. Normalmente são classificadas como infecções respiratórias do trato superior (amigdalite, otite, rinofaringite, sinusite, laringotraqueíte ou crupe, entre outras) ou trato inferior (por exemplo, pneumonia e bronquiolite).^{1,6} Estas manifestações podem estar presentes nas diferentes fases da vida humana, porém as crianças tendem a ser as mais afetadas.⁷ As infecções respiratórias também têm sido reconhecidas como causa de doença entre grupos de adultos suscetíveis, como os idosos e adultos imunodeprimidos.⁸⁻¹¹

Os vírus são os agentes responsáveis pela maioria das infecções respiratórias. As viroses que infectam principalmente o trato respiratório incluem os vírus influenza e parainfluenza, adenovírus, rinovírus, coronavírus, bocavírus, metapneumovírus, enterovírus e vírus sincicial respiratório.¹² Porém, os vírus respiratórios têm comportamentos diferentes. Alguns têm distribuição sazonal como o vírus sincicial respiratório e influenza,^{13,14,15} enquanto que outros não têm relação com elementos climáticos, como o adenovírus.¹⁶ Muitos

podem ser agentes de surtos ou de pandemias como o adenovírus^{17,18} e o vírus influenza¹⁹, respectivamente. Algumas populações são alvo mais freqüentes de uma virose específica, como o caso das crianças que são muito afetadas pelo vírus sincicial respiratório, amplamente conhecido como o agente etiológico mais freqüente em infecções respiratórias do trato inferior como a bronquiolite.²⁰⁻²²

Estes diferentes comportamentos dos vírus respiratórios fazem com que o monitoramento destas viroses seja de grande importância. Adicionalmente o surgimento inesperado de vírus emergentes, tais como: vírus influenza A H5N1; metapneumovírus humano; SARS coronavírus; coronavírus NL63; bocavírus humano; vírus influenza A H1N1 (pandemia de 2009), fez crescer a importância da vigilância sobre os vírus respiratórios nos últimos dez anos.²³ Assim, o monitoramento e vigilância tanto de vírus respiratórios mais conhecidos como de ameaças emergentes inesperadas são importantes para a gestão em saúde e para minimizar o impacto das infecções respiratórias nas comunidades. Os estudos de vigilância viral são importantes para orientar tempo de profilaxia e outras possíveis intervenções clínicas. Por exemplo, a vigilância dos picos de vírus sincicial respiratório é importante para acompanhar a sazonalidade deste vírus e para o planejamento de profilaxia em crianças vulneráveis. Para a influenza, a vigilância é importante para a concepção de vacinas adequadas, planejamento de tempo para profilaxia e para a detecção de novos vírus. A estratégia de vigilância da doença respiratória tem o potencial de reduzir tanto os custos em saúde quanto a morbidade e mortalidade das infecções.²⁴

Assim, este trabalho está voltado para a descrição do cenário das infecções respiratórias causadas por influenza, vírus sincicial respiratório, adenovírus e parainfluenza entre crianças atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre os anos de 2007 a 2010. Neste trabalho também é apresentada uma metodologia molecular para detecção e diferenciação em subgrupos dos vírus influenza e sincicial respiratório. E, devido a grande importância do vírus sincicial respiratório entre as crianças, este trabalho visou estudar a epidemiologia molecular deste vírus com a genotipagem das cepas circulantes no ano de 2010.

2.0 Revisão da Literatura

Esta revisão tem como tema os quatro vírus respiratórios que são abordados neste trabalho: adenovírus, influenza, parainfluenza e vírus sincicial respiratório. Alguns aspectos destas quatro viroses são abordados, assim como a investigação laboratorial dos vírus respiratórios.

2.1 Adenovírus

2.1.1 Aspectos gerais

Os adenovírus (AdV) foram isolados pela primeira vez em 1953 em uma cultura de células adenóides humanas. Rowe e colaboradores descreveram o agente como “adenoid degeneration agent”, pois o vírus induzia a degeneração de células adenóides de crianças.²⁵ Subsequentemente, este mesmo agente foi descrito por outros pesquisadores - Hilleman e Werner – em amostras respiratórias obtidas de recrutas militares. Posteriormente demonstrou-se que os dois agentes eram relacionados e em 1956 cunhou-se o termo adenovírus para este vírus. Desde então múltiplos sorotipos deste vírus foram descritos, isolados de humanos e animais.²⁶ Em animais, especialmente em roedores, o AdV está bastante relacionado ao surgimento de tumores. Este fato não foi confirmado nos hospedeiros humanos de adenovirose e atualmente, este vírus está sendo utilizado como vetor em estudos de terapia gênica. Clinicamente o AdV tem uma ampla gama de manifestações clínicas, mas é muito relacionado a infecções respiratórias agudas, especialmente entre recrutas militares. Além disso, o AdV tem sido causa de preocupação nas infecções entre pacientes imunocometidos.^{16,26}

2.1.2 Taxonomia

Todos os adenovírus descritos estão agrupados taxonomicamente na família *Adenoviridae* que é subdivida em quatro gêneros: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* e *Mastadenovirus*.¹⁶ O gênero *Mastadenovirus* compreende os AdV que infectam mamíferos e, portanto este gênero compreende as espécies virais que infectam os humanos. O gênero

Mastadenovirus compreende 7 espécies (A até G; sendo a espécie B subdividida em B1 e B2) e 52 sorotipos,^{26, 27, 28} descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição de espécies e sorotipos do gênero *Mastadenovirus*.

Espécies	Sorotipos
A	12, 18, 31
B1	3, 7, 16, 21, 50
B2	11, 14, 34, 35
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51
E	4
F	40, 41
G	52

Adaptado de: Robinson & Echavarría, 2007; Jones et al., 2007.^{26,27}

2.1.3 Descrição do agente e patogênese

Os AdV possuem uma estrutura icosaédrica (capsídeo) não-envelopada medindo 70 a 90 nm de diâmetro protegendo seu DNA dupla fita de aproximadamente 36 Kb.²⁶ O capsídeo é composto de 252 subunidades (capsômeros), dos quais 240 são hexons e 12 são pentons ou complexos pentaméricos. Cada complexo pentamérico contém uma base e uma projeção de fibras, cujo comprimento varia entre os diferentes sorotipos.²⁹ Os hexons tem sítios antigênicos comuns a todos os adenovírus humanos, enquanto as fibras possuem determinantes antigênicos tipo-específico e alguns espécie-específicos. Estes antígenos das fibras são responsáveis por hemaglutinação *in vitro*.²⁶

O genoma viral contém aproximadamente 40 genes. Os principais são os genes de transcrição precoces (*early genes* - E1A, E1B, E2, E3 e E4), os expressos mais tardiamente na fase precoce (IX e IVa2) e os expressos tardiamente (*late genes* - L1 a L5). Em alguns sorotipos virais são também descritos *nontranslated genes*.²⁶

Toda esta estrutura viral com suas variantes pode interagir *in vivo* com as células de três diferentes maneiras: infecção produtiva, infecção latente ou persistente e causando transformação celular (oncogênese). A infecção produtiva ocorre principalmente em células mucoepiteliais. Já a infecção latente ocorre primariamente em células do tecido linfóide (como amídalas e adenóides). A transformação das células (ou oncogênese) pelo adenovírus não é relatada em células humanas, mas sim em infecções em roedores. Nestes casos o AdV se integra ao genoma da célula do hospedeiro e induz replicação celular sem a replicação viral.²⁶ Em geral a infecção se inicia pelas células epiteliais que revestem orofaringe ou intestino. As proteínas da fibra viral é que determinam a especificidade do vírus para célula-alvo.^{29,30} A atividade tóxica da proteína da base pentamérica pode resultar em inibição do transporte celular de RNAm e síntese protéica, arredondamento da célula hospedeira e lesão tecidual.³¹

2.1.4 Transmissão e Epidemiologia

As partículas virais de AdV resistem a ressecamento, detergentes e secreções do trato gastrointestinal. Portanto, estes vírus são considerados ubíquos. A ubiqüidade do AdV possibilita sua transmissão por fômites, além da transmissão respiratória e fecal-oral, que são as rotas tradicionais da circulação viral no organismo hospedeiro.^{26,31}

Infecções por AdV são comuns estimando-se que 1 a 5% das infecções respiratórias e 5 a 15% das diarréias agudas são adenovirozes.^{18,26} Estudo realizado em Porto Alegre entre crianças com sintomas respiratórios mostrou uma prevalência de 2% de AdV.³² Além de infecções respiratórias e gastrointestinais, muitas manifestações de conjuntivite estão associadas com infecções por AdV.^{18,26} Mais de 80% das infecções por AdV ocorrem em crianças menores de 4 anos devido a falta de imunidade humoral, mas pacientes imunodeprimidos são também mais suscetíveis. Surto por AdV podem ocorrer em crianças saudáveis ou adultos convivendo em ambientes fechados ou lotados (particularmente infecções em creches, hospitais, clínicas geriátricas e entre recrutas militares). Infecções “intra-familiares” são comuns. A grande maioria destes casos são infecções auto-limitadas. No entanto, o

espectro clínico é amplo, especialmente devido a grande variabilidade de sorotipos. A infecção disseminada por AdV ou pneumonia pode ser fatal, tanto em pacientes imunocompetentes como em imunocomprometidos.³³

O AdV não apresenta uma clara distribuição sazonal, ou seja, este vírus pode ter atividade durante todo o ano sem relação com temperatura e umidade.³⁴ Todos os sorotipos de adenovírus apresentam ampla distribuição global, sendo os sorotipos 1 a 5, 7, 21 e 41 os mais comumente associados com doença humana.¹⁶ Porém a prevalência dos sorotipos difere entre os países ou regiões e também conforme o período de tempo avaliado.^{28,35,36} Transmissão de novas cepas virais entre países ou mesmo entre continentes, causando a substituição dos sorotipos dominantes por cepas novas tem sido relatada.^{16,37} Exemplo desta situação foi demonstrado por diferentes estudos realizados para rastreamento do sorotipo 7. Este sorotipo (assim como outros sorotipos) pode ser dividido em diferentes genótipos e estudos realizados por Wadell e colaboradores demonstraram que AdV-7c e 7b foram predominantes na América do Norte, Europa e Austrália entre 1960 e 1980.³⁸ Em Pequim, China, o genótipo AdV-7d predominou nas décadas de 1980 e 1990 e foi responsável por surtos no Japão em 1995 e Coreia na década de 1990.^{17,39,40} Na América Latina, AdV-7b foi predominante em meados da década de 1980, quando houve a emergência de uma nova cepa (AdV-7h) na Argentina, Brasil e Chile.⁴¹⁻⁴³ Estes vários estudos enfatizam que novos sorotipos ou novos genótipos podem emergir como dominantes e geralmente apresentam virulência mais elevada ou maior transmissibilidade do que as cepas anteriores.¹⁶ Estas variantes novas são denominadas por alguns autores como cepas intermediárias. A rastreabilidade destas cepas é de grande importância clínico-epidemiológica especialmente por estas estarem envolvidas em adenovirose mais agressivas ou surtos.⁴⁴

2.1.5 Significância Clínica

Os AdV apresentam amplo espectro de manifestações clínicas, especialmente devido a grande variabilidade de sorotipos. Isso ocorre porque os diferentes sorotipos exibem tropismos por tecidos diferentes e este tropismo está correlacionado com as manifestações clínicas apresentadas pelo

hospedeiro, embora possa haver alguma sobreposição entre sorotipos e suas manifestações.^{26,37,45} O tropismo celular dos diferentes sorotipos é mediado pela fibra presente no capsídeo viral. Assim, diferenças no gene codificante da fibra estão diretamente relacionadas com diferenças no tropismo viral.^{16,46} Sendo assim, este vírus é importante clinicamente para vários grupos diferentes de pacientes,¹⁶ como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 – Manifestações clínicas das adenoviroses, sorotipos virais mais frequentemente envolvidos e seus hospedeiros.

Manifestação clínica	Sorotipos mais freqüentes	Hospedeiros mais freqüentes
Infecção do trato respiratório superior	1-3, 5, 7	Crianças
Infecção do trato respiratório inferior	3, 4, 7, 21	Crianças e adultos imunocomprometidos
Doença respiratória aguda	4, 7	Recrutas militares
Conjuntivite aguda	1-4, 7	Crianças
Conjuntivite aguda hemorrágica	11	Crianças
Febre Faringoconjuntival	3, 4, 7	Crianças
Ceratoconjuntivite Epidêmica	8, 9, 37	Indivíduos de qualquer idade
Gastroenterite	40, 41	Crianças
Cistite hemorrágica	11	Crianças e adultos imunocomprometidos
Hepatite	1-3, 5, 7	Crianças e adultos imunocomprometidos
Miocardite	7, 21	Crianças
Meningoencefalite	7	Crianças e adultos imunocomprometidos
Doença disseminada	1, 2, 5, 11, 34, 35	Adultos imunocomprometidos e recém-nascidos

Adaptado de: Robinson & Echavarría, 2007.²⁶

Assim, embora o AdV apresente uma ampla gama de manifestações clínicas, destacam-se as infecções respiratórias causadas por estes vírus. As infecções respiratórias por AdV são mais frequentes em crianças, apresentando um período de incubação entre 2 a 14 dias geralmente apresentando sintomas como: congestão nasal, febre, coriza, tosse, faringite,

adenopatias cervicais, podendo ou não ser acompanhados de otite média.²⁶ Estes sintomas normalmente são brandos e auto-limitados. Porém infecções por AdV no trato respiratório inferior (como bronquiolite, pneumonia) podem ser severas e algumas vezes fatais, principalmente em crianças abaixo de 2 anos de idade. Também estas infecções em pacientes hospitalizados, especialmente crianças, freqüentemente podem levar a graves conseqüências clínicas^{16,47} e, assim, estas infecções hospitalares por AdV são motivo de monitoramento constante pelas equipes de controle de infecção em hospitais. Já infecções respiratórias aguda por AdV são incomuns em adultos civis imunocompetentes, porém são frequentes os surtos entre os recrutas militares e as taxas de hospitalização nestes casos pode chegar a 50%.²⁶ Também entre pacientes imunocomprometidos a doença severa por AdV pode ocorrer. Taxas de mortalidade variáveis (entre 12 e 70%) são reportadas para pacientes pediátricos transplantados com órgãos sólidos ou adultos transplantados de medula óssea.⁴⁸ Nestes pacientes a cistite hemorrágica pode ser especialmente severa e um sinal do início da doença disseminada por AdV.²⁶ Infecção disseminada por AdV pode ser fatal, tanto em pacientes imunocompetentes como em imunocomprometidos.³³

2.1.6 Profilaxia e Tratamento

Um programa de vacinação contra AdV foi realizado entre os recrutas militares americanos durante os anos de 1971 e 1998. A vacina utilizada tinha aplicação oral e continha em sua formulação vírus vivo atenuado dos sorotipos 4 e 7, os mais comumente envolvidos nas infecções respiratórias agudas deste grupo populacional. Durante os anos de vigência do programa americano a morbidade e mortalidade por AdV entre os recrutas militares foram muito reduzidas. Porém em 1996, o único fabricante da vacina cessou sua produção e a profilaxia foi interrompida. Com a descontinuação da vacinação, os casos de infecções respiratórias agudas severas causadas por AdV ressurgiram. Assim, uma segunda geração da vacina contra os tipos adenovírus 4 e 7 foi aprovada pelo FDA nos Estados Unidos em março 2011 e o programa de vacinação contra AdV para recrutas militares americanos foi retomado em outubro de 2011.⁴⁹ Os recrutas militares parecem ser o único grupo alvo de profilaxia contra o AdV atualmente.

O tratamento de infecções AdV com antivirais é controverso, principalmente porque ensaios randomizados não têm sido realizados. Atualmente, o cidofovir é a droga de escolha para infecções graves AdV, mas nem todos os pacientes necessitam de tratamento. Normalmente são tratados pacientes imunocomprometidos com adenovirose severas. A necessidade de uma terapia para casos leves, mesmo entre pacientes imunocomprometidos, não é clara.¹⁶ A viremia por AdV pode ser assintomática e ter resolução espontânea.⁵⁰ Assim, o tratamento de AdV é reservado para pacientes imunocomprometidos sintomáticos ou com doença disseminada.¹⁶

2.2 Influenza

2.2.1 Aspectos gerais

O influenza (IF) vírus foi, provavelmente, o agente etiológico de doença descrita por Hipócrates no ano de 412 a. C. Sendo assim, este vírus tem circulação entre a população humana desde muito tempo.⁵¹ Porém o primeiro isolamento de IF vírus humano ocorreu somente em 1933, realizado por Smith, Andrewes e Laidlaw, pesquisadores do “National Institute for Medical Research” – Londres.⁵² Estes pesquisadores inocularam pela via intranasal em furões secreção de nasofaringe de um paciente infectado por IF. Os animais desenvolveram os sintomas da doença e transmitiram o vírus aos seus companheiros de gaiola. Ainda, um colega de laboratório dos pesquisadores também desenvolveu os sintomas gripais e o vírus foi recuperado de suas secreções. Este foi considerado o primeiro vírus IF humano e denominado de “influenza A”. Em 1940, um vírus antigenicamente distinto foi isolado e denominado como tipo B (B/Lee/40). Já o primeiro vírus influenza C foi isolado em 1947.⁵² Ainda, a primeira epidemia de IF entre animais foi descrita em 1878 como “fowl plague” e afetou galinhas na Itália. O agente viral foi isolado em 1902, porém somente reconhecido um IF vírus (influenza A/chicken/Brescia/1902 [H7N7]) em 1955.⁵²

Influenza permanece como causa de importante morbidade e mortalidade atingindo vários segmentos da população humana. Ainda, muitos animais são infectados pelo IF, algumas vezes com resultados catastróficos.⁵¹

2.2.2 Taxonomia

Os vírus IF são membros da família *Orthomyxoviridae*. Diferenças antigênicas em duas proteínas principais (proteína da matriz – M e nucleoproteína – NP) são utilizadas pra separar os IF em três gêneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*. Os membros destes três gêneros são referidos como vírus influenza A, B e C, respectivamente. Ainda os vírus influenza A (IFA) são classificados em subtipos baseando-se em características das suas duas principais glicoproteínas de superfícies: hemaglutinina (H ou HA) e neuraminidase (N ou NA).⁵³ Estas duas glicoproteínas possuem vários sorotipos, até agora descritos 16 diferentes hemaglutininas e 9 neuraminidasas.^{54,55} Assim, as seguintes informações são utilizadas para nomear uma cepa: tipo, espécie de origem (caso não seja de hospedeiro humano), localização geográfica do isolamento da cepa ou número de identificação do laboratório, ano de isolamento e subtipo, nos casos de influenza A.⁵³ Exemplos: cepa humana – Influenza A/Califórnia/7/2004 (H3N2); cepa aviária – Influenza A/codorna/Vietnam/36/2004 (H5N1).

2.2.3 Descrição do agente e patogênese

Os IF vírus possuem envelope e seu genoma são compostos por RNA fita simples com segmentos. Podem ter formato esférico ou se apresentarem pleiomórficos, medindo de 80 a 120 nm. Influenza A e B possuem 8 segmentos genômicos e o influenza C somente 7 segmentos. Cada segmento tem em média de 800 a 2500 nucleotídeos e o genoma completo pode totalizar entre 10 e 14,6 kb. O envelope é composto por lipídeos e derivado das células do hospedeiro, mas sempre apresentando proteínas virais, especialmente a HA e NA. A HA pode aglutinar hemácias de mamíferos e aves, propriedade que foi utilizada por muito tempo para identificação viral.⁵³

A estrutura gênica do IFA traz 10 proteínas codificadas nos 8 segmentos de RNA. Os vírus influenza B (IFB) e C (IFC) possuem organização protéica semelhante, mas não idêntica ao influenza A.⁵⁶ As proteínas IFA e suas funções são mostradas na tabela 3.

Tabela 3 – Descrição das proteínas virais do influenza A, seus segmentos codificantes e funções.

Segmento	Proteína	Função
1	PB2	Componente básico da polimerase viral
2	PB1	Componente básico da polimerase viral
3	PA	Componente ácido da polimerase viral
4	HA	Hemaglutinina: proteína de ligação viral, responsável pela fusão a célula hospedeiro e alvo anticorpo neutralizante
5	NP	Nucleoproteína: faz parte do nucleocapsídeo
6	NA	Neuraminidase: faz clivagem do ácido siálico e promove liberação viral
7	M1	Proteína da Matriz: proteína estrutural, principal componente da partícula viral
	M2	Proteína de membrana: forma o canal da membrana, facilita perda de revestimento e produção de HA
8	NS1	Proteína não-estrutural: inibe a tradução de RNAm celular
	NS2	Proteína não-estrutural: promove exportação do nucleocapsídeo do núcleo

Adaptado de: Murray et al., 2009.³¹

É importante ressaltar que o IFA apresenta uma maior variabilidade genética que os IFB e IFC. As múltiplas cepas IFA são formadas tanto pela variabilidade das proteínas HA e NA, como pelo fato deste vírus infectar também animais e possuir seu genoma dividido em segmentos. Assim, além da variação viral por acúmulo de mutações em ponto (chamada “drift”), o genoma segmentado possibilita trocas dos segmentos entre as diferentes cepas (chamada “shift”). Estes segmentos do genoma podem ser permutados entre diferentes cepas presentes em um mesmo hospedeiro, produzindo novas progênes virais. Estas variações ficam bastante ampliadas pelo fato de que algumas cepas virais infectam animais, como aves e mamíferos. Os animais podem funcionar como reservatórios de segmentos do genoma viral totalmente diferentes dos que circulam entre a população humana. Quando uma nova cepa viral criada, por “shift” ou por “drift”, em um reservatório animal consegue

cruzar a barreira entre espécies e infectar humanos, pode-se ter o início de uma pandemia.^{55,57} Infecção por cepas virais desconhecidas podem se apresentar sob a forma de epidemias explosivas e com uma rápida disseminação. Assim, a causa fundamental de ocorrência das epidemias por IF é a contínua geração de novas cepas, derivadas de cepas anteriores, para as quais os indivíduos apresentam pouca ou nenhuma imunidade.⁵⁸

A patogênese dos vírus IF ocorre através de uma infecção inicial e local do trato respiratório superior. O vírus tem como alvo inicial as células produtoras de muco, células ciliadas e outras células epiteliais.³¹ A ligação entre o vírus e estas células é realizada entre HA viral e as glicoproteínas contendo ácido siálico presentes na superfície destes tipos celulares. Assim é a hemaglutinina viral que determina a amplitude de hospedeiros das cepas de IF. Por exemplo, IFA humana e suínas clássicas contendo hemaglutinina H1, ligam-se preferencialmente ao receptor SA α 2,6Gal, enquanto as IFA eqüinas e aviárias (que contem outras hemaglutininas) tem maior afinidade pelas receptores SA α 2,3Gal.⁵² Após a entrada do vírus nas células, ocorre a lise celular e conseqüente perda do sistema ciliado por parte do hospedeiro. Assim ocorre a perda da defesa primária do trato respiratório. Ainda, a NA viral facilita o desenvolvimento da infecção através da clivagem dos resíduos do ácido siálico do muco, proporcionando acesso ao tecido. Se o vírus disseminar para o trato respiratório inferior, a infecção pode provocar uma severa descamação do epitélio brônquico ou alveolar.³¹ Além de comprometer as defesas naturais do trato respiratório, a infecção pelo IF promove a adesão bacteriana às células epiteliais. Infecções do trato respiratório inferior, como pneumonia, podem resultar tanto da própria patogênese viral como de uma infecção bacteriana secundária.³¹

2.2.4 Transmissão e Epidemiologia

O vírus IF é transmitido entre hospedeiros por gotículas geradas por espirros, tosse ou fala. O contato direto ou indireto (fômites) com secreções contaminadas ou aerossóis é outra potencial rota de transmissão viral.^{59, 60} Em relação às cepas de origem zoonótica, o contato direto com o animal contaminado é a rota mais comum de transmissão.⁶¹

Usualmente IF causa epidemias anuais nos meses de inverno em climas temperados e em meses de chuva em climas tropicais, mostrando clara sazonalidade deste vírus.^{15,62} Estas epidemias sazonais anuais são caracterizadas pelo repentino aumento em casos de doença respiratória febril levando ao absenteísmo nas escolas e locais de trabalho na comunidade atingida.^{53,63} Em geral a duração destas epidemias fica em torno de 3 a 8 semanas e pode envolver um único subtipo de IFA ou IFB. Porém podem ocorrer epidemias com circulação de dois subtipos de IFA ou co-circulação de IFA e IFB.⁵³ Em média 5% a 20% da população dos Estados Unidos é infectada anualmente durante estas gripes sazonais.⁶⁴ Em estudo realizado em Porto Alegre entre crianças com sintomas respiratórios mostrou prevalência de 20,9% IFA e 6,7% de IFB.³²

As apresentações clínicas da infecção por IF podem variar muito, desde um quadro gripal mais simples até complicações respiratórias que levam a hospitalização. Também dados americanos mostram que cada ano mais 200.000 pessoas são hospitalizadas por complicações relacionadas à gripe. Estima-se que entre 1976 e 2006, as mortes associadas à gripe nos Estados Unidos aumentaram de 3000/ano para cerca de 49.000/ano. Alguns grupos populacionais, como idosos, crianças, mulheres grávidas e pessoas com certas condições de saúde, são de alto risco para complicações graves da influenza.^{64,65}

Ainda, o vírus IFA é reconhecido como um potencial agente de doença pandêmica. Esta capacidade do IFA em ser agente de pandemias esta relacionada variabilidade viral, como discutido anteriormente. Esta característica do IFA coloca-o ao lado de vírus como HIV-1, Ebola e SARS, agentes de pandemia, que possuem altas taxas de mortalidade quando não tratados. Apesar das taxas de mortalidade relacionadas ao IFA serem mais modestas do que as relacionadas a estes outros vírus, sua natureza de rápida transmissão inter-pessoal por secreções respiratórias e sua ampla distribuição geográfica colocam este vírus entre os que poderiam infectar 30% da população mundial dentro de poucos meses. Assim, mesmo com uma taxa de mortalidade girando em torno de 2%, uma cepa viral com alto potencial de transmissibilidade poderia causar um número de até 135 milhões de mortes na

população mundial em um período de um ano durante um surto pandêmico. Esta cifra é cerca de quatro vezes o total de mortalidade atribuído ao HIV-1 nos últimos 30 anos.¹⁹

Recentemente em 2009, o mundo experimentou a primeira pandemia de gripe do século 21 que foi causada pela cepa influenza A/H1N1/Califórnia/2009 contendo genes de suínos, aves e humanos. Esta cepa foi chamada de influenza suína A (H1N1) e teve seus primeiros casos no México em março de 2009. Os casos de influenza A (H1N1) se disseminaram rapidamente e esta cepa foi predominante no mundo. Em 11 de junho de 2009, a Organização Mundial da Saúde declarou que os critérios para uma pandemia de gripe haviam sido cumpridos e a pandemia foi declarada oficialmente.⁶⁶ Martirosyan e colaboradores determinaram que o perfil populacional na Europa atingido por esta cepa foi diferente em comparação com épocas históricas da região. Esta epidemia atingiu maior número de crianças do que as cepas de IFA sazonais circulantes anteriormente.⁶⁷ No hemisfério sul, esta mudança também foi observada em estudo conduzido na Argentina que demonstrou que a pandemia de 2009 foi associada com altas taxas de mortalidade pediátrica, superiores em 10 vezes às taxas para a gripe sazonal em anos anteriores.⁶⁸ Esta natureza imprevisível da gripe apresenta um desafio para a pesquisa e a preparação para uma nova pandemia. A nossa capacidade de antecipar eventos de pandemia ainda é pobre e nosso arsenal anti-pandemia é fraco.⁶⁹ Assim, para a influenza, programas de vigilância são importantes para a concepção de profilaxias adequadas e detecção de novas variantes virais.^{5,24}

2.2.5 Significância Clínica

A infecção pelos vírus IFA e IFB tipicamente causam doença respiratória febril caracterizada por febre, tosse, sintomas do trato respiratório superior (rinorréia, congestão nasal e inflamação na garganta) e sintomas sistêmicos (cefaléia, mialgia e mal-estar). O vírus IFC tem menor importância clínica por causar somente doença respiratória leve.⁵³

A doença causada pelos IFA e IFB normalmente se inicia após um período de incubação de 1 a 5 dias (com média de 2 dias). Geralmente a

duração dos sintomas é em torno de 3 a 5 dias, porém a tosse e a indisposição pode persistir por semanas.⁵³ As respostas imunológicas do organismo vêm através de interferon e citocinas que têm seu pico concomitante à fase febril da doença. Assim, os sintomas e o curso temporal da doença são determinados pelas respostas do interferon, linfócitos T e pela extensão da perda de tecido epitelial. Normalmente a gripe é uma doença autolimitada e que raramente acomete outros órgãos que não os do trato respiratório.³¹ Porém, complicações podem incluir otite média, principalmente em crianças, e em adultos são relatadas sinusite, pneumonia viral, pneumonia bacteriana secundária, exacerbação de doença cardíaca ou respiratória de base, problemas neurológicos (convulsões, encefalite aguda e encefalopatia pós-infecciosa) e morte.⁵³

Ainda, as cepas de influenza podem ter alguma variação em seu perfil de população atingida. Por exemplo, em 2009 a cepa pandêmica influenza A (H1N1) afetou preferencialmente adultos jovens, com uma concentração de casos graves e fatais em adultos com idades entre 30 e 50 anos em contraste com cepas de influenza sazonal anteriores.^{66,70} Além disso, H1N1 apresentou um potencial elevado para lesão pulmonar grave, bem como sintomas gastrointestinais. Os fatores de risco para doença grave incluíram obesidade, gravidez, imunossupressão, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, distúrbios neurológicos e outras comorbidades como a infecção pelo HIV.⁶⁶ Este tipo de alteração de perfil demonstra a importância de programas de vigilância para influenza, especialmente para a concepção de profilaxias adequadas para os grupos populacionais mais atingidos.⁵

2.2.6 Profilaxia e Tratamento

A vacinação anual com vacina trivalente é a medida primária de profilaxia contra o IF humano. Esta vacina é normalmente composta por duas cepas de IFA (as mais recentes variantes de H3N2 e H1N1 que circularam) e uma cepa de IFB. No hemisfério norte, a seleção das cepas ocorre em janeiro e fevereiro para que a vacinação possa ocorrer em setembro. A produção da vacina é feita a partir do cultivo das cepas em ovos de galinha embrionados e, então os vírus são inativados. As proteínas virais são parcialmente purificadas

e tem uma padronização de uso de 15 µg de HA.⁵³ Ainda em alguns países, como os EUA, existe a disponibilidade da vacina de uso tópico com aplicação intranasal. Esta vacina normalmente é constituída por vírus atenuado e licenciada para uso em pessoas de 2 a 49 anos.^{53,64}

No Brasil é utilizada a vacina trivalente contra IF constituída por vírus inativados. Esta é disponibilizada gratuitamente desde o ano 2000 a idosos (acima de 60 anos). A partir de 2010 (pós-pandemia de influenza A(H1N1)) a vacinação passou a ser indicada para grupos prioritários com maior risco de complicações, visando contribuir para a redução da morbimortalidade associada à influenza. Por exemplo, em 2011 foram vacinados os seguintes grupos: gestantes e crianças na faixa etária de seis meses a dois anos, adultos com 60 anos ou mais, trabalhadores de saúde e povos indígenas.⁷¹

Em relação ao tratamento, existem hoje quatro antivirais licenciados para venda e indicados para casos de influenza. São eles: amantadina e rimantadina – bloqueadores do canal iônico M2; zanamivir e oseltamivir que são inibidores da NA e ativos tanto contra IFA como IFB.⁵³ Clinicamente, tem sido observado um aumento da resistência com uso dos antivirais amantadina e rimantadina.^{51,53} Já o zanamivir tem seu uso limitado à via intranasal, por ser instável se administrado por outra via.⁵¹ O tratamento com qualquer um dos antivirais deve ser iniciado dentro de, no máximo, 2 dias após o início dos sintomas gripais.⁵³ Durante a pandemia de 2009 com a cepa influenza A (H1N1), a recomendação de uso foi do oseltamivir. Este antiviral, quando iniciado dentro do prazo recomendado, mostrou bons resultados como redução da duração dos sintomas e, principalmente, redução da ocorrência de complicações da infecção pelos vírus da influenza.⁷¹ Chowell e colaboradores conduziram um estudo que ressaltou o impacto potencial de diminuir os atrasos de admissão hospitalar e aumentar uso de antivirais para reduzir a carga de mortalidade em pandemias de gripe.⁷²

2.3 Parainfluenza

2.3.1 Aspectos gerais

Em 1953, antes que as primeiras cepas de parainfluenza vírus (PIV) humanos fossem isoladas, um vírus de parainfluenza foi recuperado a partir de camundongos inoculados com um espécime proveniente da autópsia de um lactente com doença respiratória. Este agente, o vírus Sendai, foi mais tarde demonstrado ser um patógeno de camundongos e não um patógeno humano. Porém este primeiro isolamento levou a alguma confusão entre os dois vírus, PIV e Sendai.^{73,74} Posteriormente foram identificados vários outros homólogos animais para outros vírus parainfluenza humanos.⁷⁴

Os quatro sorotipos de PIV (PIV-1 a PIV-4) foram isolados pela primeira vez durante o período de 1956 a 1960.⁷⁵ Os PIV-1, 2, e 3 foram inicialmente isolados a partir de recém-nascidos e crianças com doença do trato respiratório inferior e PIV-4 foi recuperado de crianças e jovens com doença branda do trato respiratório superior. Este novo grupo de vírus causadores de doenças respiratórias não tem um bom crescimento em ovos embrionados e também compartilha poucos antígenos com o vírus da influenza sendo, portanto, classificados em outra família taxonômica, a *Paramyxoviridae*.⁷⁵ Logo após a sua descoberta, estes vírus foram relacionados como uma das principais causas de crupe, especialmente PIV-1. Atualmente PIV-1 a 3 estão em segundo lugar, após o vírus sincicial respiratório, como causa de doença severa do trato respiratório em lactentes e crianças.^{74,76}

2.3.2 Taxonomia

Os PIV são membros da família *Paramyxoviridae* subfamília *Paramyxovirinae*, que inclui também os vírus causadores da caxumba e sarampo além do parainfluenza.⁷⁷ Porém, dentro desta subfamília os PIV-1 a 4 são classificados em diferentes gêneros: *Respirovirus* abriga PIV-1 e PIV-3 e *Rubulavirus* contem PIV-2 e PIV-4. Esta subfamília ainda possui mais dois gêneros relacionados a outros paramixovírus.^{75,77}

Ainda como subdivisões o PIV-4 apresenta dois subgrupos principais: A e B.^{75,78} PIV-1 e PIV-3 têm subdivisões em genótipos descritas.^{75,79,80} Estudos de epidemiologia molecular para procura de diferentes genótipos ou cepas virais são normalmente baseados na variação das sequências genéticas da proteína hemaglutinina-neuraminidase.⁸¹ Por exemplo, em estudo conduzido por Mao e colaboradores com isolados da China baseados na variação da proteína hemaglutinina-neuraminidase demonstrou que houve circulação de três grupos distintos (A, B, e C) de PIV-3, indicaram que foram circulando com algum agrupamento temporal e regional.⁸²

2.3.3 Descrição do agente e patogênese

Os vírus parainfluenza possuem genoma de RNA fita simples (sentido negativo) e contido em um capsídeo envelopado pleiomórfico com diâmetro variando entre 150 e 250 nm. O genoma, ao contrário da gripe, é não-segmentado, contendo em torno de 15.000 nucleotídeos de comprimento e codificando seis proteínas estruturais.^{75,77} O vírus tem duas proteínas de membrana, a hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a proteína de fusão (F). A HN reconhece glicoproteínas que contém ácido siálico presentes na célula hospedeira e permite a ligação entre o vírus e seu alvo. A interação da HN é necessária para desencadear a fusão vírus – célula mediada pela proteína F. Assim, depois da fusão com a membrana da célula hospedeira, o vírus é liberado para o citoplasma. Após os primeiros eventos, a transcrição primária ocorre, o vírus é montado, e as novas partículas virais são liberadas. HN também atua removendo o ácido siálico das partículas de novos vírus e evitando a auto-agregação.⁷⁶ As proteínas estruturais do PIV e suas funções são mostradas na tabela 4.

Tabela 4 – Descrição das proteínas virais dos vírus parainfluenza e funções.

Proteína	Função
HN - hemaglutinina-neuraminidase	Proteína transmembrana de superfície, principal proteína de adesão – ligação do vírus a célula hospedeira.
F – proteína de fusão	Proteína transmembrana de superfície que media a fusão viral.
M – proteína da matriz	Proteína estrutural, componente da superfície interna do

	envelope.
N - nucleoproteína	Componente do nucleocapsídeo viral
P - fosfoproteína	Componente do nucleocapsídeo viral
L – “large protein”	Componente do nucleocapsídeo viral

A patogênese do PIV se dá através da destruição das células epiteliais do trato respiratório superior. O PIV se replica rapidamente podendo causar formação de células gigantes e lise celular. Estes vírus raramente causam viremia.³¹ Testes em modelos “in vitro” demonstraram que este vírus infectou somente as células ciliadas superficiais não espalhando-se para as células basais subjacentes ou caliciformes células do epitélio. Este tropismo seletivo é consistente com a ausência de viremia em indivíduos saudáveis. Este tropismo também pode limitar a exposição de antígenos virais as células do sistema imune, possivelmente conduzindo a respostas imunológicas reduzidas. Esta diminuição da resposta imunológica é que deve estar relacionada ao fato do PIV gerar re-infecções.⁸³ Também foi demonstrado que a infecção por PIV leva ao aumento da produção de muco e inibição da motilidade ciliar nas vias aéreas. A inflamação das vias aéreas e sua obstrução são componentes certamente importantes na patogênese da infecção por PIV.⁸³

2.3.4 Transmissão e Epidemiologia

O PIV é um vírus facilmente inativado por calor, baixa umidade e solventes orgânicos. Apesar disso tem sua transmissão realizada através das secreções respiratórias de indivíduos, ou seja, gotículas geradas por espirros, tosse ou fala. Outro potencial modo de transmissão viral é através de fômites e, em relação aos PIV, estes têm mostrado um período de sobrevivência de até 10 horas em superfície porosas.⁷⁷

Estes vírus também têm mostrado sazonalidade, sendo que o PIV-3 o mais frequentemente isolado e ocorrendo nas estações de primavera e verão. PIV-3 afeta as crianças mais jovens e, muitas vezes é colocado como a segunda causa de bronquiolite e pneumonia em crianças com menos de 6 meses, logo após o vírus sincicial respiratório.^{76,77} Já o PIV-1 ocorre mais frequentemente no outono e a cada dois anos. PIV-1 tende a causar epidemias

bianuais e representa cerca de 30%-50% dos casos de crupe em jovens crianças. O PIV-2 não é tão comum como outros dois sorotipos citados e pode causar surtos alternando com PIV-1. A maioria das crianças infectadas pelo PIV-2 normalmente estão entre as idades de 2 e 5 anos. PIV-4 afeta as crianças mais velhas e é o sorotipo mais raro.^{76,77} As percentagens de isolamento dos sorotipos de PIV podem variar grandemente entre diferentes áreas geográficas e mesmo em anos diferentes. Alguns estudos chegam a reportar percentagens em torno de 11-13%,^{77,84} porém em estudo realizado em Porto Alegre foram obtidos os seguintes resultados: 1,6% de PIV-1, 0,4% PIV-2 e 5,8% PIV-3, totalizando 7,8% de prevalência dos sorotipos.³²

2.3.5 Significância Clínica

PIV infecção leva a uma grande variedade de quadros clínicos que variam desde doença leve do trato respiratório superior até pneumonia grave.^{76,77,85} Na realidade os quadros clínicos mais comuns são bastante leve e auto-limitados.⁷⁷ O principal quadro clínico relacionado ao PIV é a laringotraqueíte ou crupe viral. Este quadro clínico é causado pelos sorotipos PIV-1 a PIV-3.⁶

O crupe viral comumente inicia com sintomas semelhantes ao de um resfriado com inflamação do revestimento das vias aéreas, provocando dificuldade respiratória, juntamente com uma tosse forte e rouquidão. A respiração é rápida e profunda, algumas vezes apresentando chiados e 50% das crianças apresentam febre.⁶ Os sintomas diminuem rapidamente com resolução da tosse geralmente dentro de dois dias, embora podendo persistir durante até uma semana. O crupe é uma condição benigna, com uma baixa taxa de mortalidade. Muitas crianças com crupe podem ser levadas para emergência, porque os sintomas começam de repente, causando preocupação dos pais.⁶ Estudos demonstram que apenas 1 a 8% das crianças diagnosticadas com crupe necessita de internação hospitalar. Menos de 3% das crianças com crupe que estavam internados no hospital foram submetidos à ventilação mecânica.^{86,87} Normalmente o crupe viral atinge crianças entre 6 meses e 6 anos de idade e raramente ocorre em crianças com menos de três meses.^{77,88}

Além do crupe viral o PIV pode causar outros quadros de infecções respiratórias do trato respiratório superior em lactentes, crianças e adultos. Porém, em idosos especialmente os que apresentam alguma doença crônica cardíaca ou pulmonar, PIV pode levar a infecções do trato respiratório inferior, com as maiores taxas de internação.⁷⁷ Em imunocomprometidos, PIV é cada vez mais reconhecido como causa de severa morbidade e mortalidade.^{77,89} Entre crianças imunocomprometidas, PIV está envolvido em altas percentagens de infecções respiratórias entre receptores de medula óssea, receptores de órgãos sólidos e cânceres hematológicos.^{77,90,91} Apesar da alta prevalência de PIV (especialmente o sorotipo PIV-3) entre os receptores de medula óssea a mortalidade causada por este vírus teve suas taxas diminuídas mais recentemente, provavelmente pelas medidas de controle das equipes assistenciais aos seus pacientes.⁹²

2.3.6 Profilaxia e Tratamento

Atualmente não existem vacinas e agentes antivirais licenciados para a profilaxia ou tratamento de infecção por PIV. O tratamento é principalmente sintomático e o uso de corticóides tem sido recomendado.^{76,77} Ribavirina em aerossol ou sistêmica em combinação com gama globulina intravenosa tem sido relatada em alguns estudos.⁷⁶ Em crianças com imunodeficiências graves e infecção por PIV ribavirina foi administrada ao longo de um longo período de tempo (3-10 meses) sem toxicidade aparente.⁹³ Embora a ribavirina venha sendo bem tolerada, a sua eficácia para o tratamento da infecção por PIV é difícil de determinar. A maioria dos estudos envolve pequeno número de casos, diferentes vias de administração, tratamento de combinação com gamaglobulina intravenosa e populações de pacientes diferentes. Alguns estudos sugerem um modesto benefício se a droga é dada na fase inicial do envolvimento do trato respiratório superior, mas isto é controverso, devido à falta de estudos controlados.⁷⁶ Ainda, imunoestimulantes não específicos têm sido explorados como potenciais tratamentos para a infecção por PIV incluindo imiquimode e interferon.⁷⁵

2.4 Vírus Sincicial Respiratório

2.4.1 Aspectos gerais

O vírus sincicial respiratório humano (VSR) foi primeiramente identificado, em 1956, como agente causador de coriza em chimpanzés mantidos em laboratório.⁹⁴ Pouco depois, o mesmo vírus foi recuperado de secreções de crianças com doença respiratória.⁹⁵ O vírus induz à formação de sincícios, ou seja, uma formação de células que se fundem perdendo suas membranas. Estas formações ocorrem tanto em cultura de células como também “in vivo”. Esta característica viral é que deu origem ao seu nome.³¹

Atualmente o VSR é reconhecido como o mais importante agente viral envolvido em doença respiratória severa em crianças no mundo todo.^{22,96,97} Embora primariamente conhecido como um patógeno pediátrico, VSR pode infectar e causar doença em indivíduos de todas as idades, podendo levar à doença respiratória severa em idosos e imunocomprometidos.^{8,96} Um estudo de meta-análise conduzido por Nair e colaboradores (2010) utilizando estudos de todo o mundo estimou que no ano de 2005 VSR causou 33,8 milhões de infecções respiratórias em crianças menores que 5 anos. Este número corresponde a 22% de todas as infecções desse tipo e 3-9% das mortes.⁹⁸ Este estudo ainda indica que a carga de doença causada pelo VSR está crescendo globalmente. Sendo assim, o VSR continua a ser um dos agentes patogênicos mais importantes e, portanto, considerado como crucial para o desenvolvimento de vacina.^{96,98,99}

2.4.2 Taxonomia

O VSR é membro da família *Paramyxoviridae* e da ordem *Mononegavirales*, que contém os vírus de genoma RNA fita (-) e não-segmentado. Esta família taxonômica possui duas subfamílias: *Paramyxovirinae*, incluindo vírus como os causadores da caxumba, sarampo e os PIVs entre outros; *Pneumovirinae* subfamília que inclui o VSR e o metapneumovirus humano. Ainda a subfamília *Pneumovirinae* tem dois gêneros: *Pneumovirus*, onde o VSR humano está classificado e *Metapneumovirus* que incluiu o metapneumovírus humano entre outros.⁹⁶

Existem vírus homólogos ao VSR humano que infectam animais, mas não existem reservatórios animais para o VSR humano.⁹⁶

As cepas de VSR são separadas em dois subgrupos principais, A e B (VSRA e VSRB), com base em variabilidade antigênica e genética. As principais diferenças são encontradas na glicoproteína de adesão denominada proteína G. A proteína G de RSV é um alvo para anticorpos neutralizantes além de interagir com os receptores da célula hospedeira e de ser altamente variável.¹⁰⁰⁻¹⁰² A variabilidade na sequência de aminoácidos desta proteína é maior do que em outras proteínas, tanto entre os subgrupos A e B como dentro deles. Assim a análise molecular desta proteína pode ser utilizada para divisão do VSR em diferentes genótipos.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Ainda, o vírus VSR (ambos VSRA e VSRB) exibe rápidas taxas evolutivas, o que poderia justificar o surgimento de muitos diferentes genótipos.¹⁰⁶

2.4.3 Descrição do agente e patogênese

O genoma do VSR é formado por 10 genes que produzem 11 proteínas diferentes. Este genoma de RNA fita simples está contido em um capsídeo envelopado pleomórfico com diâmetro variando entre 100 e 350 nm. Três proteínas virais, proteínas N, P e L estão envolvidas na formação do nucleocapsídeo. Já o envelope contém 5 proteínas virais (proteínas M, M2, F, G e SH).⁹⁶ As proteínas do VSR e suas funções são mostradas na tabela 5.

Tabela 5 – Descrição das proteínas virais do VSR e suas funções.

Proteína	Função
N - nucleoproteína	Componente do nucleocapsídeo viral
P - fosfoproteína	Componente do nucleocapsídeo viral
L – “large protein”	Componente do nucleocapsídeo viral
M – proteína da matriz	Proteína estrutural, componente da superfície interna do envelope.
F – proteína de fusão	Proteína transmembrana de superfície que media a fusão viral e formação de sincícios.
G - glicoproteína	Proteína transmembrana de superfície, principal proteína de adesão/ligação do vírus à célula hospedeira.

SH – “small hydrophobic”	Proteína transmembrana de superfície, função não completamente conhecida.
M2-1 (Orf1)	Proteína associada ao nucleocapsídeo com função na transcrição viral.
M2-2 (Orf2)	Proteína de função não completamente conhecida.
NS1 – “nonstructural-1”	Proteína não-estrutural, ação sobre o interferon celular.
NS2– “nonstructural-2”	Proteína não-estrutural, ação sobre o interferon celular.

Adaptado de: Collins & Crowe, 2007.⁹⁶

O VSR é um dos patógenos respiratórios mais vulneráveis a mudanças ambientais, somente 10% do inócuo viral se mantém viável após exposição de 5 minutos a 55°C. Em temperatura ambiente, apenas 10% da infectividade é apresentada após 48 horas. Vários agentes químicos, como detergentes, álcoois e éter são capazes de inativar este agente. A sobrevivência do VSR no ambiente depende em grande parte da umidade presente.¹⁰²

O período de incubação da doença respiratória por VSR é de 2 a 8 dias. O vírus se replica na nasofaringe e pode permanecer até três semanas em crianças infectadas. Em hospedeiros suscetíveis o VSR pode disseminar rapidamente para o trato respiratório inferior, causando sintomas de infecção pulmonar 1 a 3 dias após o início da rinorréia. Até o momento não foram relatados casos de viremia por VSR. A infecção em crianças parece ocorrer inclusive na presença de anticorpos maternos sendo comuns as reinfecções em todas as idades.^{96,107-109}

O efeito patológico do VSR é causado pela invasão direta do vírus no epitélio respiratório, acompanhada do dano celular provocado pela resposta imune. A necrose dos brônquios e bronquíolos leva à formação de um tampão mucoso, fibrina e restos celulares dentro das pequenas vias aéreas. As vias aéreas estreitas dos bebês ficam rapidamente obstruídas por esses tampões. A recuperação clínica usualmente coincide com o término da excreção viral.^{31,96} O sistema imune adaptativo tem um papel central na recuperação da infecção por VSR e também na resistência a reinfecção. Por exemplo, em crianças

imunodeficientes foi demonstrada a excreção viral até meses após a infecção. Adultos severamente imunocomprometidos, como os transplantados de medula óssea tem uma alta incidência de infecções por VSR, inclusive infecções severas e mortes.⁹⁶

2.4.4 Transmissão e Epidemiologia

São as secreções respiratórias de indivíduos infectados pelo VSR que transmitem o vírus. Assim o principal modo de transmissão do VSR é através de gotículas geradas por espirros, tosse ou fala. Outro potencial modo de transmissão viral é através de fômites. Hospedeiros humanos são a única fonte do vírus VSR e a disseminação requer contato próximo entre indivíduos ou contato direto de mãos contaminadas com as mucosas nasal ou conjuntiva.⁹⁶

Apesar do VSR ser um patógeno bastante vulnerável ao ambiente e soluções de limpeza, este vírus parece ser um dos mais infecciosos que afetam os seres humanos.⁹⁶ Anualmente o VSR causa surtos nos meses de outono e/ou inverno em climas temperados e em meses de chuva em climas tropicais, mostrando clara sazonalidade deste vírus.^{15,102} Mudanças climáticas podem também alterar a “estaçãõ de VSR” ou mesmo mudanças na sazonalidade de outros vírus respiratórios podem alterar o padrão dos surtos sazonais do VSR.^{110,111} Ambos os subgrupos (A e B) podem co-circular a cada ano, com o subgrupo predominante podendo variar a cada estaçãõ sendo que diferentes padrões de prevalência dos subgrupos A e B foram descritos.^{102,105,112,113}

O VSR é bastante prevalente na população mundial e praticamente todas as crianças venham a ser infectadas pelo menos uma vez por este vírus até os 3 anos de idade.^{101,102} Por exemplo, estudo realizado em Porto Alegre entre crianças com sintomas respiratórios, mostrou ser o VSR o vírus mais prevalente nesta população sendo positivo em 49,3% das amostras testadas.³² Este vírus pode causar doença em indivíduos de todas as idades, porém a população infantil é a mais afetada. VSR é a causa mais comum de bronquiolite e pneumonia entre lactentes e crianças em todo o mundo. Entre as crianças, as que apresentam alto risco para desenvolver doença severa causada por VSR se incluem aquelas nascidas de forma prematura, portadoras

de doenças crônicas pulmonares e cardíacas. Adultos imunocomprometidos e idosos também apresentam risco aumentado para doença severa por VSR.^{101,102} Ambientes com aglomerados de pessoas são propícios à disseminação de VSR. Escolas e creches provêm um bom ambiente para a disseminação deste vírus entre indivíduos suscetíveis. Também em hospitais o VSR causa infecções, produzindo surtos hospitalares anuais e causando infecções entre crianças e adultos, inclusive incluindo a equipe assistencial. Crianças hospitalizadas podem ter um período de excreção viral prolongado, levando a um prolongamento do período de disseminação do surto. Procedimentos de isolamento são recomendados para pacientes hospitalizados infectados pelo VSR.^{102,114,115}

2.4.5 Significância Clínica

A doença por VSR normalmente se inicia com rinorréia, espirros e tosse após um período de incubação de 2 a 8 dias. A maioria dos infectados tem uma recuperação completa entre 8 a 15 dias. Foi estimado que durante a primeira infecção, 25 a 40% das crianças infectadas tiveram sinais e sintomas de bronquiolite e pneumonia, com um percentual de 0,5 a 2% necessitando de hospitalização. Em contraste, taxas de hospitalização em torno de 25% são observadas entre as populações de alto risco, como crianças nascidas prematuras, portadoras de doenças crônicas pulmonares e cardíacas.¹⁰²

A importância clínico-econômica deste vírus é evidenciada por dados americanos do final da década de 90 que estimavam 100.000 hospitalizações e 4.500 mortes relacionadas ao VSR anualmente o que geraria um gasto superior a 300 milhões de dólares por ano.^{116,117} Estes dados demonstram a importância de programas com ações voltadas para a concepção de profilaxias adequadas para os grupos populacionais mais atingidos pelo VSR.

2.4.6 Profilaxia e Tratamento

Globalmente existe uma grande necessidade de desenvolvimento de vacinas contra o VSR. Este desenvolvimento tem sido colocado como prioridade por organizações de saúde há mais de 20 anos.⁹⁹ Como grande dificuldade para este desenvolvimento é apontado o fato de que esta vacina

teria de ser administrada nas primeiras semanas de vida das crianças e nesta fase tem-se um sistema imune bastante imaturo.⁹⁶ Outro obstáculo refere-se a um problema anterior ocorrido na década de 60 que trouxe aumento da severidade da doença por VSR entre os vacinados. A vacina nos anos 60 foi desenvolvida a partir de VSR inativado por uso de formalina misturado a adjuvante e administrada intramuscularmente. Observou-se que 80% dos vacinados necessitaram de internação hospitalar contra 5% do grupo controle.^{96,118}

Em relação a tratamento com medicamentos, a ribavirina em aerossol (Virasole - denominação comercial) foi aprovada no ano de 1986 para o uso no tratamento de crianças com doença severa por VSR. Porém, estudos de meta-análise de avaliações clínicas não indicaram evidência deste antiviral trazer benefícios significantes na redução da mortalidade. Assim, na maioria dos hospitais é pouco frequente o uso da ribavirina e, quando ocorre, é restrito a pacientes imunocomprometidos ou severamente doentes.¹⁰²

Em 1998 nos EUA foi aprovado para uso, o anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra a proteína F – Palivizumab (Synagis - denominação comercial). Este anticorpo age através da neutralização e inibição da fusão do VSR à célula hospedeira, fornecendo imunidade passiva. Esta imunoprofilaxia foi aprovada para uso em crianças com alto risco de desenvolver doença severa por VSR.¹⁰² O uso em outras populações, como os receptores de transplante de medula óssea, continua em discussão. O alto custo do palivizumab é o fato que acaba restringindo o seu uso e gera muitas discussões sobre quais as populações deveriam ter acesso a este medicamento.^{96,119} Nos Estados Unidos a profilaxia nos grupos de alto risco reduziu as taxas de hospitalização em até 78% nos últimos anos. No entanto, o uso de profilaxia com palivizumab em grupos não selecionados resulta em aumento significativo nos custos, pouca redução de gastos com menor taxa de hospitalização e nenhuma redução nas taxas de mortalidade.^{97,120} No Brasil, a Sociedade Brasileira de Pediatria tem recomendado o uso do palivizumab em 5 doses para: crianças nascidas prematuras (com idade para aplicação e início da imunoprofilaxia variando em relação a idade gestacional de nascimento e o início do período de sazonalidade do VSR); crianças menores de 2 anos (com

doença pulmonar iniciando 6 meses antes do período de sazonalidade viral) e crianças menores de 2 anos com alguns tipos de doenças cardíacas.¹²¹

2.5 Investigação laboratorial de vírus respiratórios

2.5.1 Coleta e armazenamento de material

Detecção de vírus respiratório depende da coleta de amostras com alta qualidade, seu rápido transporte para o laboratório e armazenamento apropriado. As amostras para a detecção direta de antígenos virais ou ácidos nucléicos e isolamento do vírus em culturas de células devem ser coletadas no prazo de sete dias após o início dos sintomas clínicos, e preferencialmente dentro de três dias. Idealmente a terapia antiviral não deve ter sido iniciada.³ Os espécimes clínicos normalmente utilizados de vírus respiratórios incluem: aspirado ou lavado nasofaríngeo; lavado nasal; swabs nasal, nasofaríngeo ou da garganta.^{3,102} Entre estes espécimes, as secreções obtidas por aspiração ou lavagens são as mais ricas em células e partículas virais, portanto, as mais recomendadas para a realização dos testes.^{3,102} Ainda, espécimes como lavado broncoalveolar ou aspirado do tubo endotraqueal podem se mostrar bastante sensíveis e serem utilizados em pacientes que estão submetidos à ventilação mecânica.¹⁰² Porém a obtenção destas amostras pode ser bastante invasivas e outros tipos de coleta têm sido testados. Blaschke e colaboradores testaram a coleta para investigação com uso de lenços faciais. Neste estudo, foram obtidos altos valores de especificidade, mas sensibilidade baixa (em torno de 50%) para a maioria dos vírus respiratórios testados.¹²² Assim, a maioria das pesquisas e exames assistenciais continua sendo conduzida a partir da coleta de secreções obtidas por aspiração ou lavagens.

Muitos vírus são sensíveis ao dessecação, variações de pH ou potencial osmótico. Por esta razão, as amostras devem ser colocadas em meio de transporte viral imediatamente depois de terem sido coletadas e refrigeradas a 4°C.³ Uma grande variedade de meios é recomendada para este transporte, sendo importante que o meio de escolha mantenha o equilíbrio do pH e seja suplementado com soro-albumina bovina ou outro estabilizante da partícula

viral.⁵³ No caso de uso de swabs, os mais recomendados são o swab de Dacron ou swab de poliéster também transportados em meio de transporte viral.¹²

Idealmente, todas as amostras devem ser transportadas refrigeradas ao laboratório em meio de transporte em 24 a 48 horas após a coleta e sem congelamento prévio. Para detecção direta de antígenos virais pela técnica de imunofluorescência, amostras devem ser refrigeradas e processadas em até 1-2 horas. O tempo máximo de armazenamento sob refrigeração para esta técnica é de 24 horas. As amostras para isolamento viral em cultura devem ser refrigeradas imediatamente após a coleta e inoculados em culturas de células sensíveis, logo que possível. Se as amostras não podem ser processadas dentro de 48 - 72 horas, que devem ser mantidas congeladas a -70°C ou abaixo desta temperatura. As amostras devem ser descongeladas logo antes do processamento. O número de ciclos de congelamento-descongelamento deve ser minimizado, pois pode causar dano ao espécime.^{3,53, 77}

É importante salientar que amostras obtidas de adultos normalmente possuem carga viral mais baixa do que as reportadas para amostras de crianças e imunocomprometidos.⁷⁷ Estas devem ser manuseadas com ainda mais cautela para minimizar danos ao material e, se possível, submetidas a técnicas de detecção mais sensíveis.

2.5.2 Métodos laboratoriais disponíveis

2.5.2.1 Cultura viral

A cultura viral é o método original usado para diagnosticar infecções respiratórias e o uso da cultura celular para detecção viral foi ampliado para finalidade diagnóstica em 1950. Detecção de vírus em cultura de células requer pessoal técnico e condições laboratoriais bastante especializadas. Após a cultura celular ter sido realizada e a amostra clínica ter sido inoculada, normalmente é realizado um exame por microscopia procurando alterações morfológicas degenerativas nas células. Estas alterações são chamadas de efeito citopático (CPE).¹²

Porém nem todos os vírus crescem em todos os tipos de cultura de células. Assim, as amostras clínicas devem ser inoculadas em vários tipos de células para proporcionar um ambiente mais adequado para o isolamento de variada maior de vírus. Muitas vezes o CPE pode não ser específico a um único tipo viral. Então, após 24-72 h de cultura, pode-se utilizar anticorpos marcados com fluorescência dirigidos contra os vírus de interesse.¹² Ou ainda a cultura pode ser submetida a outro teste imunológico que demonstre proteínas virais, ou mesmo a detecção de sequências de ácidos nucléicos específicas do tipo viral de interesse. Nestes casos a cultura viral serve também como um multiplicador do inócuo viral inicial, melhorando a sensibilidade da técnica utilizada posteriormente.

Também é importante lembrar que o crescimento de um vírus em cultura de células indica a presença de vírus viável na amostra clínica. Esta viabilidade viral é bastante dependente da coleta, transporte e armazenamento da amostra. Entretanto, a existência de vírus viável e competente, pode indicar replicação viral no hospedeiro. Este achado não pode ser determinado utilizando testes de pesquisa de antígenos ou detecção de ácido nucléico.¹²

2.5.2.2 Testes imunológicos

A capacidade de detecção de vírus respiratórios foi significativamente aumentada pelo desenvolvimento de anticorpos monoclonais marcados por moléculas fluorescentes.¹² Assim, a imunofluorescência ganhou grande importância entre os métodos laboratoriais de detecção viral podendo ser utilizada tanto para a marcação de proteínas virais (anticorpos monoclonais contra antígenos virais) quanto para marcação de anticorpos do hospedeiro dirigidos contra o vírus.

A detecção por imunofluorescência de vírus respiratórios, normalmente trabalhando em um painel que contempla a detecção de VSR, IFA, IFB, PIV 1-3 e AdV está disponível em muitos laboratórios clínicos. Este painel é especialmente utilizado para a detecção destes vírus em pacientes pediátricos que excretam grandes quantidades de vírus e por um período mais longo do que os adultos. As características de desempenho do ensaio dependem muito

do tipo de espécime clínico utilizado, idade do paciente, duração da doença, qualidade do anticorpo monoclonal utilizado e nível de conhecimento/treinamento dos técnicos do laboratório.¹² Os métodos de imunofluorescência podem se apresentar um pouco menos sensíveis que a cultura viral. As sensibilidades relatadas para imunofluorescência respiratória vírus variam muito, mas são, em geral de 90% para o VSR, de 80% para influenza A e B, 70% para parainfluenza 1-3 e 50% para adenovírus.¹²

Apesar deste painel utilizando imunofluorescência estar em uso na rotina assistencial em muitos laboratórios, vários outros vírus respiratórios não são detectados pelo uso deste painel. É o caso do bocavírus, metapneumovírus e mesmo das novas cepas de IF que não são discriminadas com o uso da imunofluorescência.³²

Outros ensaios imunoenzimáticos e sistemas imunocromatográficos têm sido introduzidos para utilização como testes rápidos ou testes de triagem em uso no consultório médico ou em prontos-atendimentos.^{12,123} Por exemplo, Khanom e colaboradores (2011) testaram um sistema imunocromatográfico (comercialmente BinaxNOW®) para detecção de VSR para uso em unidades de internação pediátrica ou consultório médico (teste rápido). Como resultado estes pesquisadores obtiveram uma alta especificidade (100%), porém uma sensibilidade baixa (41,2%).¹²⁴ Em outro estudo Ganzenmueller e colaboradores avaliaram um teste rápido para influenza A (H1N1) e também obtiveram uma boa especificidade, porém uma sensibilidade bastante baixa – 18,2%.¹²⁵ Estes estudos ilustram o que se tem observado: um número cada vez maior de testes rápidos está sendo disponibilizado comercialmente, porém estes kits ainda não têm alcançado a sensibilidade dos testes de imunofluorescência.¹²

2.5.2.3 Testes moleculares

A utilização de testes moleculares para detecção de ácidos nucléicos tem sido cada vez mais disseminada nos laboratórios clínicos e de pesquisa.¹² Apesar do "padrão ouro" para a identificação viral continuar a ser a cultura viral, esta técnica possui algumas desvantagens como as altas taxas de

contaminação; demora na obtenção de um resultado (levando de dias a semanas dependendo do vírus isolado) e a existência de vírus não-cultiváveis.¹²⁶⁻¹²⁸ Oferecendo alternativas as desvantagens da técnica de cultura viral, os métodos de detecção de ácidos nucleicos têm ganhado espaço nos estudos destes patógenos.^{126,127,129} Embora também existam métodos imunológicos para a identificação de agentes virais, os ensaios de detecção de ácidos nucleicos estão provando ser mais precisos e mais rápidos.^{125-127,130} Geralmente os resultados são relatados em horas em relação a dias ou semanas para convencional cultura de células.¹²⁶ Os testes moleculares não só fornecem detecção viral mais rápida, precisa e sensível, mas também tem aumentado a compreensão de vírus emergentes, como o vírus influenza A (H1N1) responsável pela pandemia de gripe de 2009.^{125,128}

Existem várias técnicas moleculares possíveis de serem aplicadas ao diagnóstico viral. Exemplos de técnicas utilizadas em diagnóstico molecular são: reação em cadeia da polimerase ou PCR (*Polymerase chain reaction*), NASBA (*Nucleic acid sequence based amplification* ou amplificação baseada em sequência de ácido nucleico) uma amplificação isotérmica assim como a técnica LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) e a técnica de bDNA (*branched-DNA*) baseada em amplificação do sinal pelo uso de sonda ramificada.^{12,127,129} Muitas destas técnicas estão disponíveis em kits comerciais, mas estes testes, especialmente quando voltados para múltiplos vírus, tornam-se consideravelmente caros.^{127,128} Alternativamente, protocolos de técnicas moleculares têm sido padronizados pelos próprios laboratórios executores (testes *in-house* ou *home-brew*). Testes *in-house* têm um custo de execução mais acessível e possibilitam o uso destas tecnologias por laboratórios clínicos e voltados para pesquisa.¹²

Entre técnicas moleculares citadas acima, a mais conhecida e mais utilizada é a PCR. A invenção da PCR pelo Dr. Kary Mullis em 1983 revolucionou o campo da biologia molecular e medicina moderna.¹²⁶ Multiplicar um fragmento específico do DNA até que sua concentração em dada solução seja suficiente para ser detectável por métodos simples é a grande utilidade desta técnica. A reação de amplificação pelo PCR convencional envolve também etapas pré-PCR (extração ou isolamento do ácido nucleico molde) e

etapas pós-PCR para detecção do resultado da amplificação (eletroforese ou outro método de identificação do fragmento amplificado). A etapa de extração é de extrema importância para a garantia dos resultados da amplificação, já que a PCR depende de um molde de qualidade. A etapa pós-PCR tem como objetivo primário demonstrar o fragmento que foi amplificado e o método mais comumente empregado para isso é a eletroforese em gel de agarose.¹³¹⁻¹³³

Mais recentemente houve a introdução da tecnologia de PCR em tempo real (*real-time PCR*). Esta denominação é utilizada para definir uma PCR onde as etapas de amplificação e detecção ocorrem simultaneamente, em um mesmo tubo de reação. Para isso é necessário que entre os reagentes seja acrescentado um marcador (fluoróforo) que propicie um aumento de fluorescência proporcional ao aumento do fragmento amplificado. Este método pode ser utilizado para quantificação do alvo na amostra, o que dificilmente se consegue com a PCR convencional seguida de eletroforese em gel. Porém, para ensaios de quantificação absoluta (determinação do número de cópias do fragmento de interesse presentes na amostra) existe a necessidade de uso de uma curva contendo padrões com as quantidades conhecidas e pré-estabelecidas daquele alvo. Em ensaios qualitativos, a PCR em tempo real diminuiu o tempo para execução total do ensaio e a manipulação do DNA amplificado, pois elimina a etapa de pós-PCR.¹³¹⁻¹³³ Estas vantagens da PCR em tempo real têm facilitado ainda mais a disseminação desta técnica entre os laboratórios voltados para o diagnóstico clínico.^{127,129}

2.5.3 Métodos moleculares para tipagem viral

De uma maneira geral o termo “tipagem viral” refere-se à identificação e caracterização de subtipos, genótipos ou cepas virais. Normalmente para tipagem viral são utilizados métodos baseados em testes imunológicos ou moleculares para caracterização de proteínas virais (ou genes codificantes de proteínas virais) consideradas alvo. Os métodos moleculares têm ganhado mais espaço entre os laboratórios porque são de execução mais rápida, muitos profissionais atualmente são habilitados para sua execução e os anticorpos para uso nos métodos sorológicos são de difícil obtenção. Ainda estes métodos têm como vantagem possibilitarem o uso de amostras clínicas diretamente,

sem a necessidade de passagem em cultura para a multiplicação do inócuo inicial.^{26,134} As técnicas moleculares mais utilizadas são a PCR e o sequenciamento. Outras técnicas são utilizadas associadas à PCR, como RFLP (*restriction fragment length polymorphism* ou análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição), hibridização ou mesmo técnica de *microarray*.⁵³

Estes métodos utilizam regiões codificantes de proteínas variáveis entre as diferentes cepas, genótipos ou subtipos virais para estudo e distinção entre os diferentes tipos virais. Por exemplo, a tipagem de AdV é normalmente direcionada para estudo das sequências dos genes da fibra ou do hexon, embora *nontranslated genes* também possam ser investigados.^{26,44,135} Para o VRS a região gênica mais estudada pertence à proteína G viral, uma proteína de ligação do vírus à célula do hospedeiro. A segunda região variável desta proteína é a mais analisada para reportar os diferentes genótipos do VRS.^{102,103} Alguns autores têm proposto também o estudo de outros genes, como os que codificam a proteína F ou SH.^{136,137} O vírus IF tem suas cepas determinadas principalmente pelo estudo dos genes que codificam as proteínas HA e NA.⁵³ Porém alguns estudos têm trabalhado com mais regiões genômicas ou até mesmo com o genoma completo deste vírus. Estes estudos de genoma completo podem ser importantes devido à característica do IF possuir segmentos genômicos e poder sofrer “shift” de segmentos, além das mutações de ponto.^{138,139} O PIV é identificado em seus quatro diferentes tipos através de do seu gene para proteína de superfície HN.¹⁴⁰

Assim, os métodos de tipagem viral têm grande importância para identificar e confirmar organismos de preocupação particular de saúde de uma maneira rápida e oportuna. Estes métodos têm lugar de destaque em programas de vigilância objetivando controlar a propagação de agentes infecciosos e para auxiliar a fins de investigação epidemiológica.¹³⁴

3.0 Objetivos

3.1 Objetivos gerais

3.1.1 Estudar a epidemiologia molecular do vírus sincicial respiratório e descrever a epidemiologia dos seguintes vírus: influenza, adenovírus e parainfluenza em casos clínicos atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Caracterizar o número de casos de infecções, número de internações, infecções hospitalares e letalidade causada por vírus respiratórios em crianças atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre 2007 a 2010.

3.2.2 Validar técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real para detecção e classificação em subgrupos dos vírus sincicial respiratório e influenza.

3.2.3 Caracterizar a diversidade genética do gene que codifica a proteína G do vírus sincicial respiratório em amostras obtidas de crianças atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre com infecções comunitárias e hospitalares.

4.0 Referências Bibliográficas

1. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:74–98.
2. WHO. Burden of Disease Project 2005. Geneva: World Health Organization. Disponível: www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html
3. Brown CS, Andraghetti R, Paget J. (WHO Regional Office for Europe). WHO Regional Office for Europe guidance for influenza surveillance in humans. Copenhagen (Denmark). 2009.
4. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet.* 2010; 375(9730):1969-87.
5. Mao L, Yang Y, Qiu Y, Yang Y. Annual economic impacts of seasonal influenza on US counties: Spatial heterogeneity and patterns. *Int J Health Geogr.* 2012 May17;11:16.
6. Zoorob R, Sidani M, Murray J. Croup: an overview. *Am Fam Physician.* 2011;83:1067-73.
7. Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, Sullivan AF, Forgey T, Clark S, et al. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2012; Aug 166:700-6.
8. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med.* 2005; 352:1749-59.
9. Caram LB, Chen J, Taggart EW, Hillyard DR, She R, Polage CR, Twersky J, et al. Respiratory syncytial virus outbreak in a long-term care facility detected using reverse transcriptase polymerase chain reaction: an argument for real-time detection methods. *J Am Geriatr Soc.* 2009; 57:482-5.
10. Cordero E, Folgueira MD, Marcos MA, López Medrano F. Other viral infections in solid organ transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012 Mar;30 Suppl 2:70-5.
11. Cunha BA, Syed U, Hage JE. Respiratory syncytial virus (RSV) community-acquired pneumonia (CAP) in a hospitalized adult with human immunodeficiency virus (HIV) mimicking influenza A and *Pneumocystis (carinii) jiroveci* pneumonia (PCP). *Heart Lung.* 2012 Jan-Feb;41:76-82.

12. Kesson AM. Respiratory virus infection. *Paediatr Respir Rev.* 2007; 8: 240-8.
13. Moura FEA, Nunes IFS, Silva GB, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus infection in Northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74:165–7.
14. Goddard NL, Cooke MC, Gupta RK, Nguyen-Van-Tam JS. Timing of monoclonal antibody for seasonal RSV prophylaxis in the United Kingdom. *Epidemiol Infect.* 2007; 135:159–62.
15. Murray EL, Klein M, Brondi L, McGowan JE, Van Mels C, Brooks WA, et al. Rainfall, household crowding, and acute respiratory infections in the tropics. *Epidemiol Infect.* 2012;140:78-86.
16. Lynch JP, Fishbein M, Echavarria M. Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med* 2011; 32:494-511.
17. Kim YJ, Hong JY, Lee HJ, Shin SH, Kim YK, Inada T, et al. Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:4594–9.
18. Nakamura M, Hirano E, Kowada K, Ishiguro F, Yamagishi Z, Adhikary AK, et al. Surveillance of adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukui Prefecture, Japan, 1995-2010. *J Med Virol.* 2012 Jan;84:81-6.
19. Gatherer D. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J Clin Virol.* 2009 Jul;45:174-8.
20. Cabello C, Manjarrez ME, Olvera R, Villalba J, Valle L, Paramo I. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico City. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;10:21-4.
21. Pecchini R, Berezin EN, Felício MC, Passos SD, Souza MC, Lima LR, et al. Incidence and clinical characteristics of infection by respiratory syncytial virus children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. *Braz J Infect Dis.* 2008 Dec;12:476-9.
22. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med.* 2009 Feb 5;360:588-98.
23. Dabisch-Ruthe M, Vollmer T, Adams O, Knabbe C, Dreier J Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory viral infections: evaluation of xTAG respiratory virus panel fast assay, RespiFinder 19 assay and RespiFinder SMART 22 assay. *BMC Infect Dis.* 2012; 12:163.

24. Fox JD. Respiratory virus surveillance and outbreak investigation. *J Clin Virol.* 2007; 40 Suppl 1: S24–S30.
25. Rowe WP, Heubner R, Gilmore L, Parrot R, Ward T. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953; 84:570-3.
26. Robinson C, Echavarria M. Adenovirus. In: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, Washington: ASM Press; 2007. p. 1589-1600.
27. Jones MS 2nd, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, et al. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol.* 2007 Jun;81:5978-84.
28. Lee J, Choi EH, Lee HJ. Comprehensive serotyping and epidemiology of human adenovirus isolated from the respiratory tract of Korean children over 17 consecutive years (1991-2007). *J Med Virol.* 2010 Apr;82:624-31.
29. Shenk TE. Adenoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*, 4th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2001. p. 1789-1810.
30. Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010; 343:195–224.
31. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. 6^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
32. Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, Leistner-Segal S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Feb;106:56-60.
33. Al Qurashi YM, Guiver M, Cooper RJ. Sequence typing of adenovirus from samples from hematological stem cell transplant recipients. *J Med Virol.* 2011 Nov;83:1951-8.
34. Khor CS, Sam IC, Hooi PS, Quek KF, Chan YF. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC Pediatr.* 2012 Mar 20;12:32.

35. Erdman DD, Xu W, Gerber SI, Gray GC, Schnurr D, Kajon AE, et al. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966-2000. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:269–77.
36. Trei JS, Johns NM, Garner JL, Noel LB, Ortman BV, Ensz KL, et al. Spread of adenovirus to geographically dispersed military installations, May-October 2007. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:769–75.
37. Kajon AE, Lu X, Erdman DD, Louie J, Schnurr D, George KS, et al. Molecular epidemiology and brief history of emerging adenovirus 14-associated respiratory disease in the United States. *J Infect Dis.* 2010; 202:93–103.
38. Wadell G, Cooney MK, da Costa Linhares A, de Silva L, Kennett ML, Kono R, et al. Molecular epidemiology of adenoviruses: global distribution of adenovirus 7 genome types. *J Clin Microbiol.* 1985; 21: 403–8.
39. Li QG, Zheng QJ, Liu YH, Wadell G. Molecular epidemiology of adenovirus types 3 and 7 isolated from children with pneumonia in Beijing. *J Med Virol.* 1996; 49:170–7.
40. Noda M, Yoshida T, Sakaguchi T, Ikeda Y, Yamaoka K, Ogino T. Molecular and epidemiological analyses of human adenovirus type 7 strains isolated from the 1995 nationwide outbreak in Japan. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:140–5.
41. Kajon AE, Wadell G. Molecular epidemiology of adenoviruses associated with acute lower respiratory disease of children in Buenos Aires, Argentina (1984–1988). *J Med Virol.* 1992; 36:292–7.
42. Murtagh P, Cerqueiro C, Halac A, Avila M, Kajon A. Adenovirus type 7h respiratory infections: a report of 29 cases of acute lower respiratory disease. *Acta Paediatr.* 1993; 82:557–61.
43. Moura PO, Roberto AF, Hein N, Baldacci E, Vieira SE, Ejzenberg B, et al. Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 2007; 79:174–81.
44. McCarthy T, Lebeck MG, Capuano AW, Schnurr DP, Gray GC. Molecular typing of clinical adenovirus specimens by an algorithm which permits detection of adenovirus coinfections and intermediate adenovirus strains. *J Clin Virol.* 2009; 46: 80–4.
45. Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2006; 43:331–339.
46. Wang H, Tuve S, Erdman DD, Lieber A. Receptor usage of a newly emergent adenovirus type 14. *Virology* 2009; 387: 436–41.

47. Berciaud S, Rayne F, Kassab S, Jubert C, Faure-Della Corte M, Salin F, et al. Adenovirus infections in Bordeaux University Hospital 2008-2010: Clinical and virological features. *J Clin Virol*. 2012;54:302-7.
48. Chakrabarti S, Mulligan DW, Moss PA, Mautner V. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis, and management. *Leuk Lymphoma*. 2004; 45: 873-85.
49. Potter RN, Cantrell JA, Mallak CT, Gaydos JC. Adenovirus-associated deaths in US military during postvaccination period, 1999–2010. *Emerg Infect Dis*. 2012 Mar; 18: 507–9.
50. Humar A, Kumar D, Mazzulli T, Razonable RR, Moussa G, Paya CV, et al. A surveillance study of adenovirus infection in adult solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005; 5:2555–9.
51. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*, 5th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2007. p. 1812-52.
52. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviridae. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*, 5th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2007. p. 1852-82.
53. Atmar RL. Influenza Viruses. In: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, Washington: ASM Press, 2007. p.1340-51.
54. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*. 2005; 79:2814-22.
55. Bragstad K, Nielsen LP, Fomsgaard A. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: a complete genome study. *Virol J*. 2008 Mar 7;5:40.
56. Steinhauer DA, Skehel JJ. Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet*. 2002; 36:305-32.
57. Zell R, Krumbholz A, Wutzler P. Influenza A virus PB1-F2 gene. *Emerg Infect Dis*. 2006 Oct;12:1607-8.
58. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009 Jul 10;325:197-201.
59. Bridges CB, Kuehnert MJ, Hall CB. Transmission of influenza: implications for control in health care settings. *Clin Infect Dis*. 2003; 37: 1094-101.

60. Suess T, Remschmidt C, Schink SB, Schweiger B, Nitsche A, Schroeder K, et al. The role of facemasks and hand hygiene prevention of influenza transmission in households: results from cluster randomised trial; Berlin, Germany, 2009-2011. *BMC Infect Dis.* 2012 Jan 26;12:26.
61. Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, et al. Avian influenza A(H5N1) infection in humans. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1374-85.
62. Shaman J, Goldstein E, Lipsitch M. Absolute humidity and pandemic versus epidemic influenza. *Am J Epidemiol.* 2011 Jan 15;173:127-35.
63. Cowling BJ, Lau EH, Lam CL, Cheng CK, Kovar J, Chan KH, et al. Effects of school closures, 2008 winter influenza season, Hong Kong. *Emerg Infect Dis.* 2008 Oct;14:1660-2.
64. CDC (homepage na Internet). Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. (atualizada em julho de 2011; acesso em setembro de 2012). Disponível em: <http://www.cdc.gov/flu/about/disease/index.htm>
65. Chutinimitkul S, Chieochansin T, Payungporn S, Samransamruajkit R, Hiranras T, Theamboonlers A, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses among infants and children in Thailand. *Virus Res.* 2008 Mar;132:122-31.
66. LaRussa P. Pandemic novel 2009 H1N1 influenza: what have we learned? *Semin Respir Crit Care Med.* 2011 Aug;32:393-9.
67. Martirosyan L, Paget WJ, Jorgensen P, Brown CS, Meerhoff TJ, Pereyaslov D, et al. The community impact of the 2009 influenza pandemic in the WHO European region: a comparison with historical seasonal data from 28 countries. *BMC Infect Dis.* 2012 Feb 10;12:36.
68. Libster R, Bugna J, Coviello S, Hijano DR, Dunaiewsky M, Reynoso N, et al. Pediatric hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Argentina. *N Engl J Med.* 2010; 362:45-55.
69. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep.* 2010 Apr;125 Suppl 3:16-26.
70. Redlberger-Fritz M, Aberle JH, Popow-Kraupp T, Kundi M. Attributable deaths due to influenza: a comparative study of seasonal and pandemic influenza. *Eur J Epidemiol.* 2012 Jul;27:567-75.
71. Ministério da Saúde, Brasil, 2012. Vigilância de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) – Informe Técnico de Influenza. Brasília, 2012.
72. Chowell G, Viboud C, Simonsen L, Miller MA, Echevarría-Zuno S, González-León M, et al. Impact of antiviral treatment and hospital admission

delay on risk of death associated with 2009 A/H1N1 pandemic influenza in Mexico. *BMC Infect Dis.* 2012 Apr 20;12:97.

73. Kuroya N, Ishida M. Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. Isolation of new virus possessing hemagglutinin activity. *Yokohama Med Bull.* 1953; 4:217–33.

74. Chanock RM, Murphy BR, Collins PL. Parainfluenza viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*, 4th Edition, Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001.

75. Henrickson KJ. Parainfluenza Viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Apr;16:242-64.

76. Falsey AR. Current management of parainfluenza pneumonitis in immunocompromised patients: a review. *Infect Drug Resist.* 2012;5:121-7.

77. Leland DS. Parainfluenzavirus and Mumps viruses. In: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, Washington: ASM Press, 2007. p.1352-60.

78. Canchola J, Vargosko AJ, Kim HW. Antigenic variation among newly isolated strains of parainfluenza type 4 virus. *Am J Hyg.* 1964; 79: 357–64.

79. Prinoski K, Cote MJ, Kang CY, Dimock K. Evolution of the fusion protein gene of human parainfluenza virus 3. *Virus Res.* 1992; 22:55–69.

80. Henrickson KJ, Savatski LL. Antigenic structure, function, and evolution of the hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 1. *J Infect Dis.* 1997; 176:867–75.

81. Collins KR, Easton AJ. Sequence variation in the haemagglutinin-neuraminidase gene of human parainfluenza virus type 3 isolates in the UK. *Epidemiol Infect.* 1995; 114:493–500.

82. Mao N, Ji Y, Xie Z, Wang H, Wang H, An J, et al. Human Parainfluenza Virus-Associated Respiratory Tract Infection among Children and Genetic Analysis of HPIV-3 Strains in Beijing, China. *PLoS ONE.* 2012; 7: e43893.

83. Schomacker H, Schaap-Nutt A, Collins PL, Schmidt AC. Pathogenesis of acute respiratory illness caused human parainfluenza viruses. *Curr Opin Virol.* 2012 Jun;2:294-9.

84. Khamis FA, Al-Kobaisi MF, Al-Areimi WS, Al-Kindi H, Al-Zakwani I. Epidemiology of respiratory virus infections among infants and young children admitted to hospital in Oman. *J Med Virol.* 2012 Aug;84:1323-9.

85. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med.* 2001;344:1917–28.
86. Sofer S, Dagan R, Tal A. The need for intubation in serious upper respiratory tract infection in pediatric patients (a retrospective study). *Infection.* 1991;19:131-134.
87. Rosychuk RJ, Klassen TP, Metes D, Voaklander DC, Senthilselvan A, Rowe BH. Croup presentations to emergency departments in Alberta, Canada. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45:83-91.
88. Mazza D, Wilkinson F, Turner T, Harris C; Health for Kids Guideline Development Group. Evidence based guideline for the management of croup. *Aust Fam Physician.* 2008;37:14-20.
89. Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis.* 2011 May;52 Suppl 4:S284-9.
90. Henrickson KJ, Hoover S, Kehl KS, Weimin J. National disease burden of respiratory viruses detected in children by polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23:S11-S18.
91. Hohenthal R, Nikoskelainer J, Vainionppa R, Peltonen R, Routamaa M, Itala M, et al. Parainfluenza virus type 3 infections in a hematology unit. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:295-300.
92. Dignan F, Alvares C, Riley U, Ethell M, Cunningham D, Treleaven J, et al. Parainfluenza type 3 infection post stem cell transplant: high prevalence but low mortality. *J Hosp infect.* 2006 Aug;63:452-8.
93. Stankova J, Carret AS, Moore D, McCusker C, Mitchell D, Davis M, et al. Long-term therapy with aerosolized ribavirin for parainfluenza 3 virus respiratory tract infection in an infant with severe combined immunodeficiency. *Pediatr Transplant.* 2007;11:209–13.
94. Blount RE, Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956;92:544-9.
95. Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg.* 1957;66:281-90.
96. Collins PL, Crowe JE Jr. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology*, 5th Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2007. p. 1234-85.
97. Wright M, Piedimonte G. Respiratory Syncytial Virus Prevention and Therapy: Past, Present and Future. *Pediatric Pulmonology.* 2011;46:324-7.

98. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010 May 1;375:1545-55.
99. Hall CB. Respiratory syncytial virus in young children. *Lancet*. 2010 May 1;375:1500-2.
100. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84:5625-9.
101. Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jan;13:1-15.
102. Tang Y; Crowe JE. Respiratory Syncytial virus and Human Metapneumovirus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, Washington: ASM Press, 2007. p.1361-77.
103. Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol*. 1998; 79:2221-9.
104. Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, et al. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis*. 2000;181:1891-6.
105. Zhang ZY, Du LN, Chen X, Zhao Y, Liu EM, Yang XQ, et al. Genetic variability of respiratory syncytial viruses (RSV) prevalent in Southwestern China from 2006 to 2009: emergence of subgroup B and A RSV as dominant strains. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr;48:1201-7.
106. Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, et al. Natural History of Human Respiratory Syncytial Virus Inferred from Phylogenetic Analysis of the Attachment (G) Glycoprotein with a 60-Nucleotide Duplication. *J Virol*. 2006; 80: 975-84.
107. Weissenbacher M C, Ávila M M. Os vírus como causa de IRA alta e baixa em crianças: características gerais e diagnóstico. In: Benguigui Y, Antuñano FJL, Schmunis G, Yunes J. *Infecções respiratórias em crianças*, Washington: Pan American Health Organization, 1999.
108. Beem M. Repeated infections with respiratory syncytial virus. *J Immunol* 1967; 98:1115-22.

109. Yamaguchi M, Sano Y, Dapat IC, Saito R, Suzuki Y, Kumaki A, et al. High frequency of repeated infections due to emerging genotypes of human respiratory syncytial viruses among children during eight successive epidemic seasons in Japan. *J Clin Microbiol*. 2011 Mar;49:1034-40.
110. Donaldson GC. Climate change and the end of the respiratory syncytial virus season. *Clin Infect Dis*. 2006;42:677-9.
111. Mak GC, Wong AH, Ho WY, Lim W. The impact of pandemic influenza A (H1N1) 2009 on the circulation of respiratory viruses 2009-2011. *Influenza Other Respi Viruses*. 2012 May;6:e6-10.
112. Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF, et al. Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus in Kilifi District, Kenya. *J Med Virol*. 2004;74:344–354.
113. Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985–2001 - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:221–30.
114. Thorburn K, Kerr S, Taylor N, van Saene HK. RSV outbreak in a paediatric intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2004;57:194e201.
115. Tatochenko V, Uchaikin V, Gorelov A, Gudkov K, Campbell A, Schulz G, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children ≤ 2 years of age hospitalized with lower respiratory tract infections in the Russian Federation: a prospective, multicenter study. *Clin Epidemiol*. 2010;2:221-7.
116. Domachowske JB, Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis and treatment. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:298-309.
117. Hall CB, McCarthy. Respiratory syncytial virus In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of infectious diseases, vol2. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000.
118. Hurwitz JL. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2011 Oct;10:1415-33.
119. Weckx LY, Fernandes MM, Monteiro AI, Souza AR, Moraes-Pinto MI. Optimization strategy to minimize wastage of palivizumab during the 2008 RSV season in São Paulo, Brazil. *J Trop Pediatr*. 2009;55:341-2.
120. AAP - American Academy of Pediatrics. Respiratory Syncytial Virus. In Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 28th ed. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics. 2009. p.560-9.
121. SBP – Sociedade Brasileira de Pediatria, 2011. Diretrizes para o manejo da infecção causada pelo vírus sincicial respiratório (VSR). Disponível em:

http://www.sbp.com.br/show_item2.cfm?id_categoria=89&id_detalhe=3996&tipo_detalhe=S. Acesso em: setembro 2012.

122. Blaschke AJ, Allison MA, Meyers L, Rogatcheva M, Heyrend C, Mallin B, et al. Non-invasive sample collection for respiratory virus testing by multiplex PCR. *J Clin Virol*. 2011 Nov;52:210-4.

123. Mackie PL, Joannidis PA, Beattie J. Evaluation of an acute point-of-care system screening for respiratory syncytial virus infection. *J Hosp Infect*. 2001; 48: 66–71.

124. Khanom AB, Velvin C, Hawrami K, Schutten M, Patel M, Holmes MV, et al. Performance of a nurse-led paediatric point of care service for respiratory syncytial virus testing in secondary care. *J Infec*. 2011; 62: 52-8.

125. Ganzenmueller T, Kluba J, Birgit H, Puppe W, Verhagen W, Heim A, et al. Comparison of the performance of direct fluorescent antibody staining, a point-of-care rapid antigen test and virus isolation with that of RT-PCR for the detection of novel 2009 influenza A (H1N1) virus in respiratory specimens. *J Med Microbiol*. 2010; 59:713–7.

126. Josko D. Molecular virology in the clinical laboratory. *Clin Lab Sci*. 2010 Fall;23:231-6.

127. Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, Westin J, Lindh M. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011; 9:615–26.

128. Mahony JB, Petrich A, Smieja M. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011; 48: 217–49.

129. Kehl SC, Kumar S. Utilization of Nucleic Acid Amplification Assays for the Detection of Respiratory Viruses. *Clin Lab Med*. 2009; 29:661–71.

130. Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang M, Cent A, Corey L, et al. Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:2382–8.

131. Powledge, TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ*. 2004; 28: 44-50.

132. Lo YM, Chan KC. Introduction to the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 2006; 336:1-10.

133. Nolte FS, Caliendo AM. Molecular detection and identification of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition, Washington: ASM Press, 2007. p. 218-4.

134. Josko D. Molecular Diagnostics in the Public Health Laboratories. *Clin Lab Sci.* 2010;23:242.
135. Ylihärsilä M, Harju E, Arppe R, Hattara L, Hölsä J, Saviranta P, et al. Genotyping of clinically relevant human adenoviruses by array-in-well hybridization assay. *Clin Microbiol Infect.* 2012; May 28. Epub ahead of print.
136. Gaunt ER, Jansen RR, Poovorawan Y, Templeton KE, Toms GL, Simmonds P. Molecular Epidemiology and Evolution of Human Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus. *PLoS ONE.* 2011Mar;6:e17427.
137. Lima HN, Botosso VF, Oliveira DB, Campos AC, Leal AL, Silva TS, et al. Molecular epidemiology of the SH (small hydrophobic) gene of human respiratory syncytial virus (HRSV), over 2 consecutive years. *Virus Res.* 2012 Jan;163:82-6.
138. Ellis JS, Alvarez-Aguero A, Gregory V, Lin YP, Hay A, Zambon MC. Influenza AH1N2 Viruses, United Kingdom, 2001–02 Influenza Season. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 304-10 .
139. Smith GJD, Vijaykrishna D, Ellis TM, Dyrting KC, Connie LYH, Bahl J, et al. Characterization of Avian Influenza Viruses A (H5N1) from Wild Birds, Hong Kong, 2004–2008. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:402-7.
140. Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Meth.* 2005;126:53–63.

5.0 Artigos

5.1 Artigo 1 - Viral epidemiology of pediatric respiratory infections at a tertiary hospital in Southern Brazil

Artigo a ser submetido para a revista "Brazilian Journal of Infectious Diseases"

Running title: Respiratory viruses in Southern Brazil.

Title: Viral epidemiology of pediatric respiratory infections at a tertiary hospital in Southern Brazil.

ABSTRACT

Respiratory tract infections (RTIs) of viral origin are a major cause of morbidity and mortality in children. This study sought to report the epidemiology of human respiratory syncytial virus (RSV), influenza (IF), parainfluenza viruses (PIV) and human adenovirus (ADV) in pediatric patients attending at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) from 2007 to 2010, including data on the 2009 influenza A(H1N1) pandemic. Variables such as number of cases of viral infection, hospitalizations in general wards and intensive care units (ICUs), nosocomial infections and lethality rates were collected. We observed a trend toward an increased number of emergency department visits and confirmed cases in the winter months. RSV accounted for most nosocomial infections. Rates of ICU admission for ADV and RSV infection were highest in 2007 and 2010. During 2008–2009, H1N1 and ADV had the highest ICU admission rates. ADV had the highest fatality rates during 2007–2009 (7.14%, 16.67%, and 7.14%). The lethality rate of H1N1 was similar to that of ADV (7.14%). In summary, each virus can exhibit distinct behavior, causing hospitalization, nosocomial outbreaks or lethality in children. Surveillance of well-known viruses and emerging threats is important for management and to minimize impact on the community.

KEYWORDS: Respiratory viruses; human respiratory syncytial virus; influenza virus; parainfluenza virus; human adenovirus; influenza A (H1N1) virus.

INTRODUCTION

Respiratory tract infections (RTIs) are a major cause of morbidity and mortality in children worldwide^{1,2,3}. According to World Health Organization data, RTIs account for the deaths of approximately 4 million children per year. Two-thirds of these deaths occur in infants during the first year of life, and 90% occur in developing countries^{4,5}. Viruses are the most common causative agents of RTI, and are responsible for a substantial percentage of childhood mortality^{6,7}. Traditionally, the most widely researched viruses implicated in RTIs include human respiratory syncytial virus (RSV), influenza viruses (IF), parainfluenza viruses (PIV), and human adenovirus (ADV)⁸. These viruses circulate within the community and are the cause of many hospitalizations. Therefore, viral respiratory infections in hospital wards (nosocomial infection) are also observed all year. Increased hospitalization rates and nosocomial outbreaks can create a major financial burden^{9,10,11}.

The importance of respiratory virus surveillance has grown over the last 10 years, due to the unexpected emergence of several new respiratory viruses, including influenza A(H5N1), human metapneumovirus, SARS coronavirus, coronavirus NL63, human bocavirus, and influenza A(H1N1)^{12,13}. Furthermore, the seasonality of some respiratory viruses is well established, and viral surveillance and laboratory-based diagnostics play an important role in guiding the timing of prophylaxis and other interventions¹⁴. On the other hand, this seasonality may be variable. In temperate regions, for instance, viral infections tend to peak in the late fall and winter, whereas in tropical regions, they occur over extended periods associated with the rainy season¹⁵. In Brazil, a continental country that is host to many different climates, regional surveillance

studies on viral patterns play an essential role in the planning of prophylaxis programs and other interventions. Thus, this study aimed to report the epidemiology of major respiratory viruses (RSV, IF, PIV and ADV) among pediatric patients seen at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) between 2007 and 2010, including data on the 2009 pandemic influenza A(H1N1).

MATERIALS AND METHODS

Population profile and study design

Porto Alegre is the capital of the Brazilian state of Rio Grande do Sul, located at 10 m above mean sea level, latitude 30.01 S, longitude 51.13 W, mean annual temperature 19°C, area 497km², with a population of approximately 1.5 million. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) is a university-affiliated tertiary referral hospital with over 800 beds that serves the population of Porto Alegre and its metropolitan region.

This study followed an observational design and the data on all variables were collected from children (age 0–12 years) seen at HCPA between 2007 and 2010. We ascertained the number of cases of respiratory infection attributable to each viral agent of interest, the number of patients admitted to general wards and intensive care units (ICUs), the number of nosocomial infections, and lethality rates. The study protocol was approved by the HCPA Research Ethics Committee.

Laboratory detection of viruses

Detection of RSV, ADV, IF, and PIV in nasopharyngeal aspirates was performed by indirect immunofluorescence (IIF) assay using commercially available monoclonal antibodies (Medivax®, Dublin, Ireland). Influenza A(H1N1)

detection was performed using real-time PCR as per the CDC (Centers for Disease Control and Prevention) protocol¹⁶. This assay was performed in Brazilian reference laboratories.

Definition and analysis of study variables

The number of IIF-confirmed cases of infection with each of the respiratory viruses of interest (RSV, IF, PIV and ADV) was obtained from HCPA Infection Control Committee reports, as was the number of hospitalizations in general wards and ICUs. The criteria for nosocomial infection included absence of respiratory symptoms at the time of admission and detection of a respiratory virus within 7 days after admission¹⁷. Nosocomial infection rates were calculated as the percentage of nosocomial infections attributable to each virus divided by the total number of nosocomial infections attributable to all viruses \times 100.

The number of deaths due to viral respiratory tract infection was obtained and the case lethality rates for each virus calculated. Case lethality was calculated using the formula: (number of deaths / number of cases) \times 100. All results were obtained by descriptive analysis.

RESULTS

Approximately 12,160 pediatric patients were treated per year at the HCPA Emergency Department. The Emergency Department is the point of entry for the majority of patients seen at HCPA. The number of patients seen and the number of suspected and confirmed cases of viral RTIs (due to RSV,

IF, PIV and ADV) followed an upward trend during the winter months (June to August) of each year (Figure 1).

INSERT FIGURE 1 NEAR HERE

The number of confirmed cases stratified by virus and severity (admission to general wards or ICUs) is shown in Table 1. This table shows that RSV and ADV were responsible for the highest rates of ICU admission in 2007 and 2010, while in 2008 and 2009, H1N1 and ADV accounted for the highest rates of ICU admission.

INSERT TABLE 1 NEAR HERE

RSV was responsible for the highest rates of nosocomial infection throughout the study period (81.5%, 61%, 37.7% and 53.5% in 2007 through 2010 respectively) (Table 2). ADV had the highest case fatality rates from 2007 to 2009 (7.14%, 16.67%, and 7.14% respectively). In 2009, the case fatality rate of H1N1 was similar to that of ADV (7.14%) (Figure 2).

INSERT TABLE 2 AND FIGURE 2 NEAR HERE

DISCUSSION

In temperate regions, rates of viral infection generally tend to increase in the late fall and winter, whereas in tropical regions, this increase occurs over extended periods associated with the rainy season¹⁵. In our study, conducted in

Porto Alegre, we observed a trend toward increases in the number of confirmed cases of viral infection in the winter months (June to August) of each year (Figure 1). In fact, a substantial number of RSV and influenza cases occurred in these months. These viruses, particularly RSV, are highly prevalent among children (Table 1). Consequently, annual RSV outbreaks lead to increased attendance of children to the HCPA Emergency Department. The frequency and severity of RSV infections in this age group seem to be a consequence of complex and multifactorial events, mainly involving immunological factors^{18,19}. Palivizumab, a humanized monoclonal antibody, is currently recommended as prophylaxis for certain patient groups at risk of severe RSV infection¹¹. Despite its proven efficacy in reducing hospitalizations attributable to RSV, palivizumab is still exceedingly expensive for developing countries such as Brazil. Therefore, cost reductions through optimization of drug administration provide a way to allow more children to benefit from RSV prophylaxis²⁰.

Concerning nosocomial infections, RSV is known to be the foremost cause of hospital-acquired respiratory infections among children^{17,21}. The rates of hospital-acquired RSV infection observed in this study are consistent with this information (Table 2). However, these rates showed some variation in each year of the study period, and a decrease occurred in 2009. This downward trend in 2009 may have been associated with extensive circulation of H1N1 in this period. A similar phenomenon was reported by Mak and co-workers in Hong Kong, and is most likely explained by virus interference²².

Regarding the severity of respiratory infections, using ICU admission as a surrogate measure, we found higher rates of ICU admission for RSV and ADV infection in 2007 and 2010, whereas in 2008 and 2009, the highest rates of ICU

admission were attributable to H1N1 and ADV (Table 1). ADV infections often lead to severe clinical consequences in hospitalized patients^{23,24}, and these infections are a matter of great concern to the members of hospital infection control committees. During 2009, H1N1 accounted for a substantial portion of ICU admissions. Libster and colleagues also reported higher hospitalization rates due to H1N1 infection among Argentinean children. In Argentina, rates of hospitalization for H1N1 were double those for seasonal influenza in 2008²⁵. We observed a similar increase in hospitalization rates in our sample, showing that the emergence of H1N1 had a major impact on our health system. On the other hand, RSV can account for even higher ICU admission rates, as observed in 2007 and 2010 in this study. These variations are probably associated with circulating RSV genotypes and with the extent of the annual RSV outbreak in each year²⁶.

Our study also assessed the case lethality rates of viral RTIs. Mirroring the severity of respiratory infections as measured by ICU admission, ADV and H1N1 had the highest case fatality rates, as expected. Linch and coworkers reported that ADV disease is more severe, and dissemination more likely, in patients with impaired immunity²⁴. Due to their severe clinical manifestations and ability to start outbreaks, ADV infections are kept under close surveillance in the hospital setting. As for H1N1, this new emergent strain of influenza showed a distinct severity profile among pediatric patients. While seasonal influenza had case lethality rates in the region of 5%, the lethality rate of H1N1 was 7.14%. Other studies have also noted that influenza A(H1N1) is associated with substantial pediatric mortality^{25,27}. Important tools for minimizing the

severity of infection in children include antiviral therapy, particularly in patients with preexisting neurological disorders or chronic lung disease, and vaccination.

In summary, each respiratory virus can show a distinct pattern of behavior, causing hospitalization, nosocomial outbreaks, or even mortality in children. Monitoring and surveillance of well-known respiratory viruses and unexpected emerging threats plays an important role in guiding management and minimizing impact on the community. Consequently, viral surveillance studies are important to guide the timing of prophylaxis and other interventions. Surveillance of RSV peaks, for instance, helps track RSV seasonality and thus supports planning of prophylaxis for vulnerable children. Adequate surveillance of influenza plays a major role in the design of appropriate vaccines, the planning of prophylaxis schedules, and the detection of novel viruses¹⁴. Thus, respiratory illness surveillance strategies have the potential to reduce healthcare costs, morbidity and mortality.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), the Rio Grande do Sul Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS) and the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq).

REFERENCES

- 1) Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, et al. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005; 365:1147–52.
- 2) WHO/UN Children's Fund. Global action plan for prevention and control of pneumonia (GAPP). Geneva: World Health Organization and the United Nations Children's Fund, November 2009.
- 3) Khamis FA, Al-Kobaisi MF, Al-Areimi WS, et al. Epidemiology of Respiratory Virus Infections Among Infants and Young Children Admitted to Hospital in Oman. *J Med Virol*. 2012; 84:1323–29.
- 4) WHO. The World Health Report 2004 - changing history. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2004.
- 5) Cabello C, Manjarrez M, Olvera R, et al. Frequency of viruses associated with acute respiratory infections in children younger than five years of age at a locality of Mexico City. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 10:21-4.
- 6) Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, et al. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2:25-32.
- 7) 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;101:301-6.
- 8) Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, et al. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011; 9:615–26.

- 9) Thorburn K, Kerr S, Taylor N, et al. RSV outbreak in a paediatric intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2004; 57:194-201.
- 10) Moura PO, Roberto AF, Hein N, et al. Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in São Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 2007; 79:174–81.
- 11) O'Connell K, Boo T W, Keady D, et al. Use of Palivizumab and infection control measures to control an outbreak of respiratory syncytial virus in neonatal intensive care unit confirmed by real-time polymerase chain reaction. *J Hosp Infect.* 2011; 77:338-42.
- 12) Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, et al. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106: 56-60.
- 13) Dabisch-Ruthe M, Vollmer T, Adams O, et al. Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory viral infections: evaluation of xTAG respiratory virus panel fast assay, RespiFinder 19 assay and RespiFinder SMART 22 assay. *BMC Infect Dis.* 2012; 12:163.
- 14) Fox JD. Respiratory virus surveillance and outbreak investigation. *J Clin Virol.* 2007; 1: S24–S30.
- 15) Murray EL, Klein M, Brondi L, et al. Rainfall, household crowding, and acute respiratory infections in the tropics. *Epidemiol. Infect.* 2012; 140:78-86.
- 16) World Health Organization, 2009. CDC protocol of real time RT-PCR for swine influenza A (H1N1). Atlanta: WHO.
- 17) Mlinaric-Galinovic G, Varda-Brkic D. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000; 37:237–46.

- 18) Queiróz DAO, Durigon EL, Botoso VF, et al. Immune response to respiratory syncytial virus in young brazilian children. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35: 1183-93.
- 19) Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23:74-98.
- 20) Weckx LY, Fernandes MM, Monteiro AI, et al. Optimization strategy to minimize wastage of palivizumab during the 2008 RSV season in São Paulo, Brazil. *J Trop Pediatr.* 2009; 55:341-2.
- 21) Visser A, Delport S, Venter M. Molecular epidemiological analysis of a nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus associated pneumonia in Kangaroo mother care unit in South Africa. *J Med Virol.* 2008; 80:724-32.
- 22) Mak GC, Wong AH, Ho WY, et al. The impact of pandemic influenza A (H1N1) 2009 the circulation of respiratory viruses 2009 - 2011. *Influenza Other Resp Viruses.* 2012; 6:6-10.
- 23) Berciaud S, Rayne F, Kassab S, et al. Adenovirus infections in Bordeaux University Hospital 2008-2010: clinical and virological features. *J Clin Virol.* 2012; 54:302-7.
- 24) Lynch JP, Fishbein M, Echavarría M. Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011; 32:494-511.
- 25) Libster R, Bugna J, Coviello S, et al. Pediatric hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Argentina. *N Engl J Med.* 2010; 362:45-55.

- 26) Yamaguchi M, Sano Y, Daplat IC, et al. High frequency of repeated infections due to emerging genotypes of human respiratory syncytial viruses among children during eight successive epidemic seasons in Japan. *J Clin Microbiol.* 2011; 49:1034–40.
- 27) Lister P, Reynolds F, Parslow R, et al. Swine-origin influenza virus H1N1, seasonal influenza virus, and critical illness in children. *Lancet.* 2009; 374:605-7.

Figure Legends

Figure 1 – Number of patients treated for suspected infection with each respiratory virus (RSV, IF, PIV and ADV) and confirmed cases of infection, 2007–2010.

Figure 2 – Lethality rates of respiratory viruses (RSV, IF, PIV and ADV), 2007–2010.

Table I – Number of confirmed cases by virus (ADV, IF, PIV and RSV) and severity (rate of admission to general wards or intensive care unit).

	ADV			IF			H1N1			PIV			RSV		
	admissions	ICU	cases	admissions	ICU	cases	admissions	ICU	cases	admissions	ICU	cases	admissions	ICU	cases
	(%)	(%)		(%)	(%)		(%)	(%)		(%)	(%)		(%)	(%)	
		2				—	—	—		5				32	
2007	14	8 (57.1)	(14.3)	25	5 (20)	2 (8)			68	23 (33.8)	(7.3)	201	119 (59.2)	(15.9)	
		2			4	—	—	—		7				38	
2008	12	10 (83.3)	(16.6)	20	11 (55)	(20)			136	34 (25)	(5.1)	296	168 (56.7)	(12.8)	
		2			5			7		5				25	
2009	14	9 (64.3)	(14.3)	105	50 (47.6)	(4.8)	28	18 (64.3)	(25)	105	67 (63.8)	(4.8)	264	157 (59.5)	(9.5)
		2				—	—	—						33	
2010	18	14 (77.8)	(11.1)	6	4 (66.7)	0 (0)			98	60 (61.2)	2 (2)	307	259 (84.4)	(10.7)	
		8			18	—	—	—		19				128	
Total	58	41 (70.7)	(13.8)	184	88 (47.8)	(9.8)			407	184 (45.2)	(4.7)	1068	783 (73.3)	(12)	

Table II – Rates of nosocomial infection by respiratory viruses (RSV, IF, PIV and ADV) in each year (2007-2010).

Nosocomial infections					
	ADV (%)	IF (%)	H1N1 (%)	PIV (%)	RSV (%)
2007	11	0	0	7	81.5
2008	12	2	0	24.5	61
2009	1.4	29	4	27.5	37.7
2010	4.6	2	0	39.5	53.5

Nosocomial infection rates were calculated as the percentage of nosocomial infections caused by each virus/total number of viral nosocomial infections x 100.

Figure 1

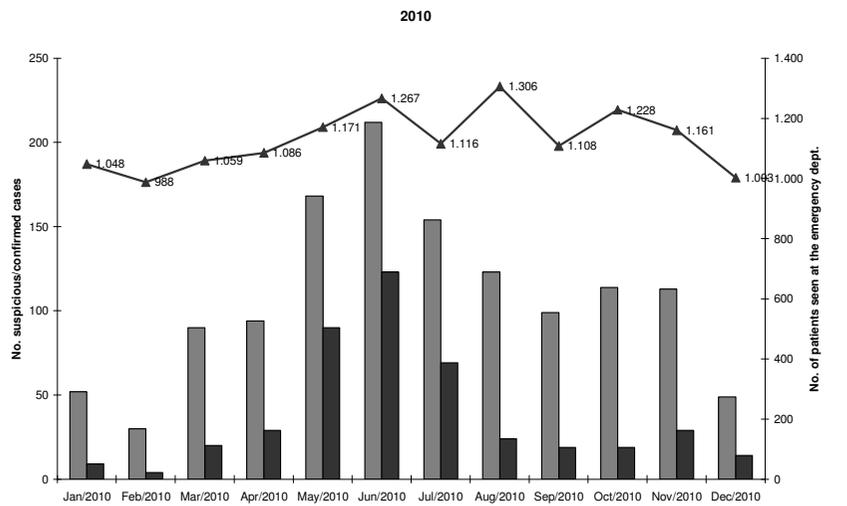
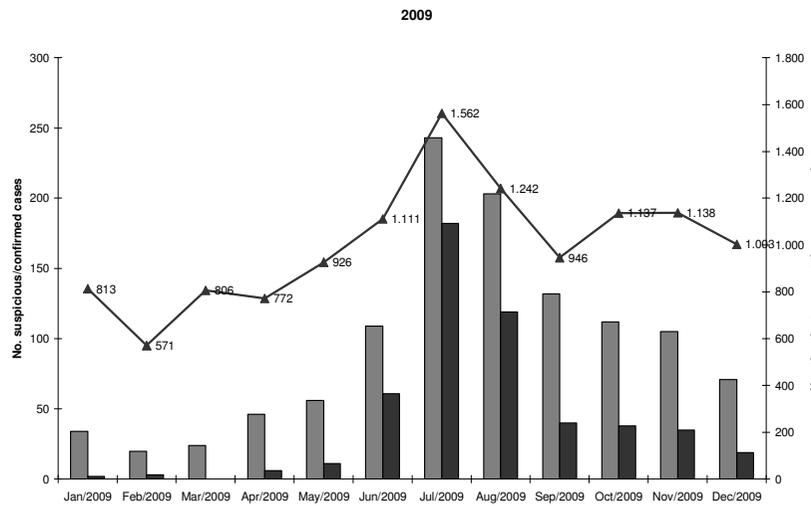
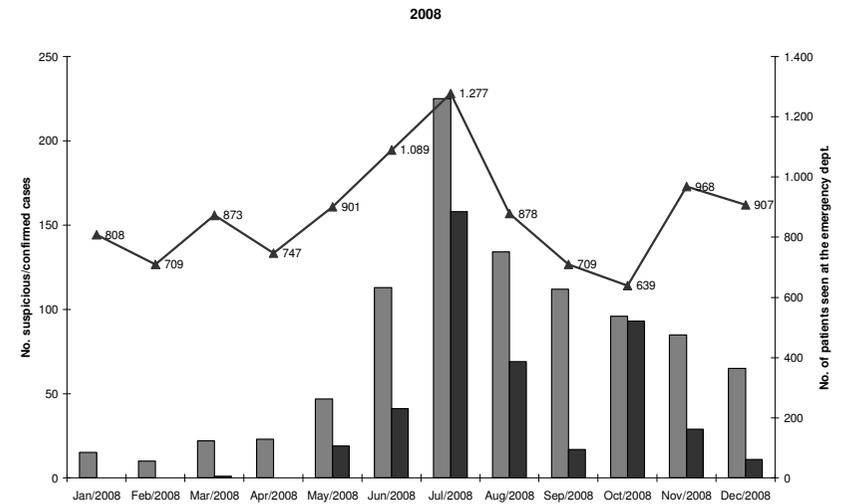
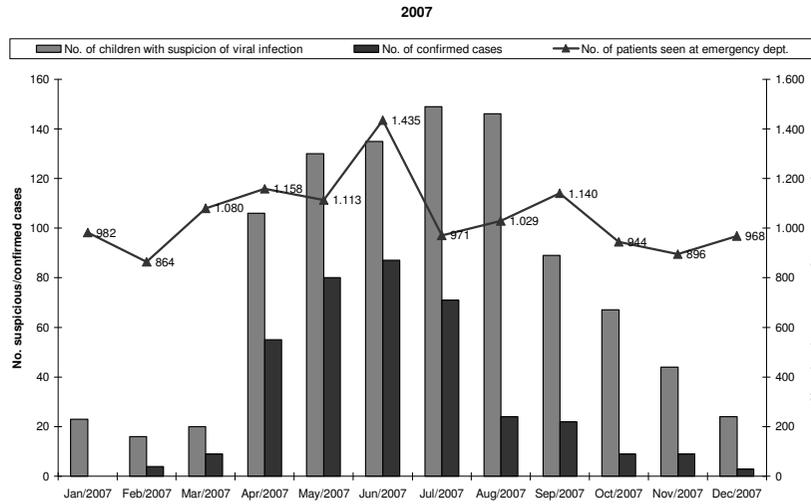
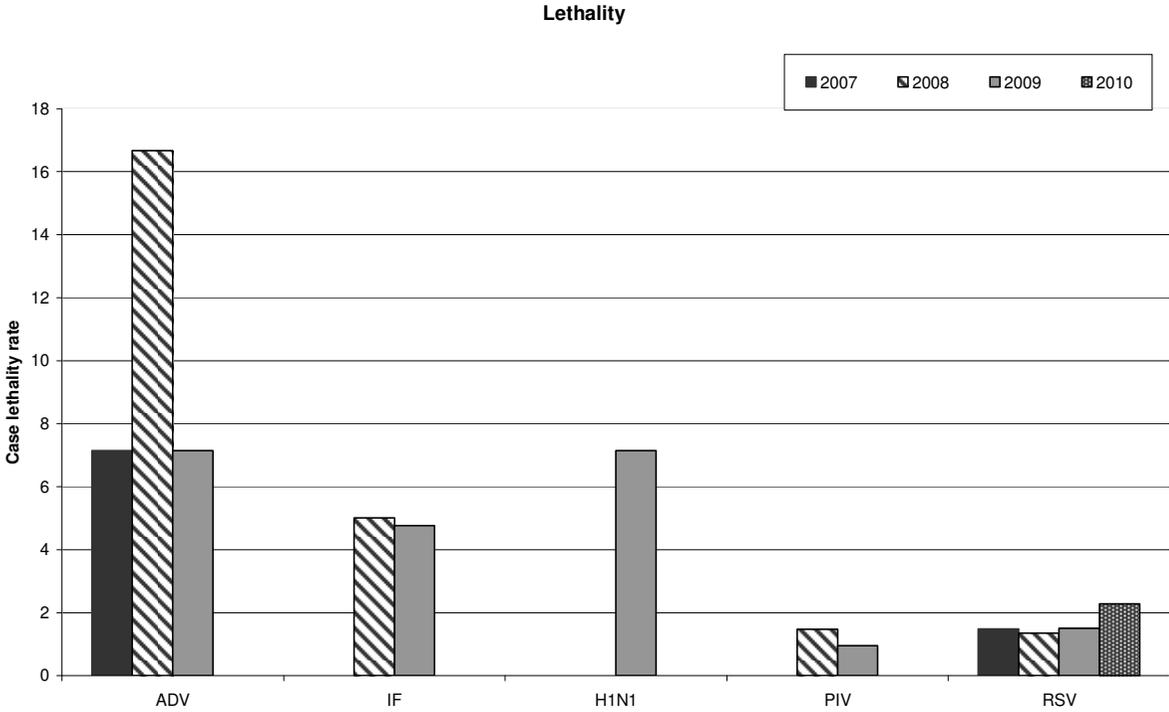


Figure 2



5.2 Artigo 2 – Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates

Artigo publicado na revista “Journal of Virological Methods”

Short communication

Title: OPTIMIZATION OF ONE-STEP DUPLEX REAL-TIME RT-PCR FOR DETECTION OF INFLUENZA AND RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN NASOPHARYNGEAL ASPIRATES.

Fernanda de-Paris^{a,b*}, Caroline Beck^c, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado^a, Rodrigo Minuto Paiva^a, Denise da Silva Menezes^a, Luciana de Souza Nunes^b, Ricardo Kuchenbecker^c, Afonso Luís Barth^{a,b}.

^a Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Serviço de Patologia Clínica, Unidade de Pesquisa Biomédica – Laboratório de Biologia Molecular. Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre - RS, Brazil 90035-903.

^b Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. Rua Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre - RS, Brazil 90035-903.

^c Instituto de Avaliação de Tecnologia em Saúde/IATS/CNPq, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia. Rua Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre - RS, Brazil 90035-903.

Email addresses:

FP: fparis@terra.com.br; fparis@hcpa.ufrgs.br

CB: beck.caroline@gmail.com

ABMPM: abmachado@hcpa.ufrgs.br

RMP: rpaiva@hcpa.ufrgs.br

DSM: dmenezes@hcpa.ufrgs.br

LSN: lucianadesnunes@hotmail.com

RK: rkuchen@gmail.com

ALB: albarth@hcpa.ufrgs.br

*Corresponding author. Mailing address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre - RS, Brazil 90035-903. Phone: 55 51 3359-8860; Fax: 55 51 3359-8310. E-mail: fparis@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Viruses are major contributors to acute respiratory infection-related morbidity and mortality worldwide. The influenza (IF) viruses and human respiratory syncytial virus (RSV) play a particularly important role in the aetiology of acute respiratory infections. This study sought to standardize a one-step duplex real-time RT-PCR technique to optimize diagnosis of IFA/IFB and RSVA/RSVB infection. Viral RNA was extracted with the commercially available QIAamp Mini Kit according to manufacturer instructions. RT-PCR was performed with primers to the matrix protein gene of IFA, the hemagglutinin gene of IFB and the N gene of RSVA and RSVB. The limits of detection were 1 copy/ μ L for IFA, 10 copies/ μ L for IFB, 5 copies/ μ L for RSVA, and 250 copies/ μ L for RSVB. The specificity of RT-PCR was determined by comparison against a panel of several respiratory pathogens. RT-PCR and indirect immunofluorescence (IIF) were compared in a sample of 250 nasopharyngeal aspirates (NPAs) collected during the year 2010. RT-PCR was more sensitive than IIF and able to detect viral co-infections. In summary, RT-PCR optimized for IFA/IFB and RSVA/RSVB is sensitive and specific for these viral agents and is therefore useful for assessment of the aetiology of respiratory infections, whether for clinical or epidemiological purposes.

KEYWORDS: respiratory syncytial virus; influenza virus; one-step real-time PCR; molecular diagnostics; molecular epidemiology.

1. Introduction

Viruses are major contributors to the morbidity and mortality of acute respiratory infections worldwide (Fairchok *et al.*, 2010). Among these viruses, influenza (IF) and respiratory syncytial virus (RSV) are some of the most common aetiological agents of respiratory infections. RSV is a well-known cause of lower respiratory tract infection in young children (Hall *et al.*, 2009) and is now recognized as an increasingly important cause of respiratory infection in adults (Falsey *et al.*, 2005; Caram *et al.*, 2009). Influenza viruses remain significant causes of respiratory infections annually, despite the availability of vaccines and increasing efforts to achieve targeted vaccination rates (Kehl and Kumar, 2009). Furthermore, new IF strains have recently been described as aetiological agents in epidemics (Gatherer, 2009).

Accurate detection of respiratory viruses is important to guide antiviral therapy, to prevent nosocomial transmission during the seasonal period of more hospitalizations, and, in some cases, to decrease the hospital healthcare-associated costs (Kuypers *et al.*, 2006). From a clinical standpoint, accurate identification of the causative agent of respiratory tract infections is important for proper clinical management. The proper identification of viruses is even more important for epidemiological purposes, such as the surveillance of respiratory infections during seasonal epidemics, assessment of high-risk groups, and allocation of hospital resources. On the other hand, diagnosis can be problematic, as a wide range of pathogens can cause acute respiratory infections presenting with similar clinical syndromes. Nucleic acid amplification testing is emerging as the preferred method of diagnostic testing for viral respiratory infections. Real-time technology and the ability to perform multiplex

testing have facilitated the use of this molecular technique to diagnose a variety of respiratory viruses (Panning *et al.*, 2009; Kehl and Kumar, 2009; Olofsson *et al.*, 2011). This study sought to validate a one-step duplex real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technique with the objective of optimizing diagnosis of IFA/IFB and RSVA/RSVB infection for clinical and epidemiological purposes.

2. Methods

2.1 Primer and probe design

The sequences of primers and probes, their original studies, and the results of *in silico* evaluation are shown in Table 1. RT-PCR was performed with primers specific to the matrix protein gene of IFA, the hemagglutinin of IFB, and the N gene of RSVA and RSVB (Hu *et al.*, 2003; Schweiger, *et al.*, 2000; WHO, 2009).

INSERT TABLE 1 NEAR HERE

2.2 RNA extraction and amplification conditions

RNA was extracted with the commercially available QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to manufacturer instructions. Amplification was performed with the SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a 7500 Real Time PCR cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The amplification protocol was 50 °C for 30 min; 95 °C for 2 min; and 45 cycles of 94 °C, 15 s, and 55 °C, 35 s. Primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 800nM and probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at 200nM were used for two

different reactions, IFA/IFB amplification and RSVA/RSVB amplification. Positive controls included Fluvac® (Innovator EWT, Fort Dodge, IA, USA) for IFA and clinical samples for IFB, RSVA and RSVB, which were confirmed by sequencing. Negative controls (sterilized water) were used in each reaction. In clinical samples, detection of a human gene (RNase P) was used as the internal control for the reaction. The reaction volume was 15 μL – 5 μL of RNA and 10 μL of reagent mix.

Primer and probe sets were tested first as a single reaction, then as two duplex reactions (RSVA/RSVB and IFA/IFB detection). Samples were considered positive if the Ct (Cycle threshold) value was ≤ 45 and the shape of the amplification curve was appropriate. Samples were considered negative if the internal control (RNase P) was positive and there were no characteristic amplification curves for viral targets.

2.3 Limit of detection and assay specificity

Analytical sensitivity (limit of detection, LOD) was established by quantitative evaluation of the amplification products of positive controls. These amplifications were purified by ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) and quantified in a Nanodrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The number of copies of each control was obtained and serial dilutions (from 1 to 10^5 copies/ μL) were used to determine the LOD. LOD assays were performed in duplicate for separate and duplex reactions.

Specificity assays were performed using a set of amplification products of clinical isolates with positive results for different respiratory pathogens (*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Enterovirus*, *Adenovirus*, *Cytomegalovirus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Herpes simplex*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pneumocystis jiroveci*, *Chlamidya pneumoniae*, RSV, Parainfluenza-1, Parainfluenza-2, Parainfluenza-3, and Epstein-Barr virus).

2.4 Patient samples

Nasopharyngeal aspirate (NPA) specimens were collected in phosphate-buffered saline (PBS) and frozen at -80°C , followed by RNA extraction and RT-PCR amplification. This study included 250 NPAs collected between May and September 2010 and previously tested for respiratory viruses by a commercially available indirect immunofluorescence (IIF) assay (Medivax®, Dublin, Ireland). A comparison between RT-PCR and IIF could thus be established. All NPAs had been obtained for clinical purposes as part of standard care. The study protocol was approved by the Institutional Review Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3. Results

In silico coverage of the selected oligonucleotides was $>98\%$ (Table 1). This coverage rate was considerate adequate for use of this set of probes and primers.

The positive controls showed adequate results (Ct <20) in both protocol conditions (single and duplex reaction). The LOD was 1 copy/ μL for IFA, 10 copies/ μL for IFB, 5 copies/ μL for RSVA, and 250 copies/ μL for RSVB. These

LODs were similar in separate and duplex reactions. LOD data showed a Poisson distribution and the corresponding obtained Cts showed linearity (data not shown).

All tests for different respiratory pathogens had negative results, which show an absence of cross-reactivity between RT-PCR and this panel.

Of the tested samples, 51.2% (128/250) were positive for RSV by RT-PCR, while only 34.3% (86/250) were positive by IIF. Furthermore, 3.6% (9/250) were positive for IFB by RT-PCR, while only 1.2% (3/250) were positive by IIF. No samples were positive for IFA with either technique. Among the clinical specimens positives, 89.7% showed Ct values between cycles 12 and 39.

In this study, IIF failed to detect RSV in 46 samples (35 for RSVA and 11 for RSVB) as compared with RT-PCR. RT-PCR failed to detect RSV in only five samples when compared with IIF. All three samples that tested positive for IFB on IIF were detected by RT-PCR. Furthermore, IIF did not detect IFB in six samples when compared with RT-PCR (Table 2). It should be noted that RT-PCR was able to detect co-infection (three RSVA/RSVB co-infections and four RSVA/IFB co-infections), whereas the IIF technique was not (Table 2).

INSERT TABLE 2 NEAR HERE.

4. Discussion

The aim of this study was the optimizing of a one-step duplex RT-PCR technique for IFA/IFB and RSVA/RSVB detection. Primers and probes were adapted from different protocols (Table 1) to establish a single assay with the same extraction and amplification conditions. This optimized assay proved

specific for the viruses of interest, as no cross-reaction against a panel of other respiratory pathogens was detected. Furthermore, this assay exhibited high analytical sensitivity, being able to detect as low as 1 copy/ μL of IFA, 10 copies/ μL of IFB, 5 copies/ μL of RSVA and 250 copies/ μL of RSVB.

The results of this study demonstrated that protocol performed well on clinical samples, resulting in an increasing the detection of IFB and RSVA/RSVB in NPA specimens. The IIF assay detected 89 samples (35.6%) and RT-PCR detected 133 (53.2%), thus proving the higher sensitivity of RT-PCR assay as compared with IIF. This increased sensitivity could be explained by the ability of PCR methods to detect lower viral loads in clinical samples, as previously reported by Kuypers *et al.* (2006), who showed that the mean number of viral copies per mL in specimens positive on both PCR and IIF was significantly higher (10^7) than that of specimens positive only on PCR (10^4). This suggests that PCR is suitable for detection of respiratory viruses in samples from adults which often exhibit lower viral loads than samples obtained from children (Kuypers *et al.*, 2006). Furthermore, it is known that probability of detection of respiratory viruses increases with the duration of symptoms. Patients presenting within 0–6 days of symptom from the onset exhibit less viral shedding than those tested 7–14 days after symptoms arise (Brittain-Long *et al.*, 2010; Olofsson *et al.*, 2011). Therefore, this optimized RT-PCR technique could improve the possibility of viral detection in samples collected longer after symptom onset.

In addition, it bears stressing that all samples testing positive for IFB on IIF were detected by RT-PCR, and only five samples positive for RSV on IIF were not detected by RT-PCR. Remarkably, none of the specimens used in this study

were positive for IFA by either method. This was most likely due to the extensive immunization campaign against influenza A/H1N1 and other seasonal influenza strains that was carried out worldwide, including in Brazil, in 2010.

Another important aspect of optimized RT-PCR is that this technique can be performed with frozen samples, unlike IIF, which requires fresh specimens. In a previous study, respiratory viruses were detected by PCR in 25% of specimens judged inadequate for IIF analysis (Kuypers *et al.*, 2006).

Concerning viral co-infection, seven cases were found in this study (three co-infections with RSVA and RSVB and four co-infections with RSVA and IFB) by RT-PCR; none was detected with the IIF technique. Several studies have acknowledged the possibility of multiple infections in viral respiratory diseases detected by molecular methods (Kuypers *et al.*, 2006; Paranhos-Baccalà *et al.*, 2008). Furthermore, multiple respiratory viruses have been detected in approximately 10% of respiratory specimens, with higher rates recorded in samples from young children and immunosuppressed patients (Olofsson *et al.*, 2011). Some authors suggest an association between dual infections and increased disease severity (Richard *et al.*, 2008; Paranhos-Baccalà *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2011). Indeed, the clinical and epidemiological significance of co-infections is uncertain, but infection with multiple viruses only can be detected with the use of molecular techniques. Notably, the optimized RT-PCR protocol described herein was able to detect RSVA and RSVB separately, which may be very useful for studies with epidemiological purposes.

Furthermore, this study has considered that the real time PCR technique is suitable for limited multiplexing. This technique is also excellent for in-house testing, providing an affordable analysis capability for the outpatient clinic

(Olofsson et al, 2011). Therefore, this RT-PCR technique could be feasible and more cost-effective for routine clinical than a multiplex 15-virus panel or other extended molecular diagnostics.

In summary, the one-step duplex RT-PCR technique optimized for IFA/IFB and RSVA/RSVB described herein is suitable for the clinical laboratory setting, requiring only one RNA extraction and using the same amplification conditions as used for multiple virus detection, as well as internal controls. It is less labour-intensive than IIF and exhibited reliable sensitivity and specificity, making it useful for establishment of the aetiology of respiratory infections for clinical and epidemiological purposes alike.

Acknowledgements

This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino, Hospital de Clinicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), the Rio Grande do Sul Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS) and the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq).

References

- Brittain-Long, R., Westin, J., Olofsson, S., Lindh, M., Andersson, L.M., 2010. Prospective evaluation of a novel multiplex real-time PCR assay for detection of fifteen respiratory pathogens-duration of symptoms significantly affects detection rate. *J. Clin. Virol.* 47, 263-267.
- Caram, L.B., Chen, J., Taggart, E.W., Hillyard, D.R., She, R., Polage, C.R., Twersky, J., Schmader, K., Petti, C.A., Woods, C.W., 2009. Respiratory syncytial virus outbreak in a long-term care facility detected using reverse transcriptase polymerase chain reaction: an argument for real-time detection methods. *J. Am. Geriatr. Soc.* 57, 482-485.
- Fairchok, M.P., Martin, E.T., Chambers, S., Kuypers, J., Behrens, M., Braun, L.E., Englund, J.A., 2010. Epidemiology of viral respiratory tract infections in a prospective cohort of infants and toddlers attending daycare. *J. Clin. Virol.* 49, 16-20.
- Falsey, A.R., Hennessey, P.A., Formica, M.A., Cox, C., Walsh, E.E., 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N. Engl. J. Med.* 352, 1749-1759.
- Gatherer, D., 2009. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J. Clin. Virol.* 45, 174-178.
- Hall, C.B., Weinberg, G.A., Iwane, M.K., Blumkin, A.K., Edwards, K.M., Staat, M.A., Auinger, P., Griffin, M.R., Poehling, K.A., Erdman, D., Grijalva, C.G., Zhu, Y., Szilagyi, P., 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N. Engl. J. Med.* 360, 588-598.
- Hu, A., Colella, M., Tam, J.S., Rappaport, R., Cheng, S., 2003. Simultaneous Detection, Subgrouping, and Quantitation of Respiratory Syncytial Virus A and B by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 149-154.
- Kehl, S.C., Kumar, S., 2009. Utilization of nucleic acid amplification assays for the detection of respiratory viruses. *Clin. Lab. Med.* 29, 661-671.
- Kuypers, J., Wright, N., Ferrenberg, J., Huang, M.L., Cent, A., Corey, L., 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, 2382-2388.
- Olofsson, S., Brittain-Long, R., Andersson, L.M., Westin, J., Lindh, M., 2011. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9, 615-626.
- Panning, M., Eickmann, M., Landt, O., Monazahian, M., Olschläger, S., Baumgarte, S., Reischl, U., Wenzel, J.J., Niller, H.H., Günther, S., Hollmann, B., Huzly, D., Drexler, J.F., Helmer, A., Becker, S., Matz, B., Eis-Hübinger, A.,

Drosten, C., 2009. Detection of influenza A(H1N1)v virus by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 14, 1-6.

Paranhos-Baccalà, G., Komurian-Pradel, F., Richard, N., Vernet, G., Lina, B., Floret, D., 2008. Mixed respiratory virus infections. *J. Clin. Virol.* 43, 407–410.

Richard, N., Komurian-Pradel, F., Javouhey, E., Perret, M., Rajoharison, A., Bagnaud, A., Billaud, G., Vernet, G., Lina, B., Floret, D., Paranhos-Baccalà, G., 2008. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27, 213–217.

Schweiger, B., Zadow, I., Heckler, R., Timm, H., Pauli, G., 2000. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1552-1558.

World Health Organization, 2009. CDC protocol of real time RT-PCR for swine influenza A (H1N1). Atlanta: WHO.

Table 1 – “In silico” coverage of the sets of primers and probes against sequences obtained from GenBank using BioNumerics.

Viruses	Oligo	Primer/Probe	Origin	Sequences	Possible identity	Identity	Gaps	Coverage
Flu A								
	InfA F	5' GACCRATCCTGTACCTCTGAC	CDC, 2009	131	2882	2813	69	97.6%
	InfA R	5' AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA	CDC, 2009	131	3144	3144	0	100%
	InfA Probe	5' FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-BHQ	CDC, 2009	131	3144	3144	0	100%
<i>Total coverage</i>								99.24%
Flu B								
	BHA-188	5' AR*ACCAGAGGGAAACTATGCCC	Schweiger <i>et al.</i> , 2000	154	3388	3324	64	98.11%
	BHA-347	5' CTGTCGTGCATTATAGGAAAGCAC	Schweiger <i>et al.</i> , 2000	154	3696	3671	25	99.32%
	BHA-273	5' VIC-ACCY*TCGGCAARAGY*TTCAATACTCCA-TAMRA	Schweiger <i>et al.</i> , 2000	154	4158	4057	101	97.57%
<i>Total coverage</i>								98.31%
RSV A								
	A21	5' GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA	Hu <i>et al.</i> , 2003	10	260	260	0	100%
	RSV compl	5' AACATGCCACATAACTTATTGAT	This study	10	230	225	5	97.83%
	APB48	5' FAM-ACACTCAACAAAGATCAACTTCTGTGCATCCAGC-TAMRA	Hu <i>et al.</i> , 2003	10	330	327	3	99.09%
<i>Total coverage</i>								98.97%
RSV B								
	B17	5' GATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAA	Hu <i>et al.</i> , 2003	8	208	207	1	99.52%
	B120	5' TGTCAATATTATCTCCTGTACTACGTTGAA	Hu <i>et al.</i> , 2003	8	240	238	2	99.17%
	BPB45	5' VIC-TGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTGCATCCA-TAMRA	Hu <i>et al.</i> , 2003	8	280	279	1	99.64%
<i>Total coverage</i>								99.44%

* Oligonucleotides degenerate in relation the original form reported by Schweiger *et al.*, 2000.

Degenerate nucleotides: R = A or G; Y = C or T and K = G or T. Fluorophores: FAM (6-carboxyfluorescein) and VIC (6-carboxyrhodamine). Quenchers: BHQ (Black hole quencher) and TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Possible identity = n^o sequences obtained from GenBank x n^o nucleotides in primer or probe. Identity = n^o matches between nucleotides in primer or probe and nucleotides of sequences from GenBank. Gap = n^o mismatches between nucleotides in primer or probe and nucleotides of sequences from GenBank.

Table 2: Results from 250 NPA samples.

Samples (n = 250)	IIF RSV	IIF IFB	RT-PCR RSVA	RT-PCR RSVB	RT-PCR IFB
112 (44.8%)	-	-	-	-	-
64 (25.6%)	+	-	+	-	-
35 (14%)	-	-	+	-	-
11 (4.4%)	+	-	-	+	-
11 (4.4%)	-	-	-	+	-
5 (2%)	+	-	-	-	-
3 (1.2%)	+	-	+	+	-
3 (1.2%)	-	+	-	-	+
2 (0.8%)	-	-	+	-	+
2 (0.8%)	+	-	+	-	+
1 (0.4%)	+	-	-	-	+
1 (0.4%)	-	-	-	-	+

IIF = imunofluorescence
 RT-PCR = one step duplex RT-PCR
 “-“ = negative; “+” = positive.

5.3 Artigo 3 - Emerging respiratory syncytial virus subgroups A and B among nosocomial and community-acquired pediatric infections in Southern Brazil

Artigo submetido para a revista "Journal of Medical Virology"

Emerging respiratory syncytial virus subgroup A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil

Running title: Emerging RSV genotypes in southern Brazil

Fernanda de-Paris^{a,c*}, Caroline Beck^b, Luciana de Souza Nunes^a, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado^c, Rodrigo Minuto Paiva^c, Denise da Silva Menezes^c, Márcia Rosane Pires^d, Rodrigo Pires dos Santos^d, Ricardo de Souza Kuchenbecker^b, Afonso Luis Barth^{a,c}.

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. Rua Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre - RS, Brazil.

^b Instituto de Avaliação de Tecnologia em Saúde/IATS/CNPq, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Epidemiologia. Rua Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre - RS, Brazil.

^c Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Serviço de Patologia Clínica, Unidade de Pesquisa Biomédica – Laboratório de Biologia Molecular. Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre - RS, Brazil.

^d Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Comissão de Controle de Infecção Hospitalar. Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre - RS, Brazil.

*Corresponding author. Mailing address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre - RS, Brazil 90035-903. Tel: 55 51 3359-8860; Fax 55 51 3359-8310, fparis@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the main cause of lower respiratory tract illness in children worldwide. Molecular analyses shows two distinct RSV subgroups (A and B) that are comprised of different genotypes. This variability contributes to RSV's capacity to infect repeatedly and cause yearly outbreaks. Different RSV genotypes circulate within the community and within hospital wards. RSV is currently the leading cause of nosocomial respiratory tract infections. The aim of this study was to evaluate the G protein gene diversity of RSV amplicons in nasopharyngeal aspirate samples collected from children with nosocomial or community-acquired infections. Sixty-three RSV samples (21 nosocomial and 42 community-acquired) were evaluated and classified as RSV A or RSV B by real-time PCR. Sequencing of the second variable region of the G protein gene was performed to establish RSV phylogenetics. We observed co-circulation of RSV A and RSV B, and RSV A was the predominant subtype. All nosocomial and community-acquired RSV A samples were from the same phylogenetic group, comprising NA1 genotype. Conversely, RSV B samples were distributed across different groups: BA4, POA1, POA2, POA3 and POA4. Among these, nosocomial and community-acquired samples had distinct distributions. BA4, POA2, and POA4 were only found in community-acquired isolates, whereas POA1 and POA3 were found in nosocomial samples. This is the first study that describes circulation of the NA1 genotype in Brazil, as well as four new BA-like genotypes. Deciphering worldwide RSV genetic variability will aid vaccine design and development.

KEYWORDS: respiratory syncytial virus, nosocomial infection, G-protein, genetic variability, molecular epidemiology.

INTRODUCTION

Human respiratory syncytial virus (RSV), order *Mononegavirales*, family *Paramyxoviridae*, subfamily *Pneumovirinae*, and genus *Pneumovirus* is considered the leading cause of lower respiratory tract infections in children worldwide (Hall et al., 2009; Hall, 2010). RSV also infects adults and is a major pathogen in older adults and immunocompromised individuals (Falsey et al., 2005). RSV strains are separated into two major subgroups (A and B) on the basis of antigenic and genetic variability. The main differences are found in the attachment glycoprotein G. RSV G protein interacts with host cell receptors, is a target for neutralizing antibodies, and is highly variable (Johnson et al., 1987). G protein variability is greater than that of other RSV proteins, between and within the RSV A and B subgroups. Molecular analysis of the second variable region in the G protein has been used to characterize RSV genotypes (Peret et al., 1998; Peret et al., 2000). This variability might contribute to the virus's ability to infect individuals repeatedly and cause yearly outbreaks (Peret et al., 2000; Yamaguchi et al. 2011).

RSV has a clear seasonality. Outbreaks occur in the late fall and winter in temperate regions, and during extended periods related to rainy seasons in tropical regions (Moura et al., 2006; Goddard et al., 2007; Murray et al. 2012). RSV A and B genotypes show complex, fluctuating dynamics. They may co-circulate during a given season, with one or two dominant genotypes that are then replaced in consecutive years (Zlateva et al. 2004; Shobugawa et al. 2009; Botosso et al. 2009). These genotypes circulate within the community and within hospital wards. Consequently, nosocomial infection by RSV is observed every year. RSV is the leading cause of nosocomial respiratory infections and is

a particular hazard for premature infants, infants with congenital heart disease or bronchopulmonary dysplasia, and infants and children that are immunodeficient (Mlinaric-Galinovic and Varda-Brkic, 2000; Visser et al., 2008). Nosocomial RSV outbreaks can cause severe morbidity and mortality in infants, and carry a substantial financial burden (Thorburn et al., 2004; Tatochenko et al., 2010; O'Connell et al. 2011). Palivizumab is a humanized monoclonal antibody that is currently recommended as prophylaxis for certain patient groups at risk of severe RSV infection (O'Connell et al. 2011). However, it is too expensive for wide-range use in developing countries such as Brazil (Weckx et al. 2009).

Despite its pathogenic importance, there is no effective vaccine against RSV (van Drunen et al., 2007). Future development of vaccines or pharmacotherapy against RSV requires further understanding of the genetic composition of viral strains prevalent in a target population. Little information is available on the distribution pattern of epidemic RSV strains in Brazil. The aim of the present study was to evaluate the genetic diversity of the G protein gene in RSV samples collected from young children with nosocomial or community-acquired infections.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Twenty-one pediatric patients were diagnosed with nosocomial RSV infections at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a southern Brazil tertiary referral center, in 2010. Diagnostic criteria of nosocomially infected patients included absence of respiratory symptoms at the time of hospital admission and

detection of RSV by indirect immunofluorescence in nasopharyngeal aspirate samples within seven days of admission (Mlinaric-Galinovic and Varda-Brkic, 2000). Nasopharyngeal aspirate samples from 42 pediatric patients with community-acquired RSV infection were also analyzed. These patients were admitted to the same ward as the nosocomially infected patients one week before or after their admission. Community-acquired RSV patients stayed at the hospital for least three days.

All nasopharyngeal aspirate samples were obtained for clinical purposes as part of standard care. The study protocol was approved by the Institutional Review Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Sample handling and nucleotide sequencing

Nasopharyngeal aspirate samples were collected in phosphate-buffered saline (PBS) and frozen at -80°C until RNA extraction was performed. The samples were named according to the city of origin (e.g. Porto Alegre – POA), number, and infection setting (nosocomial, H; community-acquired, C). RNA from a 140 μl aliquot of each sample was extracted with a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. RSV-positive samples were classified as RSV A or RSV B by group-specific real-time PCR (RT-PCR), as described previously (de-Paris et al., 2012).

For nucleotide sequencing, RT-PCR was performed on extracted RNA using primers and amplification conditions described previously (Peret et al., 1998). PCR products were purified using a PureLink PCR Purification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Both strands were sequenced in an ABI 3500

Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Phylogenetic analyses

Sequences were assembled using BioNumerics software version 6.0 and aligned with ClustalW. Phylogenetic analyses were performed with MEGA version 5.05 software (Tamura et al., 2011), using the neighbor-joining method and bootstrap analysis (1,000 replicates). Reference sequences for RSV A and RSV B strains originating from the United States (Peret et al., 2000), Uruguay and Argentina (Frabasile et al., 2003; Viegas and Mistchenko, 2005; Galiano et al., 2005; Trento et al., 2006), Brazil (Moura et al., 2004; Antoniassi et al., 2008), South Africa (Venter et al., 2001), Kenya (Scott et al., 2004), New Zealand (Matheson et al., 2006), Japan (Shobugawa et al., 2009; Dapat et al., 2010; Yamaguchi et al., 2011), and Belgium (Zlateva et al., 2005) were obtained from GenBank.

Pairwise nucleotide distances (p -distances), the number of pairwise nucleotide differences divided by the total number of nucleotides in the sequenced segment, were calculated using MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). A lower p -distance indicated a greater similarity in compared sequences.

Nucleotide sequence accession numbers.

The GenBank accession numbers of the nucleotide sequences obtained in the present study are JX524454 to JX524456; JX568889 to JX568900; JX627410 to JX627433; JX678714 to JX678729.

RESULTS

RT-PCR results confirmed the presence of both RSV A and RSV B subgroups in the samples (21 from nosocomial RSV patients and 42 from community-acquired RSV patients). RSV A was the predominant subgroup in both nosocomial and community-acquired samples. Three cases of RSV A/B co-infection were detected in two nosocomial samples and one community-acquired sample. Patients with nosocomial RSV infections tended to be older and have longer hospital stays (Table 1).

We were able to obtain 56 sequences (40 RSV A and 16 RSV B) for phylogenetic analyses. Seven samples showed no amplification or low-quality sequencing. Samples without amplification may have degraded RNA and samples with low-quality sequencing could be suffering non-specific amplifications. Consequently, these samples were not considered for the phylogenetic analysis.

All RSV A sequences (40 sequences), whether nosocomial or community-acquired, were grouped with the NA1 isolate sequences. This phylogenetic branch presented a bootstrap value of 95 %. This phylogenetic branch, comprising sequences from NA1 isolates and POA samples, was clearly distinct from other genotypes (Figure 1). Moreover, the calculated intra-genotype p -distance showed a high similarity between RSV A POA sequences, and the NA1 genotype (Table 2).

The RSV B sequences proved to be distinct and were distributed across different groups we termed BA4, POA1, POA2, POA3, and POA4. Most notably, the POA1, POA2, POA3, and POA4 phylogenetic branches had high bootstrap values of above 90 % (Figure 1). Although the BA and POA genotypes were

grouped into different phylogenetic branches, all had the 60 nucleotide insertion originally reported in BA strains. Furthermore, sequences acquired from both nosocomial and community-acquired RSV B samples presented distinct distributions. Calculated p -distances showed high intra-genotype similarity and high inter-genotype diversity among the RSV B sequences (Table 2). In addition, the BA4, POA2, and POA4 genotypes were only found in community-acquired RSV patients, whereas POA1 and POA3 genotypes were only found nosocomial RSV patients.

DISCUSSION

RSV is recognized as the leading cause of respiratory tract illness in children and is a major nosocomial pathogen. We evaluated RSV genetic variability in nasopharyngeal aspirate samples taken from children with nosocomial and community-acquired RSV infections at a large hospital in southern Brazil during 2010. The patients with nosocomial RSV infections were characterized by prolonged hospital stays and increased mortality. Increased risk of severe RSV-associated is usually associated with clinical conditions such as prematurity, chronic lung disease, congenital heart disease, and immunosuppression (Mlinaric-Galinovic and Varda-Brkic, 2000; Hall et al., 2009). These same conditions are common among children with prolonged hospital stays (Visser et al., 2008).

RSV A was the predominant subgroup in both nosocomial (15/21 or 71.43 %) and community-acquired (30/42 or 71.43 %) infections. Only three cases of RSV A/B co-infection (4.76 %) were observed. In previous RSV studies, co-circulation of subgroups A and B within the same population have

been described during epidemic periods, and with different predominance patterns (Shobugawa et al., 2009; Zhang et al., 2010). Shifts in predominance of particular circulating RSV subgroups within a given time interval have also been described (Scott et al., 2004; Arbiza et al., 2005; Zhang et al., 2010). These shifts appear to correlate, at least in part, with G-protein gene variability (Zhang et al., 2010).

Only one RSV A genotype was found circulating within the study's patients. It showed high similarities with the previously identified NA1 genotype isolated from Japan (Shobugawa et al., 2009). All RSV A POA sequences (nosocomial and community-acquired) were grouped with this genotype in a phylogenetic branch which presented a bootstrap value of 95%. The p -distance calculated among these sequences was low, demonstrating homogeneity among samples. This is the first study to describe circulation of the Japanese NA1 genotype in Brazil. Introduction of this genotype to Brazil is probably recent, and it may be predominant in the Porto Alegre area. Peret and colleagues have hypothesized that a constant shift in predominant genotypes affects protective immunity, allowing for more efficient virus transmission and pathogenicity. Therefore, new RSV strains can be introduced into a given population but local factors such as strain-specific immunity will determine which strains will circulate successfully and cause outbreak (Peret et al., 1998).

This study reports the presence of five different, circulating RSV B subgroup genotypes in southern Brazil during 2010: BA4, POA1, POA2, POA3, and POA4. BA4 is a previously described subgroup (Trento et al., 2006), but POA1, POA2, POA3 and POA4 are newly identified. The POA1, POA2, POA3, and POA4 phylogenetic branches had high bootstrap values (above 90 %), and

the *p*-distance also indicated high similarity within each group. However, all RSV B POA genotypes were grouped with the BA genotypes. The BA genotype was first described in Buenos Aires, Argentina, and harbors a 60 nucleotide duplication within the G protein gene (Trento et al., 2003). It has also been reported in Europe and Asia (Shobugawa et al., 2009; Zlateva et al., 2005; Parveen et al., 2006). The rapid and global spread of the BA genotype implies that it may have a selective advantage over other circulating strains (Salter et al., 2011). However, it is possible that there may be mutations elsewhere in the genome that confer more efficient replication when compared with other RSV B genotypes. Indeed, RSV (both RSV A and RSV B subgroups) exhibits rapid evolutionary rates (Trento et al., 2006), which might justify the emergence of many different genotypes. One could speculate that the POA genotypes are actually RSV B BA variants (BA-like genotypes), the predominant genotypes that exhibit high RSV mutation rates.

Interestingly, the nosocomial and community-acquired RSV B genotypes identified in this study were distributed among different groups. The BA4, POA2, and POA4 genotypes were only found in community-acquired samples, whereas the POA1 and POA3 genotypes were only found in nosocomial samples. The selective advantage of the POA1 and POA3 genotypes in the nosocomial RSV infections may be related to their ability to infect patients with impaired immunity (Peret et al., 2000). Another possibility is that these genotypes could have originated from asymptomatic infections from hospital staff or relatives of the infected patients (Crowcroft et al., 2008).

In summary, this work evaluated the genetic diversity of RSV within a given patient cohort. To our knowledge, this is the first time that circulation of

the RSV A NA1 genotype has been confirmed in Brazil. In addition, we report the identification of four new BA-like genotypes (POA1–4). A better understanding of RSV molecular epidemiology will be essential in vaccine development and anti-viral pharmacotherapy against RSV infection. Currently, palivizumab is recommended as a preventive measure in high-risk settings. Unfortunately, this agent is too costly for use in developing countries (Weckx et al., 2009). Therefore, the development of an efficient vaccine should remain a high priority in managing RSV infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), the Rio Grande do Sul Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, FAPERGS), and the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq).

REFERENCES

- Antoniassi da Silva LH, Spilki FR, Riccetto AGL, Almeida RS, Baracat ECE, Arns CW. 2008. Genetic variability in the G protein gene of human respiratory syncytial virus isolated from the Campinas Metropolitan region, Brazil. *J Med Virol* 80:1653–1660.
- Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S. 2005. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985–2001 - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:221–230.
- Botosso VF, Zanotto PM, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, Stewien KE, Peret TC, Jamal LF, Pardini MI, Pinho JR, Massad E, Sant'anna OA, Holmes EC, Durigon EL. VGDN Consortium. 2009. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements the G protein gene of human respiratory syncytial virus. *PLoS Pathog* 5:e1000254.
- Crowcroft NS, Zambon M, Harrison TG, Mok Q, Heath P, Miller E. 2008. Respiratory syncytial virus infection in infants admitted to paediatric intensive care units in London, and in their families. *Eur J Pediatr* 167:395-9.
- Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, Kumaki A, Zaraket H., Dapat C., Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H. 2010. New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. *J Clin Microbiol* 48:3423-3427.
- de-Paris F, Beck C, Machado ABMP, Paiva RM, Menezes DS, Nunes LS, Kuchenbecker R, Barth AL. 2012. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods* 186:189-92.

- Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. 2005. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 352:1749-1759.
- Frabasile S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, Sierra MJ, Ruchansky D, V Nathalia, Berois M, Carballal G, Russi J, Arbiza J. 2003. Antigenic and Genetic Variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993–2001. *J Med Virol* 71:305–312.
- Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. 2005. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups A and B) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microbiol* 43: 2266–2273.
- Goddard NL, Cooke MC, Gupta RK, Nguyen-Van-Tam JS. 2007. Timing of monoclonal antibody for seasonal RSV prophylaxis in the United Kingdom. *Epidemiol Infect* 135:159–162.
- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, Szilagyi P. 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 360:588-598.
- Hall CB. 2010. Respiratory syncytial virus in young children. *Lancet*. 375:1500-1502.
- Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5625–5629.

Matheson JW, Rich FJ, Cohet C, Grimwood K, Huang QS, David P, Hendy MD, Kirman JR. 2006. Distinct patterns of evolution between respiratory syncytial virus subgroups A and B from New Zealand isolates collected over thirty-seven years. *J Med Virol*. 78:1354–1364.

Mlinaric-Galinovic G, Varda-Brkic D. 2000. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagn. Microbiol Infect Dis*. 37:237–246.

Moura FE, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, de Sierra MJ, Tome L, Ramos EA, Siqueira M, Arbiza J. 2004. Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. *J Med Virol* 74:156-60.

Moura FEA, Nunes IFS, Silva GB, Siqueira MM. 2006. Respiratory syncytial virus infection in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. *Am J Trop Med Hyg* 74:165–167.

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

O'Connell K, Boo T W, Keady D, Nirriain U, O'Donovan D, Commane M, Faherty C, Cormican M. 2011. Use of palivizumab and infection control measures to control an outbreak of respiratory syncytial virus in neonatal intensive care unit confirmed by real-time polymerase chain reaction. *J Hosp Infect* 77:338-342.

Parveen, S, Sullender WM, Fowler K, Lefkowitz EJ, Kapoor SK, Broor S. 2006. Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J Clin Microbiol* 44:3055–3064.

Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol* 79:2221–2229.

Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ. 2000. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis* 181:1891–1896.

Salter A, Laoi BN, Crowley B. 2011. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroups A and B identified in adults with hematological malignancy attending an Irish hospital between 2004 and 2009. *J Med Virol* 83:337–347.

Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA., Nokes DJ, Medley GF, Cane PA. 2004. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi District, Kenya. *J Med Virol* 74:344–354.

Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H, Suzuki Y, Kumaki A, Dapat I, Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H. 2009. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol* 47:2475–2482.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.

Tatochenko V, Uchaikin V, Gorelov A, Gudkov K, Campbell A, Schulz G, Prahl R, Notario G. 2010. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children ≤ 2

years of age hospitalized with lower respiratory tract infections in the Russian Federation: a prospective, multicenter study. *Clin Epidemiol* 2:221-227.

Thorburn K, Kerr S, Taylor N, van Saene HK. 2004. RSV outbreak in a paediatric intensive care unit. *J Hosp Infect* 57:194e201.

Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, Garcia-Barreno B, Melero JA, Palomo C. 2003. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol* 84: 3115–3120.

Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, Melero JA. 2006. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-Nucleotide Duplication. *J Virol* 80: 975–984.

van Drunen Littel-van den Hurk S, Mapletoft JW, Arsic N, Kovacs-Nolan J. 2007. Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication. *Rev Med Virol* 17:5-34.

Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. 2001. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol* 82:2117–2124.

Viegas M, Mistchenko AS. 2005. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999–2004) in Argentina. *J Med Virol* 77:302–310.

Visser A, Delpont S, Venter M. 2008. Molecular epidemiological analysis of a nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus associated pneumonia in kangaroo mother care unit in South Africa. *J Med Virol* 80:724-732.

Weckx LY, Fernandes MM, Monteiro AI, Souza AR, Moraes-Pinto MI. 2009. Optimization strategy to minimize wastage of palivizumab during the 2008 RSV season in São Paulo, Brazil. *J Trop Pediatr* 55:341-342.

Yamaguchi M, Sano Y, Dapat IC, Saito R, Suzuki Y, Kumaki A, Shobugawa Y, Dapat C, Uchiyama M, Suzuki H. 2011. High frequency of repeated infections due to emerging genotypes of human respiratory syncytial viruses among children during eight successive epidemic seasons in Japan. *J Clin Microbiol* 49:1034–1040.

Zhang Z, Du L, Chen X, Zhao Y, Liu E, Yang X, Zhao X. 2010. Genetic variability of respiratory syncytial viruses (RSV) prevalent in southwestern China from 2006 to 2009: emergence of subgroup B and A RSV as dominant strains. *J Clin Microbiol* 48:1201–1207.

Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, Ranst MV. 2004. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup A: positively selected sites in the attachment G glycoprotein. *J Virol* 78: 4675–4683.

Zlateva KT, Lemey P, Moes EI, Vandamme AM, Ranst MV. 2005. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol* 79:9157–9167.

Figure Legend

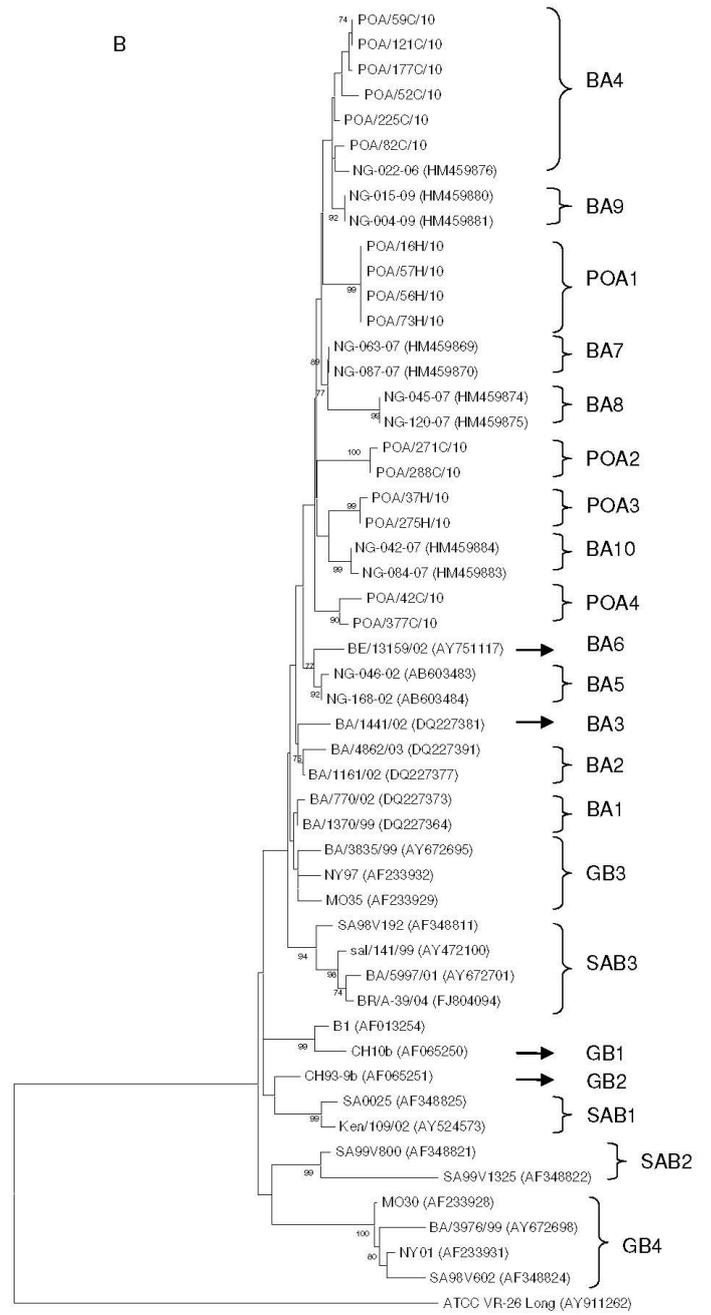
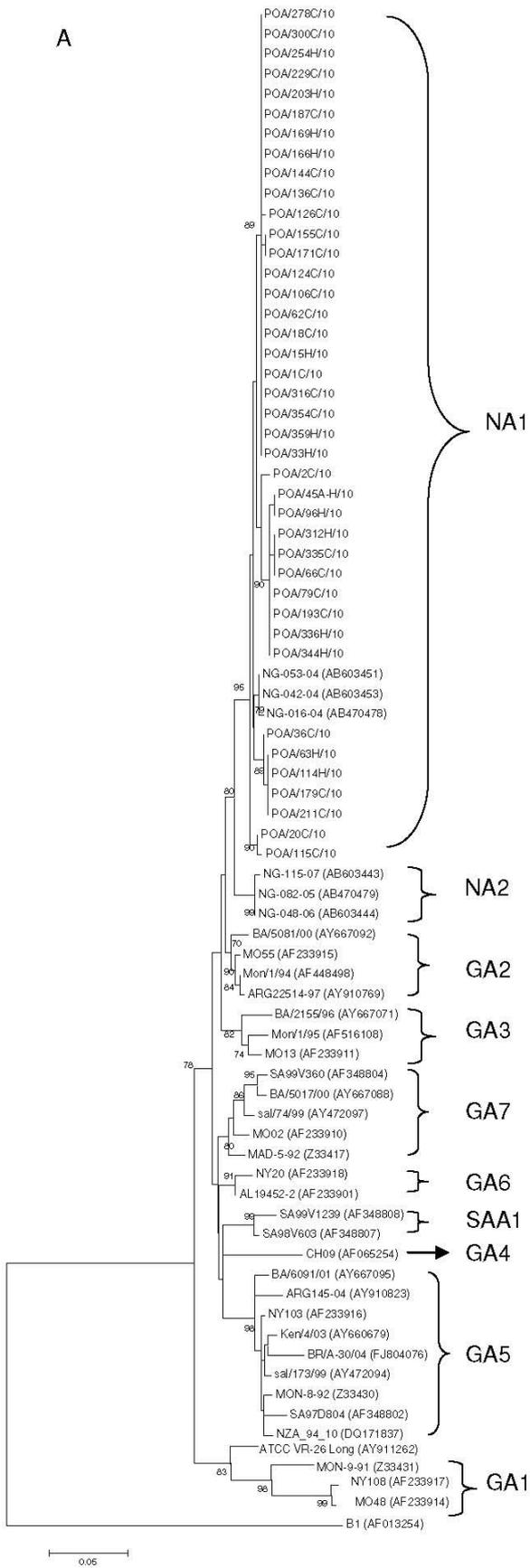
Figure 1 – Phylogenetic trees for RSVA (A) and RSVB (B) nucleotide sequences based on the second variable region of the G protein, using the neighbor-joining method with MEGA version 5.05. Reference strains (AF013254 for group A and AY911262 for group B) were used as the outgroup sequences in the tree. The scale bars show the proportions of nucleotide substitutions, and the numbers at each branch are bootstrap values determined for 1,000 iterations. Only bootstrap values with >70% significance are shown.

Table 1 – Characteristics of patients with hospital- and community-acquired RSV infections treated at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2010.

Characteristics	Patients	
	Hospital-acquired infection (n=21)	Community-acquired infection (n=42)
Mean age (months)	15	9
Mean length of stay (days)	26.09	10.28
Deaths	3	1
RSVA infection	15	30
RSVB infection	8	13
Mixed RSVA/B infection	2	1

Table 2 - Pairwise nucleotide distances (p -distances), intra-genotype and inter-genotype, for RSVA (NA1) and RSVB (BA4, POA1-POA4) isolates.

Subgroup	Genotypes	Intra-genotype	Inter-genotype (neighbor cluster)
RSVA	NA1	0.0130	0.053 (NA1 x NA2)
	BA4	0.0139	0.02251 (BA4 x BA9)
	POA1	0.0000	0.02727 (POA1 x BA7)
RSVB	POA2	0.0030	0.05757 (POA2 x POA3)
	POA3	0.0030	0.02424 (POA3 x BA10)
	POA4	0.0223	0.040 (POA4 x BA6)



6.0 Considerações Finais

Os dados levantados durante a realização deste trabalho mostraram que cada vírus respiratório (ADV, IF, VRS e PIV) tem um padrão distinto de comportamento, provocando diferentes níveis de hospitalização, surtos nosocomiais e mortalidade em crianças. Apesar dos padrões de sazonalidade já descritos para cada vírus respiratório, os eventos climáticos e mesmo a emergência de novas cepas virais podem agregar mudanças nos comportamentos esperados. Assim, a vigilância sobre os vírus respiratórios, seja os mais comuns ou vírus emergentes, desempenha um papel importante na orientação de estratégias direcionadas a minimizar o impacto destes patógenos sobre a comunidade. Estas estratégias de vigilância de doenças respiratórias têm o potencial de reduzir os custos de saúde, morbidade e mortalidade.

Para esta vigilância, as técnicas moleculares mostram-se as mais adequadas. Como vantagens estas técnicas têm mostrado um menor tempo de execução, resultados sensíveis e específicos. Também a realização de testes moleculares *in-house* permite a adequação dos protocolos conforme a necessidade assistencial de cada laboratório. O uso dos protocolos *in-house* possibilita a decisão sobre qual técnica será implantada, quantos e quais os vírus respiratórios a serem detectados e se os subtipos virais serão discriminados. Os kits comerciais costumam apresentar protocolos onde a técnica, os tipos virais e mesmo a quantidade de amostras clínicas a ser triada vem previamente estabelecidos.

Em relação à tipagem viral, este tipo de estudo é de grande importância para maior compreensão da composição genética das cepas virais prevalentes na população alvo. Especialmente no Brasil, onde há pouca informação disponível sobre o padrão de distribuição das cepas virais. Os dados relatados nesta tese mostram a circulação de genótipos emergentes do vírus VRS em crianças atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A compreensão da circulação destes novos genótipos e seu impacto na população tem importância epidemiológica, no planejamento do desenvolvimento de vacinas ou tratamentos farmacêuticos.

Os resultados obtidos na realização desta tese, assim como muitos outros estudos presentes na literatura, demonstram o impacto das epidemias

sazonais de vírus respiratórios. Portanto, torna-se evidente que estudos de vigilância deveriam ser conduzidos periodicamente para acompanhar o padrão de comportamento destes vírus na população alvo. Preferencialmente estudos de tipagem molecular deveriam ser realizados também para todos os vírus respiratórios considerados importantes para uma determinada região geográfica no sentido de acompanhar a introdução de novos genótipos e cepas virais e seu impacto nas populações atingidas.

7.0 Informações complementares – produção científica relacionada à tese

Esta tese é resultado de um projeto que foi contemplado com verba no edital FAPERGS nº007/2009 (programa de pesquisa de infecções respiratórias causadas por vírus – PPIR). Este mesmo projeto concorreu em seleção de bolsista de iniciação científica PROBIC/HCPA, sendo contemplado com a bolsa.

O trabalho desenvolvido da técnica de *one-step duplex real-time PCR* para a detecção de IFA/IFB e VSRA/VSRB presente nesta tese foi destacado em dois congressos (XXIII Salão de Iniciação Científica - 2011 – Universidade Federal do Rio Grande do Sul e 31ª Semana Científica do HCPA - 2011) com menções honrosas.

8.0 Anexo

8.1 Correspondência de submissão do artigo “Emerging respiratory syncytial virus subgroups A and B among nosocomial and community-acquired pediatric infections in Southern Brazil”.

JMV-12-3280 successfully submitted - Unicode (UTF-8)

Arquivo Editar Exibir Ferramentas Mensagem Ajuda

Responder Responde... Encaminhar Imprimir Excluir Anterior Avançar Endereços

De: jmvir@ucl.ac.uk
Data: quinta-feira, 27 de setembro de 2012 08:07
Para: fparis@terra.com.br
Assunto: JMV-12-3280 successfully submitted

27-Sep-2012

Dear Mrs. de-Paris,

Your manuscript entitled "Emerging genotypes of respiratory syncytial virus subgroups A and B among hospital- and community-acquired pediatric infections in Southern Brazil" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Medical Virology.

Your manuscript number is JMV-12-3280. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <http://mc.manuscriptcentral.com/jmv> . If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Medical Virology.

Kind regards,
 Journal of Medical Virology Editorial Office

Journal of Medical Virology is participating in the PEER project. This project, which is supported by the European Union EC eContentplus programme (http://ec.europa.eu/information_society/activities/econtentplus/index_en.htm) aims to monitor the effects of systematic self-archiving (author deposit in repositories) over time.

If your submission is accepted, and you are based in the EU, your accepted manuscript may be archived by Wiley-Blackwell on your behalf, as part of this project. The project will develop models to illustrate how traditional publishing systems may coexist with self-archiving. For further information please visit the PEER project website at <http://www.peerproject.eu/> .