



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CRISTER JOSÉ OCADAQUE

ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE PNEUMONIAS  
INFANTIS ASSOCIADAS AOS QUATRO TIPOS DE VÍRUS  
PARAINFLUENZA EM FORTALEZA-CE

FORTALEZA-CE  
2015

CRISTER JOSÉ OCADAQUE

ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE PNEUMONIAS  
INFANTIS ASSOCIADAS AOS QUATRO TIPOS DE VÍRUS  
PARAINFLUENZA EM FORTALEZA-CE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e  
Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para  
Obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia Médica.

FORTALEZA-CE

2015

---

Página reservada para ficha catalográfica que deve ser confeccionada após apresentação e alterações sugeridas pela banca examinadora.

Para solicitar a ficha catalográfica de seu trabalho, acesse o site: [www.biblioteca.ufc.br](http://www.biblioteca.ufc.br), clique no banner Catalogação na Publicação (Solicitação de ficha catalográfica)

---

# CRISTER JOSÉ OCADAQUE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e  
Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia Médica.

Data da defesa: 14/01/2016

## BANCA EXAMINADORA



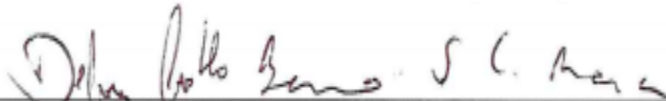
---

Profª Drª Sônia Mara Raboni  
Universidade Federal do Paraná (UFPR)



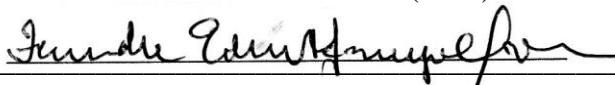
---

Profª Drª Maria Fátima da Silva Teixeira  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



---

Profª Drª Débora Castelo Branco de Sousa Collares Maia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)



---

Profª Drª Fernanda Edna Araújo Moura (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, por toda dedicação em construir o alicerce para que eu pudesse alcançar mais um degrau na minha profissão.

Aos meus irmãos, tios e amigos pela amizade, boas conversas e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Fernanda Edna Araújo Moura pela dedicação no desenvolvimento da pesquisa em Virologia, pela excelente orientação no desenvolvimento deste trabalho, por sua confiança ao longo destes anos.

À Profª Drª Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, atual coordenadora do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, pela sua dedicação para o funcionamento deste programa e pela atenção dispensada aos alunos.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, por permitir o desenvolvimento de estudos na área de Microbiologia Médica através da fundação do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica.

Às professoras participantes da banca examinadora: Profª Drª Sônia Mara Raboni, Profª Drª Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, Profª Drª Maria Fátima Silva Teixeira e Profª Drª Fernanda Edna Araújo Moura, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica pelo conhecimento transmitido.

A Dra. Marfisa de Melo Portela, diretora do Hospital Infantil Albert Sabin, por permitir a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de mestrado e doutorado pela amizade, e pelo auxílio nas horas difíceis.

Ao Waldemiro de Aquino Pereira Neto, do Departamento de Estatístico da UFC, pelo auxílio imprescindível na análise estatística dos dados.

A José Olavo Moraes, técnico do setor de Microbiologia, pelo auxílio na execução desse estudo.

Aos funcionários da Biblioteca de Ciências da Saúde- UFC, pela colaboração na obtenção de artigos científicos.

A Carolinda Vilma Soares de Oliveira, secretária do curso de Pós Graduação em Microbiologia Médica, por sua enorme paciência e dedicação na resolução das etapas burocráticas.

Às crianças participantes deste estudo e aos seus pais e responsáveis, pela atenção dispensada, por permitirem a coleta de amostras e de informações contribuindo para o avanço deste trabalho.

Aos residentes, enfermeiras e técnicas em Enfermagem, pela disposição em colaborar com este estudo.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio que permitiu minha dedicação na elaboração deste estudo.

“Assumo consigo mesmo o compromisso  
de estar constantemente melhorando.”  
H. Jackson Brown, Jr.



## RESUMO

As pneumonias são problemas de saúde pública mundial, especialmente em crianças menores que cinco anos de idade. Os vírus parainfluenza (VPI-1, 2 e 3) são agentes frequentes de pneumonia, pouco se conhecendo sobre a participação do VPI-4 devido a dificuldades do seu isolamento em cultura de células, a ausência de antígenos específicos para este vírus nos painéis de rotina de detecção dos vírus respiratórios, além de serem relacionados apenas a casos de infecções respiratórias leves. O objetivo do presente estudo é descrever o perfil epidemiológico e clínico das pneumonias causadas pelos quatro tipos de VPI na população de estudo, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2014. Para tanto, aspirados nasofaríngeos de 542 crianças de até cinco anos atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), que receberam o diagnóstico de pneumonia, foram submetidos à RT-PCR para a detecção dos VPI-1, 2 e 3 e 4. Estas amostras tinham sido analisadas anteriormente por imunofluorescência indireta para vírus sincicial respiratório (VSR), influenza (A e B), adenovírus e VPI (1, 2 e 3). Os VPI foram detectados em 165 casos, seguido de VSR (136), adenovírus (34) e influenza (30). As características clínicas e epidemiológicas de pneumonias pelos VPI foram analisadas em 104 amostras que apresentaram infecção isolada por um dos quatro tipos de VPI. Os VPI mais frequentemente detectados, em ordem decrescente, foram os tipos VPI-3 (64,42%), VPI-4 (19,23%), VPI-1(14,42%) e VPI-2 (1,92%). O VPI-4 foi o mais associado a co-infecções. O VPI-4 foi o único VPI cuja circulação esteve associada à estação chuvosa dos dois anos de estudo ( $p < 0,0001$ ). O VPI-3 e o VPI-1 apresentaram pico de circulação associado à estação seca. Os VPI são agentes frequentes de pneumonias em crianças menores que cinco anos na cidade de Fortaleza.

**Palavras chaves:** Pneumonias virais, vírus parainfluenza, reação em cadeia da polimerase.

## ABSTRACT

Pneumonia are public health problems worldwide, especially in children younger than five years old. Human parainfluenza virus (HPIV-1, 2 and 3) are common agents of pneumonia, little was know about the involvement of HPIV-4 due to difficulties of isolation in cell culture, the absence of antigens specific for this virus in panels routine detection of respiratory viruses, and are associated only with cases of mild respiratory infections. The aim of this study is to describe the clinical and epidemiological profile of pneumonia caused by four types of HPIV in the study population, from January 2013 to December 2014. To this end, nasopharyngeal aspirates of 542 children under five treated at Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), who were diagnosed with pneumonia, were subjected to RT-PCR for the detection of HPIV-1, 2, 3 and 4. These samples had been previously analyzed by indirect immunofluorescence for respiratory syncytial virus (RSV), influenza (A and B), adenovirus, and HPIV (1, 2 and 3). The HPIV were detected in 165 cases, followed by RSV (136), adenovirus (34) and influenza (30). Clinical and epidemiological characteristics of pneumonia by HPIV were analyzed in 104 samples with isolated infection with one of four types of HPIV. The HPIV most frequently detected, in descending order, were the HPIV-3 types (64.42%), HPIV-4 (19.23%), HPIV-1 (14.42%) and HPIV-2 (1.92 %). The HPIV-4 was the most associated with co-infection. The HPIV-4 was the only HPIV whose circulation was associated with the rainy season of two years of study ( $p < 0.0001$ ). The HPIV-3 and HPIV-1 had a circulation peak associated with the dry season. The HPIV are frequent agents of pneumonia in children younger than five years in the city of Fortaleza.

**Keywords:** Viral pneumonia, parainfluenza virus, polymerase chain reaction.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Microscopia eletrônica das formas esférica e filamentosa do vírus parainfluenza e sua representação esquemática estrutural ..... 21
- FIGURA 2-** Características do genoma dos gêneros *Respirovirus* e *Rubulavirus* ..... 22
- FIGURA 3-** Esquema do ciclo de replicação dos vírus parainfluenza ..... 26
- FIGURA 4-** Métodos de detecção dos vírus parainfluenza, Imunofluorescência direta, Efeito citopático viral em linhagem de célula LLC-MK2 e Técnica de RT-PCR ..... 33
- FIGURA 5-** Sinais e sintomas apresentados pela população de estudo ..... 46
- FIGURA 6-** Distribuição mensal do total de pneumonias, dos vírus pesquisados e dos índices pluviométricos durante o período de estudo ..... 49
- FIGURA 7-** Distribuição total das pneumonias positivas para os vírus parainfluenza durante o período de estudo ..... 53
- FIGURA 8-** Sintomas e sinais apresentados pelas crianças com pneumonia positiva para os vírus parainfluenza ..... 55

## LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1-** Taxonomia dos vírus parainfluenza ..... 20

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> Relação dos pares de <i>primers</i> , alvo da amplificação, sequências e tamanho dos fragmentos utilizados no estudo .....	42
<b>TABELA 2-</b> Características da população de estudo .....	43
<b>TABELA 3-</b> Ausência ou presença de fatores de risco na população de estudo .....	44
<b>TABELA 4-</b> Co-morbidades na população de estudo .....	45
<b>TABELA 5-</b> Achados da radiografia de tórax dos pacientes incluídos no estudo positivos ou negativos para algum dos vírus pesquisados por imunofluorescência ou RT-PCR .....	47
<b>TABELA 6-</b> Co-deteccões virais identificadas nas amostras analisadas .....	50
<b>TABELA 7-</b> Características da população pelos tipos de vírus parainfluenza detectados .....	54
<b>TABELA 8-</b> Distribuição dos fatores de risco e co-morbidades entre as crianças positivas para os vírus parainfluenza .....	56
<b>TABELA 9-</b> Tratamento instituído nas pneumonias positivas para cada tipos de vírus parainfluenza .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADh- Adenovírus humano

ANF- Aspirado nasofaríngeo

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

cDNA- DNA complementar

FUNCEME- Fundação Cearense de Meteorologia

HIAS- Hospital Infantil Albert Sabin

HN- Hemaglutinina-neuraminidase

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICTV- *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IFI- Imunofluorescência indireta

IRA- Infecção respiratória aguda

FLU- Influenza- A/B

IVAI- Infecções das vias aéreas inferiores

IVAS- Infecção das vias aéreas superiores

KDa- Kilodalton

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PAC- Pneumonia adquirida na comunidade

VPI- Vírus parainfluenza

VPI-1- Vírus parainfluenza-1

VPI-2- Vírus parainfluenza-2

VPI-3- Vírus parainfluenza-3

VPI-4 Vírus parainfluenza-4

VSR- Vírus sincicial respiratório

WHO - World Health Organization

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1. Os vírus parainfluenza .....	18
2.1.1. Histórico .....	18
2.2. Taxonomia .....	19
2.3. Aspectos estruturais .....	21
2.4 Genoma dos vírus parainfluenza .....	22
2.5 Proteínas virais .....	23
2.5.1. Nucleoproteína (N) .....	23
2.5.2. Fosfoproteína (P) .....	23
2.5.3. Proteína M .....	23
2.5.4. Proteína F .....	23
2.5.5. Proteína SH .....	24
2.5.6. Proteína HN.....	24
2.5.7. Proteína L .....	24
2.5.8. Proteínas acessórios ou não estruturais (C,V) .....	25
2.6. Replicação viral .....	25
2.7. Epidemiologia .....	26
2.7.1. Prevalência .....	26
2.7.2. Sazonalidade .....	27
2.7.3. Transmissão .....	29
2.7.4. Fatores de Risco .....	29
2.7.5. Fisiopatologia .....	30
2.7.6. Resposta imunológica do hospedeiro .....	30
2.7.7. Métodos diagnósticos .....	31
2.7.7.1. Técnicas de detecção de antígenos virais .....	31
2.7.7.2. Isolamento viral em cultura de células .....	31
2.7.7.3. Técnicas de biologia molecular .....	32
2.7.8. Profilaxia e Tratamento .....	34
2.7.9. Justificativa do estudo .....	35
<b>3. HIPÓTESES .....</b>	<b>35</b>
<b>4. OBJETIVOS DO ESTUDO .....</b>	<b>35</b>

4.1. Objetivo geral .....	36
4.2. Objetivos específicos .....	36
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
5.1. Descrição de estudo .....	37
5.1.1. Local de estudo .....	37
5.1.2. Tipo de estudo .....	37
5.1.3. Dados de pluviometria .....	37
5.1.4. Questões éticas .....	37
5.1.5. Banco de dados .....	37
5.1.6. População de estudo .....	38
5.1.7. Amostras clínicas .....	38
5.2. Diagnóstico molecular .....	38
5.2.1. Extração do material genético viral .....	38
5.2.2. Reação de transcrição reversa .....	39
5.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para os VPI -1, 2, 3 e 4 .....	39
5.2.4. <i>Nested</i> PCR para o vírus parainfluenza-4 .....	40
5.2.5. <i>Nested</i> PCR para a subtipagem do vírus parainfluenza 4A e 4B .....	40
5.2.6. Corrida eletroforética .....	40
5.2.7. Análise estatística .....	41
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
6.1. Características da população de estudo .....	43
6.2. Alteração ao raio-x do tórax .....	47
6.2. Distribuição mensal das pneumonias e vírus detectados .....	48
6.3 As co-deteccões virais .....	50
6.4 Características relacionadas aos vírus detectados nas amostras analisadas...	51
6.5 Aspectos epidemiológicos e sazonais das pneumonias positivas para cada vírus parainfluenza .....	52
6.6. Características da população com pneumonias positivas para os vírus parainfluenza .....	54
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICES</b>	
APÊNDICE 1-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ..	89
APÊNDICE A- CARTA DE CONCESSÃO DO CEP-HIAS .....	91

APÊNDICE B- REGISTRO DE APROVAÇÃO DO PROPESQ .....	92
APÊNDICE 2- REGISTRO NO CEP/HIAS .....	94
APÊNDICE 3- FICHA CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA .....	95
APÊNDICE 4- FICHA DE PACIENTES HOSPITALIZADOS .....	96

**ANEXOS**

ANEXO A Artigo submetido para a publicação .....	100
ANEXO B Artigo para submissão .....	101



## 1. INTRODUÇÃO

### Pneumonia

As pneumonias são problemas de saúde pública mundial especialmente na população infantil na qual representam importante impacto no número de hospitalizações e óbitos (NAIR *et al.*, 2013; WALKER *et al.*, 2013; RUDAN *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015). Das 6.3 milhões de crianças que morreram por alguma causa infecciosa em 2013, nos seus primeiros cinco anos de vida, a pneumonia foi responsável por 14.9% deste total (LIU *et al.*, 2015).

Estima-se que a incidência das pneumonias nos primeiros cinco anos de vida seja de 0,05 e 0,29 episódios, por criança, por ano nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente (RUDAN *et al.*, 2013). A maioria dos casos ocorre na Índia (43 milhões), China (21 milhões), Paquistão (10 milhões), e altos números adicionais em Bangladesh, Indonésia e Nigéria (6 milhões cada) (RUDAN *et al.*, 2013).

Na América Latina 8% dos óbitos em crianças menores de cinco anos de idade são atribuídos a pneumonia (BLACK *et al.*, 2010; MARCONE *et al.*, 2013; VILLARAN *et al.*, 2014).

O Brasil é um dos 15 países no mundo com maior número de casos anuais de pneumonia em crianças menores que cinco anos de idade (1,8 milhões de casos), com uma incidência estimada de 0,11 episódios por criança por ano, sendo a maioria destes casos observada nas regiões norte e nordeste (BLACK *et al.*, 2010; AXELSSON, SILFVERDAL, 2011).

Devido à importância das pneumonias como um problema para crianças menores de cinco anos, em maio de 2010, a OMS aprovou uma resolução reconhecendo a pneumonia como a principal infecção que mata crianças no mundo, tornando-a uma prioridade global em saúde, e declarando o dia 12 de novembro como dia mundial da pneumonia (BRYCE *et al.*, 2013).

Vários agentes microbianos são causa de pneumonia, destacando-se inúmeras bactérias e vírus. Cerca de 50-56% das pneumonias em menores de cinco anos têm etiologia viral, sendo o vírus sincicial respiratório (VSR), vírus influenza A, vírus influenza B, os vírus parainfluenza (VPI-1, VPI-2, VPI-3), adenovírus humano, coronavírus, metapneumovírus e rinovírus são frequentemente detectados nestes casos (BERKLEY *et al.*, 2010; MATHISEN *et al.*, 2010; RUUSKANEN *et al.*, 2011; PRETORIUS *et al.*, 2012; ALONSO *et al.*, 2012; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2012;

MARCONE *et al.*, 2013; ELBASHA *et al.*, 2013; KELLY *et al.*, 2015).

A participação dos vírus como agentes de pneumonia têm sido mais considerada, com o advento das técnicas moleculares, quando com o seu uso, novos vírus respiratórios foram descobertos neste novo milênio, como exemplo o metapneumovírus humano, o bocavírus humano e os novos coronavírus (SARS-CoVH, CoVH-NL63, HKU1 e MERS-CoVH) (KRUNIC *et al.*, 2011; ZAKI *et al.*, 2012; RHEDIN *et al.*, 2014). Além disto, o uso cada vez maior destas técnicas fez com que vírus não considerados com prováveis causadores de quadros infecciosos respiratórios baixos, a exemplo do vírus parainfluenza tipo 4, passassem a ser investigados e detectados com maior frequência (AGUILAR *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2013).

Os vírus parainfluenza (VPI) são agentes frequentes de pneumonia infantil (WEINBERG *et al.*, 2009; MATHISEN *et al.*, 2010; BOOR *et al.*, 2013; RHEDIN *et al.*, 2015). Estima-se que 12% das hospitalizações em crianças com pneumonia sejam atribuídas aos VPI (HALL, 2001; WEINBERG *et al.*, 2009; BOOR *et al.*, 2013). Estes vírus podem causar diferentes síndromes clínicas respiratórias desde infecções das vias aéreas superiores (IVAS) a infecções das vias aéreas inferiores (IVAI) (BERKLEY *et al.*, 2010; WEIXIAN *et al.*, 2015). O VPI-3 é o mais associado a casos de bronquiolite e pneumonia em lactentes (PRETORIUS *et al.*, 2012; FROST *et al.*, 2014). O VPI-1 e VPI-2 são mais comum em crianças de 1-5 cinco anos de idade, causando principalmente bronquite e crupe (HALL, 2001), mas também podem causar pneumonia. O VPI-4 foi inicialmente associado ao resfriado comum assim como outras síndromes respiratórias altas e sem gravidade (ANDREWES *et al.*, 1959). A sua participação em casos de pneumonias só ocorreu mais recentemente com a utilização de métodos de Biologia Molecular (WANG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; BIALASIEWICZ *et al.*, 2014; FROST *et al.*, 2014).

O caráter pioneiro deste estudo está em apresentar as características epidemiológicas de pneumonias infantis associadas ao VPI-4 no Brasil, comparando-as às dos outros VPI.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Os vírus parainfluenza

#### 2.1.1. Histórico

Os vírus parainfluenza (VPI) foram denominados inicialmente, em 1956, como *Croup associated ou CA virus*. O primeiro a receber esta denominação foi o hoje denominado VPI-2 (CHANOCK *et al.*, 1956). Swabs de garganta coletados de 12 lactentes que apresentavam sinais e sintomas de crupe foram inoculados em culturas de células epiteliais de rim de macaco, resultando na descrição de dois novos vírus que apresentavam efeitos citopatogênicos esponjosos. Estes vírus lembravam os mixovírus, mais especificamente os vírus influenza, embora não se relacionassem antígenicamente a eles (ANDREWES *et al.*, 1959). Os VPI-1 e VPI-3, foram descritos anteriormente como *Haemadsorption types 2 e 1* ou HA-2 e HA-1 por Chanock e colaboradores em 1958. O VPI-4 foi descrito inicialmente em 1959, quando termo parainfluenza foi usado devido às semelhanças antigênicas com o vírus influenza em relação às principais proteínas do envelope (hemaglutinina-neuraminidase) (ANDREWES *et al.*, 1959).

Os VPI são divididos geneticamente e antígenicamente em tipos 1, 2, 3 e 4 (VPI-1, VPI-2, VPI-3 e VPI-4). O VPI-4 foi posteriormente dividido em dois subtipos (4A e 4B), a partir de diferenças antigênicas evidenciadas através da inibição da hemadsorção com soro de cobaias imunizadas com cepas padrão do VPI-4 (CANCHOLA *et al.*, 1964; KONDO *et al.*, 1990; KOMADA *et al.*, 2011).

Foram identificadas também outras espécies antígenicamente relacionadas aos VPI humanos, mas que são adaptados para infectar outros animais, como os VPI canino e bovino; os vírus símios 5 e 41 que infectam primatas e se assemelham antígenicamente ao VPI-2; o vírus Sendai, com semelhanças antigênicas e genéticas com o VPI-1, e que infecta ratos, hamsters e porcos; além do vírus da doença de Newcastle, que infecta aves domésticas, selvagens e exóticas (HERICKSON, 2003).

## 2.2. Taxonomia

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses*), os VPI pertencem à ordem *Mononegavirales*, família *Paramixoviridae*, e a duas subfamílias: *Paramixovirinae* e *Pneumovirinae*. A subfamília *Paramixovirinae* possui sete gêneros: *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Morbilivirus*, *Henipavirus*, *Aquaparamixovirus*, *Avulavirus* e *Ferlavirus*. A subfamília *Pneumovirinae* contém dois gêneros, *Pneumovirus* e *Metapneumovirus* (LAMB; PARKS, 2013) (Quadro 1).

A classificação destes vírus em vários gêneros é baseada em alguns fatores, como características morfológicas, organização genômica e atividades das principais proteínas estruturais e não estruturais virais. Os *Respirovirus* possuem a proteína C, que não é encontrada nos *Rubulavirus*, além de possuírem um gene adicional que codifica a proteína SH (small hydrophobic protein) ausente nos *Rubulavirus* (KARRON; COLLINS, 2013).

Todos os vírus pertencentes aos gêneros que compõem as subfamílias (*Paramixovirinae* e *Pneumovirinae*) possuem genoma de RNA não segmentado, o que os diferencia do vírus influenza (*Orthomixovirus*). (CHENOCK *et al.*, 1958; ANDREWES *et al.*, 1959).

Quadro 1- Taxonomia dos vírus parainfluenza.

			Espécie			
ORDEM: <i>Mononegavirales</i>	FAMÍLIA: <i>Paramixoviridae</i>	SUBFAMÍLIA	<i>Paramixovirinae</i>	Gênero	Humano	Animal
				<i>Respirovirus</i>	VPI-1 e VPI-3	Vírus parainfluenza bovina 3 (bVPI-3). Vírus Sendai (Sev)
				<i>Rubulavirus</i>	VPI-2 e VPI4A/4B Vírus da Caxumba	Vírus parainfluenza-5 ou simio 5 (Sev 5). Vírus mapuera (MPRV)
				<i>Morbilivirus</i>	Vírus de Sarampo	Vírus da cinomose (CDV) Vírus da peste bovina (RPV). Vírus da peste dos pequenos ruminantes (PPRV). Morbilivirus dos cetáceos (CeMV)
				<i>Ferlavirus</i>	*	Vírus de fer-de-lance (FDLV)
				<i>Aquaparamixovirus</i>	*	Paramixovirus de salmão do atlântico
				<i>Avulavirus</i>	*	Vírus da doença de Newcastle (NDV)
				<i>Henipavirus</i>	*	Hendra, Nipav vírus
				<i>Pneumovirus</i>	VRS	Vírus sincicial respiratório bovino (bRSV). Vírus de pneumonia dos ratos (MPV).
				<i>Metapneumovirus</i>	Metapneumovírus humano (HMPV)	Metapneumovirus aviário (AMPV)

Fonte: Adaptado de LAMB, R.A; PARKS, G.D. 6<sup>th</sup> ed: *Fields Virology Philadelphia*, v.1, p.958-964. 201

(\* ) obs: Até o presente momento não houve relato de infecções por estes agentes em humanos

### 2.3. Aspectos estruturais

Os VPI são pleomórficos, com estrutura que varia de esférica a filamentosa e possuem nucleocapsídeo de simetria helicoidal com diâmetro variando entre 150 a 200 nm (Figura 1). Apresentam envelope composto por bi-camada lipídica e proteínas de superfície (HN e F).

A proteína F e a proteína SH estão ancoradas ao envelope por ligação carboxi-terminal, enquanto a proteína HN está ancorada por ligação amino-terminal. Na estrutura do envelope, a proteína M estabelece interação com as proteínas F e HN (CHANG *et al.*, 2012; KARRON; COLLINS, 2013). A proteína N está ligada firmemente às proteínas P e L, formando um complexo da polimerase viral (HERICKSON, 2003, KARRON; COLLINS, 2013).

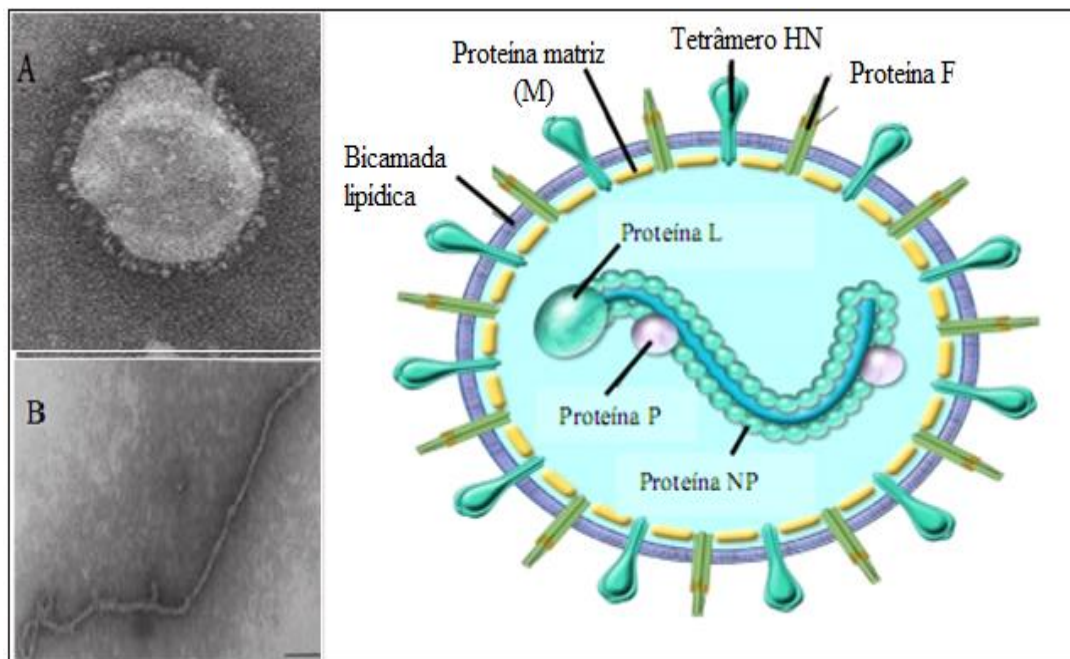


FIGURA 1- Microscopia eletrônica das formas esférica e filamentosa do vírus parainfluenza (A e B) e sua representação esquemática estrutural (C).

Fonte: KING *et al.*, 2012 (ICTV). (A, B)

Fonte: MOSCONA *et al.*, 2005. (C)

## 2.4 Genoma dos vírus parainfluenza

O genoma dos VPI é formado por uma fita simples de RNA linear, não segmentado, com polaridade negativa de  $15,4 \times 10^3$  nucleotídeos, codificando seis a sete genes. A organização do genoma viral segue a ordem: 3' –N-P/C/V-M-F-(SH)-HN-L-5', e a presença ou ausência do gene SH entre os genes das glicoproteínas F e HN determina a divisão dos VPI nos gêneros *Respirovirus* e *Rubulavirus*, respectivamente (Figura 2). Os vírus do gênero *Respirovirus* não têm o gene SH (VPI-1 e VPI-3, o vírus Sendai e o vírus da doença de Newcastle), enquanto que os vírus do gênero *Rubulavirus* (VPI-2 e VPI-4, o vírus parainfluenza Símio 5 e o vírus do sarampo) apresentam o gene SH.

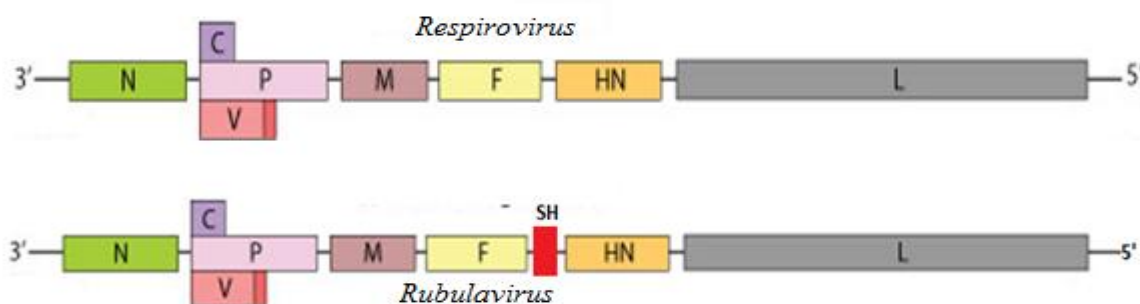


FIGURA 2- Características do genoma dos gêneros *Respirovirus* e *Rubulavirus*.

Fonte: SBI. Swiss Institute of Bioinformatics (2012).

Os genes N, P e L são intimamente ligados ao RNA viral e são essenciais para atividade de RNA-polimerase e RNA dependente na replicação viral.

Os VPI-1 e -3 codificam o gene P com 500 a 600 aminoácidos, a partir da síntese de uma proteína não estrutural, a proteína C, com cerca de 204 aminoácidos. Desta forma, o gene P do VPI-1 e VPI-3 tem peso molecular entre 83.000 e 90.000 kDa. Já os VPI-2 e VPI-4 produzem mais de um RNA mensageiro (RNAm) a partir do gene P, através da inserção de dois resíduos em um sitio específico da molécula de RNAm. Desta forma é sintetizada a proteína V (não estrutural) e o gene P dos VPI-2 e VPI-4 apresenta o peso molecular menor, entre 49.000 e 53.000 kDa.

## 2.5 Proteínas virais

Todos os VPI apresentam seis proteínas comuns: HN, F, M, N, P, e L. As proteínas N (nucleoproteína), L (large), e P (fosfoproteína), juntamente com o RNA, formam o nucleocapsídeo viral. Uma ou mais proteínas adicionais, como as C, V não são essenciais para a replicação viral e são conhecidas como proteínas acessórias (KARRON; COLLINS, 2013).

### 2.5.1. Nucleoproteína (N)

A proteína (N) possui 509-597 aminoácidos e peso molecular entre 66-70 kDa. Esta proteína liga-se ao RNA genômico e, juntamente com a proteína P forma o complexo denominado ribonucleoproteína (RNP) helicoidal, que protege o genoma viral da ação de RNAses. (HENRICKSON, 2003; KARRON; COLLINS, 2013).

### 2.5.2. Fosfoproteína (P)

A proteína (P) é altamente fosforilada, com caráter ácido e que desempenha uma importante função na regulação do processo da transcrição e replicação viral. Possui 568-603 aminoácidos e peso molecular variando de 49-53 kDa no gênero *Respirovirus* e de 392 a 399 aminoácidos e peso molecular de 82-90 kDa no gênero *Rubulavirus*. Constitui uma subunidade da polimerase viral (formadas pelas proteínas P e L) (HENRICKSON, 2003; WRIGHT *et al.*, 2005; KARRON; COLLINS, 2013).

### 2.5.3. Proteína M

A proteína da matriz (M) é uma proteína interna e não glicosilada que possui 256 aminoácidos com peso molecular de 27 kDa. Ela está associada ao nucleocapsídeo viral nas células infectadas e têm a função de mediar a associação do nucleocapsídeo com o envelope recém-sintetizado (KARRON; COLLINS, 2013).

### 2.5.4. Proteína F

A glicoproteína da fusão (F) está ancorada na região próxima da carboxila-terminal (intracitoplasmática) e possui um domínio hidrofóbico clivável próximo à região amino-



terminal. Possui 574 aminoácidos e peso molecular de 70 kDa. É responsável pela ligação do envelope viral à membrana citoplasmática da célula hospedeira, liberando nucleocapsídeo diretamente no citoplasma. Após a síntese e a glicosilação, a proteína F0 é clivada proteoliticamente por uma protease celular, semelhante à tripsina, em duas subunidades F1 e F2, que permanecem ligadas por pontes dissulfeto nos resíduos cisteína. A subunidade F1 é relativamente bem conservada, sendo sua função comprometida mediante deleção ou substituições de aminoácidos (KARRON; COLLINS, 2013).

### **2.5.5. Proteína SH**

A proteína SH (*small hydrophobic protein*) é uma molécula pequena com aproximadamente 44-142 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 7,5 kDa que se insere na membrana citoplasmática da célula hospedeira por meio de uma sequência hidrofóbica (KARRON; COLLINS, 2013). Recentemente foi demonstrado que a proteína SH forma um canal iônico próton-seletivo, na membrana citoplasmática da célula hospedeira, atuando na montagem do vírus, durante o ciclo de replicação. Esta proteína também pode apresentar função de resposta contra a imunidade inata (HENRICKSON, 2003).

### **2.5.6. Proteína HN**

A glicoproteína HN (hemaglutinina-neuraminidase) possui tamanho aproximado de 570 aminoácidos e peso molecular de 75 kDa. É uma glicoproteína ancorada na membrana celular, que possui três funções: i) adsorção do vírus à célula hospedeira, via receptores do ácido siálico, ii) clivagem enzimática dos receptores na membrana da célula hospedeira, prevenindo assim que as partículas virais geradas no processo de replicação fiquem agregadas impedindo a sua liberação, iii) ativação da proteína F, mediando a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira (HENRICKSON, 2003; KARRON; COLLINS, 2013).

### **2.5.7. Proteína L**

A proteína L (*Large*) é a maior proteína viral constituída de 2.200 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 250 kDa. Com base em seu tamanho e localização

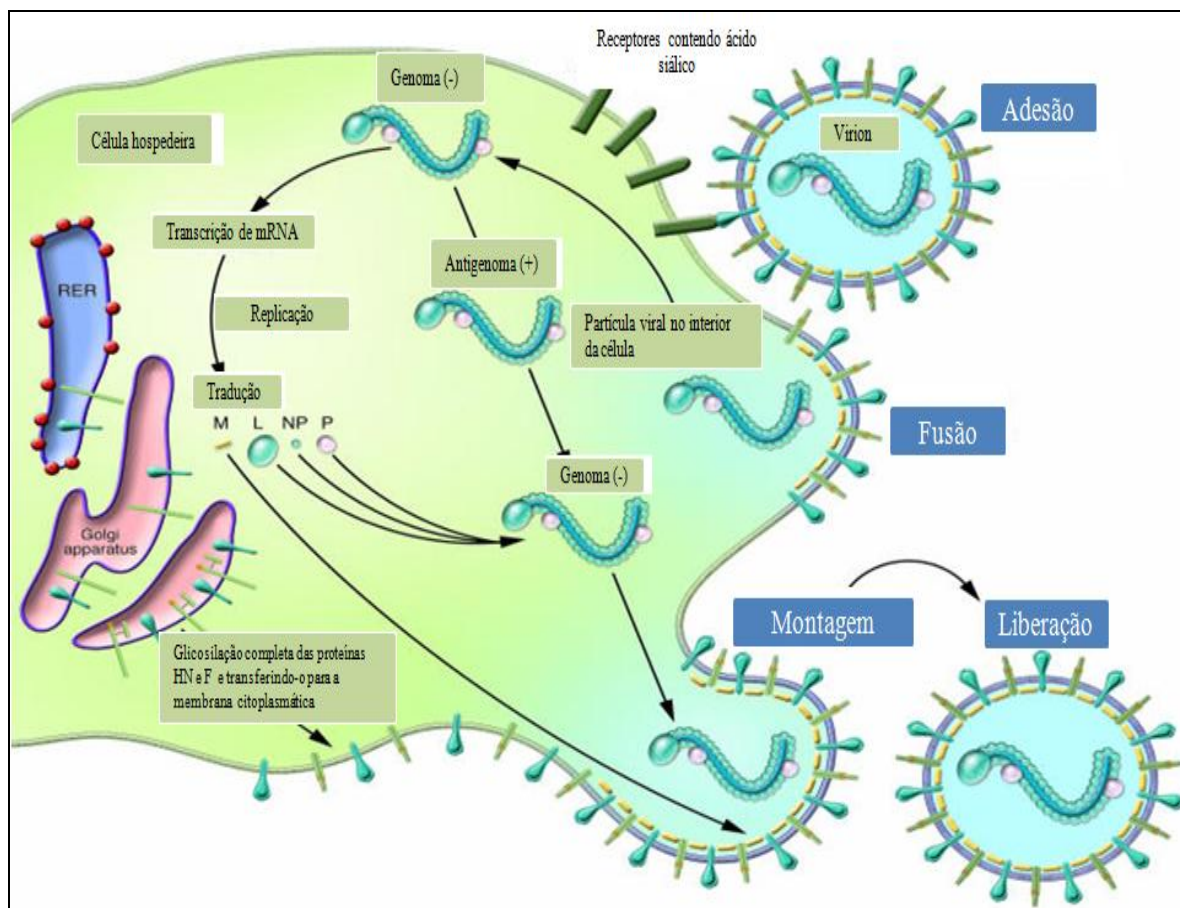
no nucleocapsídeo, atribui-se a esta proteína as atividades enzimáticas de RNA polimerase e RNA dependente, com função de replicação e formação de estrutura do RNAm (HERNRICKSON, 2003; KARRON; COLLINS, 2013).

#### **2.5.8. Proteínas acessórios ou não estruturais (C e V)**

As proteínas acessórias (não estruturais) são produtos do gene P dos VPI. Estas proteínas não são essenciais para a replicação viral, mas atuam na regulação da síntese de RNA viral, inibição da produção de interferons nas células infectadas e inibição da apoptose celular (KARRON; COLLINS, 2013).

### **2.6. Replicação viral**

O ciclo de replicação dos VPI inicia-se quando a partícula viral liga-se a moléculas receptoras contendo ácido siálico presente na superfície de uma célula susceptível (HENRICKSON, 2003) (Figura 3). Após a adsorção da partícula viral aos receptores celulares, a proteína F catalisa fusão do vírus na membrana celular por um processo denominado decapsidação, e o material genômico viral é liberado para o citoplasma. Como o RNA viral tem polaridade negativa, é necessário que haja a síntese de uma fita de polaridade positiva, que terá a função de mRNA. As proteínas P e L, e possivelmente N, são necessários para esta atividade durante transcrição. O RNA genômico é sequencialmente transcrito para gerar os mRNA, e cada mRNA é traduzido posteriormente em proteínas no ribossoma celular. Então após a síntese de mRNA para a formação dos vírions, todo o compartimento proteico segue para o citoplasma onde são liberados por um processo denominado de brotamento (HENRICKSON, 2003; MOSCONA *et al.*, 2005).



**Figura 3-** Esquema do ciclo de replicação dos vírus parainfluenza.

Fonte: MOSCONA *et al.* (2005).

## 2.7. Epidemiologia

### 2.7.1. Prevalência

Os VPI causam pneumonia em todo o mundo em crianças e adultos previamente saudáveis, com maior impacto em crianças com idade inferior a cinco anos (HAMMITT *et al.*, 2012; ALONSO *et al.*, 2012; WEIXIAN *et al.*, 2015; QU *et al.*, 2015). Também têm sido frequentemente associados a infecções graves em pacientes imunocomprometidos, como transplantados e idosos (FALSEY, 2012; SEO *et al.*, 2014; SRIDHAR *et al.*, 2014; HONG *et al.*, 2014; CAMPBELL *et al.*, 2015).

Das crianças com quadro de pneumonia que procuram unidade de saúde nos Estados Unidos, 7% estão infectadas por algum tipo de VPI (ABEDI *et al.*, 2014; JAIN *et al.*, 2015). Embora o VSR e influenza sejam os vírus mais frequentemente identificados em pacientes com pneumonia na grande maioria dos levantamentos realizados, os VPI-1, 2, 3 ocupam, em estudos de países subdesenvolvidos e

desenvolvidos, posição de destaque como agentes de pneumonia, com frequência variando entre 1,8 a 19% (MATHISEN *et al.*, 2010; HAMMITT *et al.*, 2012; KHOR *et al.*, 2012; HOMAIRA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; ESPOSITO *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014).

No Brasil, vários estudos têm demonstrado uma frequência de identificação dos VPI entre 0,3% a 17% em casos de pneumonia (NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2008; FÉ *et al.*, 2008; AMARAL, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2011; ALONSO *et al.*, 2012; DE-PARIS *et al.*, 2014).

Dentre os três tipos de VPI (VPI-1, 2 e 3), o VPI-3 é o mais frequentemente identificado na maioria dos levantamentos (MIZUTA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014). Estudos sorológicos indicam que 60% das crianças até dois anos são infectadas pelo VPI-3 (YANO *et al.*, 2014). Estudo realizado em Fortaleza demonstra taxas de detecção dos VPI-3, VPI-1 e VPI-2 de 83,76%, 11,96% e 4,27%, respectivamente (FÉ *et al.*, 2008).

O VPI-4 tem sido pouco estudado devido à dificuldade do seu isolamento em cultura de células e a sua ausência nos painéis de rotina de detecção de antígeno dos vírus respiratórios disponíveis comercialmente, o que tem limitado o maior conhecimento do seu papel na etiologia de pneumonias (LAU *et al.*, 2005; VACHON *et al.*, 2006; CHIU *et al.*, 2006; BILLAUD *et al.*, 2005; LAU *et al.*, 2009; HSIEH *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012; BIALASIEWICZ *et al.*, 2014).

O avanço no diagnóstico de doenças virais obtidos desde a implantação de técnicas como a reação em cadeia de polimerase (PCR) tem modificado esse quadro, otimizando a identificação do VPI-4 em casos de pneumonia (LAU *et al.*, 2009).

### **2.7.2. Sazonalidade**

Os VPI apresentam comportamento sazonal variável de acordo com o demonstrado em estudos realizados em países de regiões geográficas diversas. O estudo em que a atividade dos quatro tipos de VPI é seguida por 14 anos nos Estados Unidos mostra que a porcentagem de casos positivos para VPI-3 e VPI-2 ocorre anualmente durante abril e junho e de outubro a novembro, respectivamente. Já o aumento de casos de VPI-1 ocorre bianualmente durante setembro a dezembro nos anos ímpares. O total de VPI-4 detectado neste estudo não permitiu identificar o pico de sazonalidade do mesmo

(FRY *et al.*, 2006). No Japão por sua vez, seguindo-se o padrão de ocorrência de diversos vírus respiratórios foi seguido por oito anos consecutivos, podendo-se observar que o VPI-3 teve atividade bem regular entre os meses de maio a julho (MIZUTA *et al.*, 2013).

Um estudo realizado em diferentes países da América do Sul (Argentina, Bolívia, Colômbia, Equador, Paraguai, Peru, Venezuela), e Central (Honduras, Nicarágua, El Salvador) mostrou que houve uma grande variação na circulação dos diferentes tipos de VPI durante os anos de 2007 a 2010. Do total de VPI circulantes 35% circularam entre junho e agosto, período mais frio em muitos países incluídos no estudo (VILLARAN *et al.*, 2014). Em Buenos Aires, os VPI-1 e VPI-2 circularam com dois picos anuais, observados nos meses de abril e maio, enquanto que o pico de circulação do VPI-3 foi em outubro. Na cidade de Manágua, padrões irregulares de VPI-1 e VPI-2 foram observados, com pico em junho enquanto o VPI-3 apresentou um pico entre maio e junho. No Peru, o VPI-3 apresentou-se irregularmente, enquanto o VPI-1 circulou predominantemente nos meses de junho e julho e o VPI-2 apresentou-se em agosto.

A maioria dos estudos que descrevem a atividade dos VPI no Brasil foi realizada em curtos períodos de tempo, o que dificulta uma análise mais confiável da existência de padrões de regularidade ou irregularidade na circulação dos diversos tipos. Em geral o VPI-3, o mais detectado em estudos realizados em diferentes cidades brasileiras, é o único a apresentar um padrão sugestivo de circulação.

Estudo realizado no estado de São Paulo, os VPI foram detectados ao longo de cada ano, sem que fosse possível demonstrar um padrão de ocorrência para os diferentes tipos. Contudo, pode-se observar que uma maior circulação destes vírus ocorreu nas estações de outono e inverno. O VPI foi detectado mais intensamente nos meses de abril a outubro, não sendo possível estabelecer um período de maior ocorrência para os VPI-1 e VPI-2 (PECCHINI *et al.*, 2015).

Na região nordeste do Brasil, o que se conhece a respeito da circulação dos VPI é proveniente de estudos realizados na cidade de Salvador e Fortaleza. Em Salvador estes vírus apresentaram pico de circulação nos meses de setembro, outubro e novembro, sem distinguir a circulação dos diferentes tipos (NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2010). Já em Fortaleza, em estudo realizado durante seis anos consecutivos, mostrou que a ocorrência dos VPI-1 e -2 foi maior nos meses de setembro a novembro, embora somente o VPI-3 tenha apresentado uma circulação

significativamente relacionada a este período (FÉ *et al.*, 2008).

Devido à escassez de estudos realizados com a coleta contínua de amostras clínicas respiratórias ao longo de vários anos onde se pesquisa especificamente o VPI-4 ainda não foi possível estabelecer um padrão sazonal para este vírus (FRY *et al.*, 2006; WEIXIAN *et al.*, 2015).

### **2.7.3. Transmissão**

A transmissão dos VPI ocorre por meio de aerossóis ou gotículas contendo as partículas virais ou através do contato pessoa-a-pessoa, seja pela deposição direta de secreção na mucosa nasal ou na conjuntiva de um hospedeiro susceptível ou pela auto-inoculação em que o paciente transfere os vírus pelas mãos de uma região para outra. Outra forma de aquisição dos VPI é através de fômites e de superfícies que podem ser contaminados com o vírus, seja por contato direto com secreções respiratórias ou com aerossóis formados durante a fala, espirros e tosse (BONNE; GERBA, 2007). Profissionais da área de saúde podem adquirir ou transmitir estes agentes durante a manipulação dos pacientes, uma vez que não utilizadas as barreiras de proteção individuais de pacientes e da equipe de saúde, ocorrendo assim surtos hospitalares de infecções respiratórias causadas pelos VPI, como já observado em enfermarias pediátricas e berçários (WEINBERG *et al.*, 2009; HSEIH *et al.*, 2010; O'CALLAGHAN-GORDO *et al.*, 2011; CALVO *et al.*, 2011; BEM-SHIMOL *et al.*, 2013; LUKŠIĆ *et al.*, 2013; JAIN *et al.*, 2015).

### **2.7.4. Fatores de Risco**

Diversos fatores podem aumentar o risco das crianças contraírem infecções respiratórias baixas, sejam os relacionados ao hospedeiro, os ambientais e fatores sócio-econômicos. Relacionados ao hospedeiro podem ser citadas a faixa etária, o baixo peso ao nascer, o não-aleitamento materno, a desnutrição e a ingestão deficiente de vitamina A (RUDAN *et al.*, 2013).

Os fatores ambientais incluem a exposição passiva ao fumo, a aglomeração de pessoas em domicílio, a utilização de creches, além da moradia em áreas urbanas com elevados índices de poluição atmosférica (LE *et al.*, 2012; RUDAN *et al.*, 2013).

São considerados fatores socioeconômicos as más condições de habitação incluindo as sanitárias, a dificuldade de acesso ao serviço de saúde, a baixa renda e baixa escolaridade dos pais (CARDOZO *et al.*, 2007; MANIKAN *et al.*, 2012; RUDAN *et al.*, 2013). A maior escolaridade das mães ou responsáveis pelas crianças propiciaria um conjunto de ações relacionadas ao cuidado mais adequado da criança e ao conhecimento de medidas preventivas de saúde, as quais reduzem a morbidade por doença respiratória (RUDAN *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2015).

### **2.7.5. Fisiopatologia**

Após uma infecção por VPI através de fômites ou aerossóis, o vírus penetra através da nasofaringe propagando-se pelo trato respiratório superior (HENRICKSON, 2003; CROWE, 2003; YUSUF *et al.*, 2007). A disseminação da infecção ocorre célula a célula, assim como pela viremia. A descamação, os produtos celulares e virais liberados, a necrose celular e a resposta imunológica conduzem aos sintomas clínicos da doença. A infecção pode atingir laringe, traquéia, brônquios, bronquíolos e pulmão. Diversos fatores contribuem para a patogênese viral, interferindo no processo de brotamento viral, assim como a interferência sobre a indução de interferon associada às proteínas V e C (SCHOMARKER *et al.*, 2012).

Os interferons, as células natural killer, os anticorpos e as células T citotóxicas desempenham papel importante na resolução do processo infeccioso (JORNOT *et al.*, 2011; LEWANDOWSKA-POLAK *et al.*, 2015).

### **2.7.6. Resposta imunológica do hospedeiro a infecção pelos vírus parainfluenza**

Os VPI são replicados no trato respiratório superior e se propagam para o trato respiratório inferior em torno de três dias. As defesas do hospedeiro contra os VPI são, em grande parte, mediadas por imunidade humoral direcionada as duas glicoproteínas de superfície, HN e F. A maioria das crianças nasce com anticorpos neutralizantes, de origem materna, contra os quatro tipos de VPI (OGILVIE *et al.*, 1981; CROWE, 2003). As crianças começam a adquirir os anticorpos maternos (IgG) por volta dos 32<sup>a</sup> semana de gestação por via transplacentária. Estes anticorpos são adquiridos aproximadamente na mesma concentração em que são encontradas no soro da mãe durante o parto. A prematuridade é um fator para a gravidade da doença, devido pouca quantidade de anticorpos maternos adquiridos durante a gestação. Os anticorpos que são transmitidos

são principalmente da sub-classe IgG-1 e pode ser encontrados em crianças até 6 meses da idade, podendo-se prolongar até um ano em algumas crianças (CROWE, 2003; HENRICKSON, 2003; BILLAUD *et al.*, 2006).

A infecção primária pelos VPI não confere imunidade permanente ocorrendo reinfecções. Em algumas infecções a imunidade desenvolvida é suficiente para impedir a replicação viral e uma infecção de maior gravidade (CROWE, 2003; LOUGHLIN; MOSCONA, 2006).

Anticorpos específicos de classe IgA são responsáveis por confere a proteção na mucosa nasal, mas devido um processo inflamatório por ação viral podem perder essa capacidade favorecendo a disseminação viral (CROWE, 2003; FENSTERL *et al.*, 2009).

Com relação à imunidade celular, seu papel na infecção por VPI é incerto. Linfócitos T citotóxicos direcionados às proteínas virais reconhecem antígenos expressos por células infectadas e são encontrados em indivíduos saudáveis. Como as infecções são mais graves e apresentam períodos mais longos de replicação viral nos hospedeiros com deficiência de imunidade celular, como os pacientes submetidos a transplante de medula óssea, pressupõe-se que o papel dos linfócitos T seja importante na resolução da infecção (CROWE, 2003; SEO *et al.*, 2014; CAMPBELL *et al.*, 2015).

## **2.7.7. Métodos diagnósticos**

### **2.7.7.1. Técnicas de detecção de antígenos virais**

A imunofluorescência (IF) e o ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA) são os testes rápidos mais utilizados para detecção de antígenos de VPI em secreções nasais. A IF é um método relativamente barato e simples de ser executado, permitindo um resultado em 30 minutos, quando se trata da IF direta e de até duas horas quando realizada a IF indireta (RAY; MINNICH, 1987; TAKAHASHI *et al.*, 2015). A emissão de resultados rápida é importante no diagnóstico laboratorial de viroses respiratórias uma vez que os vírus associados a estas síndromes têm um período curto de incubação com rápida disseminação (LESSLER *et al.*, 2009). Essa técnica tem como limitação a necessidade de um microscopista bem treinado capaz de reconhecer a presença de células positivas. A IF, direta e indireta, tem sido bastante utilizada para detecção de diversos vírus respiratórios inclusive, VPI-1, 2 e 3 (COSTA *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2009; ; TAKAHASHI *et al.*, 2015). Entretanto, para a detecção de VPI-4 têm sido



colocado disponível comercialmente o anticorpo monoclonal para este vírus para uso na IF direta (LAU *et al.*, 2005; GREENHOW; WEINTRUB, 2006) (Figura 4 A). Deste modo este vírus não é pesquisado nos kits comerciais disponíveis para pesquisa de diversos vírus respiratórios simultaneamente, sendo pesquisado isoladamente. A sensibilidade da IF para os VPI-1, -2 e -3, quando comparado com a técnica de RT-PCR tem variado, nos diferentes estudos, entre 57% a 75% e a especificidade tem se mostrado uniformemente elevada entre 94 a 99,5% (VACHON *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2012; ABIKO *et al.*, 2013; HARDICK *et al.*, 2014). A sensibilidade da IF para os VPI, quando comparado à do isolamento em cultura celular, tem variado entre 31 e 100% (HENRICKSON, 2003; WANG *et al.*, 2012; ABIKO *et al.*, 2012). Os resultados parecem ser melhores para VPI-3, (WANG *et al.*, 2012) e piores para o VPI-4 (AGUILAR *et al.*, 2000; LAU *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2012; ABIKO *et al.*, 2012).

#### **2.7.7.2. Isolamento viral em cultura de células**

O isolamento viral em cultura de células é uma técnica clássica utilizada no diagnóstico de IRA virais que tem sido considerada o “padrão-ouro” para os VPI-1, 2 e 3, respectivamente (HENRICKSON, 2003; LELAND, 2007). Embora seja uma técnica laboriosa, que requer pessoal qualificado para a sua execução, apresenta um tempo variável para liberação de resultados entre (2 a 14 dias) ~~para sua execução~~ (HENRICKSON, 2003; LESSLER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012). As linhagens celulares mais utilizadas para o isolamento dos VPI são células epiteliais de rim de macaco verde e macaco Rhesus (Vero, LLC-MK2) (Figura 4 B), A549 (células epiteliais de carcinoma de pulmão humano), HEp-2 (derivado de carcinoma da laringe) e MDCK(células epiteliais de rins de cães) (GARDNER, 1969; FUKUSHIMA *et al.*, 2011). Entre os efeitos citopáticos relacionados aos VPI podemos citar a formação de sincícios, arredondamento celular e a perda de contorno celular (GARDNER, 1969).

Para confirmação do isolamento viral várias técnicas podem ser utilizadas como a IF (direta e indireta), inibição da hemadsorção ou a inibição da hemaglutinação (ADAM & RILLEY, 2009).

### 2.7.7.3. Técnicas de biologia molecular

As técnicas de Biologia Molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (RT-PCR, *nested*-PCR, qPCR) têm sido empregadas nos estudos que têm como objetivo a detecção dos quatro tipos de VPI devido a sua maior sensibilidade frente aos métodos clássicos de detecção viral (AGUILAR *et al.*, 2000; JUNIOR *et al.*, 2014) (Figura 4). Nestas técnicas geralmente são amplificados os genes HN ou P, por serem os genes mais conservados entre os diversos tipos de VPI.

A taxa de detecção dos VPI através de tais métodos tem variado entre 1,8% a 19,1% (CILLA *et al.*, 2008; BERKLEY *et al.*, 2010; MATHISEN *et al.*, 2010; HAMMITT *et al.*, 2012; ESPOSITO *et al.*, 2013; RHEDIN *et al.*, 2014; KELLY *et al.*, 2015).

As técnicas de sequenciamento são utilizadas nas análises filogenéticas e detecção de possíveis mutações entre as regiões conservadas dos VPI ((KOMADA *et al.*, 2011; ALMAJHDI *et al.*, 2012; ALQUEZAR-PLANAS *et al.*, 2013).

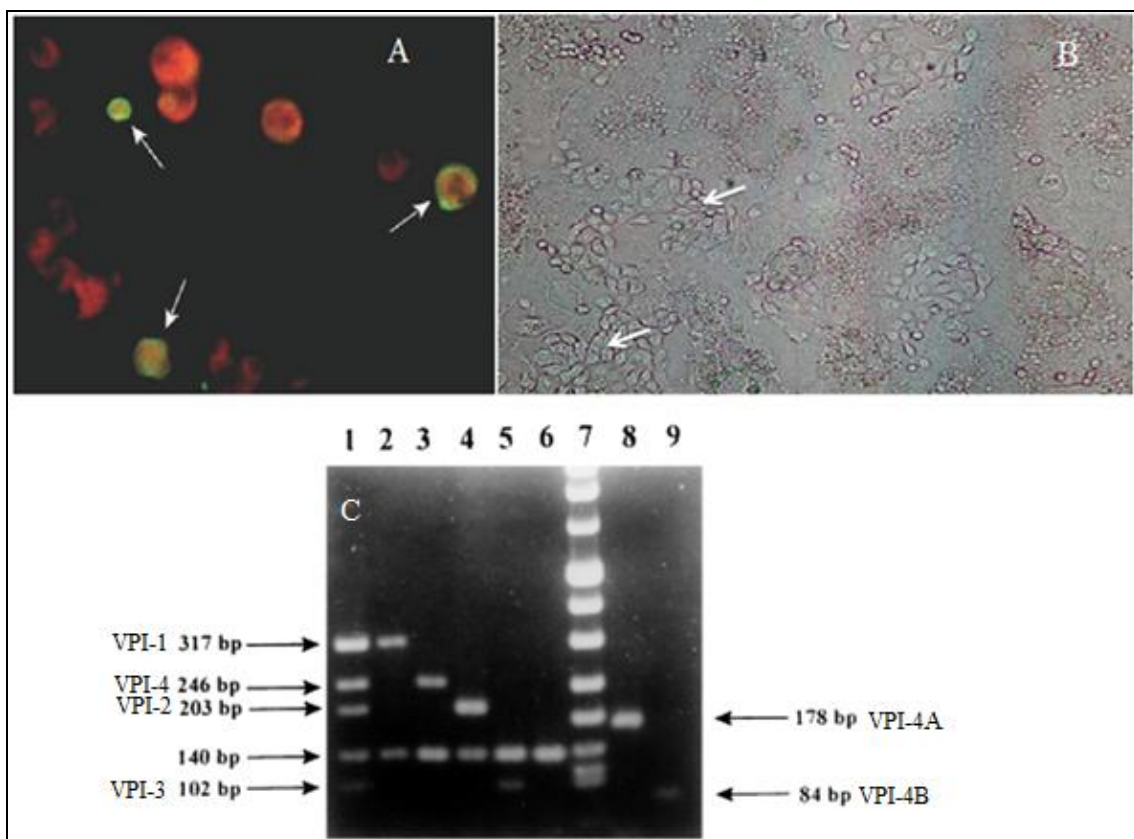


Figura 4- Métodos de detecção dos vírus parainfluenza (A), Imunofluorescência direta; (B) Efeito citopático viral em linhagem de célula LLC-MK2 (C) Técnica de RT-PCR.

Fontes: Chiu *et al.* (2006); Billaud *et al.* (2005); Aguilar, (2000).

### 2.7.8. Profilaxia e Tratamento

Várias tentativas vêm sendo desenvolvidas na descoberta das vacinas para os VPI. Inicialmente, foram realizadas tentativas utilizando vacinas a partir de ovos embrionados ou cultura de células. Estas vacinas mostraram-se imunogenicamente eficaz em criança, porém, a administração parenteral mostrou-se incapaz de induzir à resistência a infecção por VPI. Outra tentativa foi a utilização do fragmento da região HN e F do VPI-3 purificada. Embora esta vacina tenham induzido níveis elevados de anticorpos em roedores, mas não apresentaram a mesma eficácia em primatas, e esta vacina não teve sucesso (LAMBERT *et al.*, 1996).

Atualmente, o principal foco dos grandes pesquisadores se concentra no desenvolvimento de vacinas com VPI atenuados. As primeiras tentativas foram realizadas com vírus parainfluenza bovino (BVPI-3) e vírus Sendai (SeV), mas não proporcionarem nível adequado de proteção em humanos (SATO, 2008; ZHAN *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2011)

Outra estratégia é a fusão da hemaglutinina-neuraminidase (HN) de VPI-3 com as proteínas recombinantes MVA (*modified virus Ankara*), que foram gerados para testes pré-clínicos em modelos animais. No modelo de rato, o MVA recombinante induziram níveis elevados de anticorpos específicos para os VPI após imunização através de aplicação intramuscular e intranasal. Após o desafio, o MVA-HN reduziu substancialmente a carga viral do VPI a nível pulmonar. Quando utilizado em macacos rhesus as vacinas recombinantes MVA também induziu proteção contra os VPI (ALTENBURG *et al.*, 2014).

Atualmente, o desenvolvimento e caracterização das cepas atenuadas têm sido facilitados pelo desenvolvimento da engenharia genética, que pode criar um painel de mutações e atenuação de um fenótipo a ser incorporados como candidatos a desenvolvimento de vacinas. Outra estratégia interessante é a transferência e substituição de aminoácidos atenuados do vírus de RNA para um vírus de DNA por mutagênese direta (KARRON; COLLINS, 2013).

Com relação ao tratamento dos VPI, não existe droga específica, apenas tratamento paliativo dos sintomas clínicos, para minimizar o risco de complicação e hospitalização principalmente nos pacientes transplantados (HENRICKSON, 2003).

Algumas drogas antivirais incluindo ribavirina com atividade *in vitro* contra os VPI, mas sua eficácia *in vivo* não foi boa (COTUGNO *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2013). Vários outras tentativas com ribavirina, inibidores de protease e interferons vem sendo

estudados *in vitro* e em modelos animais, mas sem sucesso (HALL, 2001).

Uma grande promessa para o futuro são os inibidores de neuraminidase BCX2798 e BCX2855 responsável pelo bloqueio de HN na ligação ao receptor celular (receptor de ácido siálico), quanto na ativação da proteína F e remoção das partículas virais recém-liberadas das células infectadas (ALYMOVA *et al.*, 2009; WATANABE *et al.*, 2009).

### **2.7.9. Justificativa do estudo**

Este estudo busca trazer informações sobre aspectos clínicos e epidemiológicos dos VPI inclusive o VPI-4 em casos de pneumonias infantis em que este vírus são detectados, uma vez que não há estudos brasileiros analisando especificamente as características destes quatro tipos virais. Com a implantação de técnicas de Biologia Molecular no Laboratório de Virologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, pretende-se analisar a participação destes vírus nas pneumonias infantis em crianças atendidas no Hospital infantil Albert Sabin assim como analisar seus aspectos clínicos e epidemiológicos.

## **3. HIPÓTESES**

- ✓ As pneumonias nas quais foram detectados os VPI apresentam características epidemiológicas semelhantes às causadas por outros vírus respiratórios (VSR adenovírus e influenza).
- ✓ Os VPI-3 e VPI-4 nesta ordem apresentam frequência de circulação superior a de VPI-1 e VPI-2.
- ✓ O VPI-4 apresenta as mesmas características de sazonalidade encontradas para os outros VPI em estudos já publicados.

## **4. OBJETIVOS DO ESTUDO**

### **4.1. Objetivo geral**

Descrever o perfil epidemiológico e clínico das pneumonias causadas pelos quatro tipos de VPI na população de estudo.

### **4.2. Objetivos específicos**

- ✓ Comparar a taxa de detecção dos VPI com outros vírus respiratórios já estudados em Fortaleza (vírus sincicial respiratório, influenza e adenovírus).
- ✓ Descrever os aspectos epidemiológicos e clínicos das pneumonias positivas exclusivamente para cada um dos quatro tipos de VPI.
- ✓ Descrever a taxa de detecção dos quatro tipos de VPI nos casos de pneumonias infantis estudadas.
- ✓ Comparar a sazonalidade dos diferentes tipos de VPI à de vírus com sazonalidade já conhecida na cidade de Fortaleza.

## **5.0. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Descrição de estudo**

#### **5.1.1. Local de estudo**

O estudo foi realizado na cidade Fortaleza-Ceará, localizada no litoral do estado, a uma altitude média de 21 metros. A cidade de Fortaleza apresenta um clima tropical, com temperatura média anual de 27°C, umidade relativa média do ar de 77%, possui uma população de 2.591,188 de habitantes e uma área de 148.886,308 km<sup>2</sup>, de acordo com os dados do censo populacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Censo 2014).

#### **5.1.2. Tipo de estudo**

Este estudo tem caráter retrospectivo, observacional e descritivo.

#### **5.1.3. Dados de pluviometria**

A média mensal do índice pluviométrico na cidade de Fortaleza-CE foi obtida através da Fundação Cearense de Meteorologia (FUNCEME).

#### **5.1.4. Questões éticas**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) registro nº CEP 024/2013 (Apêndice 2).

#### **5.1.5. Banco de dados**

Para comparação das características epidemiológicas dos VPI detectados neste estudo as dos vírus detectados anteriormente pela IFI, foi revisado o banco de dados de todos os pacientes incluídos no estudo, existente no Laboratório de Virologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. Neste banco constam todas as informações dos questionários preenchidos para cada paciente incluso na vigilância de viroses respiratórias realizada pelo laboratório acima mencionado (Apêndices 3 e 4) obtidas após assinatura do termo de consentimento Livre e Esclarecido pelo responsável pela criança (Apêndice 1).

### **5.1.6 População de estudo**

Pacientes com idade entre 0 a 5 anos, de ambos os sexos, que apresentam pneumonia diagnosticada pelo médico. A definição da pneumonia adquirida na comunidade (PAC) foi de acordo com Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (2007) que inclui a presença de sintomas e sinais como tosse, febre, taquipnéia, além de uma ausculta pulmonar com a presença de roncos ou estertores (podendo variar de acordo com o padrão anatômico e a extensão da pneumonia) somados aos achados de condensação ou infiltrado intersticial ao raio-x de tórax (J. Bras. Pneumol. 2007; 33 (Supl 1):S 31-S 50).

### **5.1.7. Amostras clínicas**

Foram utilizadas neste estudo amostras do Serviço de Vigilância de Vírus Respiratórios do Laboratório de Virologia do Departamento de Patologia Legal da Universidade Federal do Ceará coletadas no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2014. Todas as amostras incluídas no estudo foram submetidas anteriormente à imunofluorescência indireta para pesquisa de vírus sincicial respiratório, adenovírus, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3 no mesmo dia em que foram coletadas, conforme descrito previamente (MOURA *et al.*, 2009). Estas amostras foram submetidas neste estudo a extração de RNA viral, seguida de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase para detecção dos quatro tipos de VPI e subtipagem dos VPI-4 detectados conforme descrito detalhadamente a seguir.

## **5.2. Diagnóstico Molecular**

### **5.2.1. Extração do material genético viral**

A extração do material genético viral (RNA viral) de todas as amostras foi realizada utilizando-se o kit “AxyPrep™ Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit” (AXIGEN BIOTECHNOLOGY, Califórnia, USA), conforme as instruções do fabricante. Ao final da extração, foram obtidos 50 µL de RNA. Nesta etapa foi adicionado um inibidor de RNase, (RNA OUT da Applied Biosystems) na concentração de 1U/µL.

### 5.2.2. Reação de transcrição reversa

Nesta etapa, foi utilizado o *High Capacity* cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Califórnia, USA) para obtenção do cDNA dos VPI- 1, 2, 3 e 4. A reação é constituída da mistura de: 2  $\mu\text{L}$  de 10 X RT *buffer* com  $\text{MgCl}_2$  a 1,5 mM; 0,8  $\mu\text{L}$  de 25 X dNTP a 100 mM; 2  $\mu\text{L}$  de 10 X RT *Random primers*; 1  $\mu\text{L}$  de MultiScribe™ Reverse Transcriptase; 3,2  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura; e 10  $\mu\text{L}$  do RNA extraído, resultando ao final do processo em 20  $\mu\text{L}$  de cDNA. Todas as reações desta etapa e as de amplificação foram realizadas em termociclador MultiGene™ Labnet. A programação das ciclagens foi de acordo com o protocolo do kit utilizado: 25°C por 10 minutos; 37°C por 120 minutos; 85°C por 5 minutos; e a 4°C por tempo indefinido. O produto (cDNA) foi armazenado em freezer a -80°C, até o momento do uso.

### 5.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para os VPI-1, 2, 3 e 4

As reações de amplificação foram realizadas separadamente. Os *primers* utilizados para os diversos VPI pesquisados neste estudo foram descritos anteriormente por (ECHEVARRÍA *et al.*, 1998; AGUILAR *et al.*, 2000). As sequências dos *primers* utilizados e o tamanho dos fragmentos esperados na amplificação foram apresentados na Tabela 01. Para esta reação foi feita uma mistura de reagentes contendo: 15,25  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura; 5  $\mu\text{L}$  de *buffer* com  $\text{MgCl}_2$  a 2 mM; 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP a 0,2 mM; 1,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* forward e reverse a 10 pMol; 0,25  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase a 1U/ $\mu\text{L}$  (BIOTOOLS B&M Labs, Madri, Espanha) e 4  $\mu\text{L}$  de cDNA. Obtense no final 30  $\mu\text{L}$  do amplificado. As ciclagens para os VPI-1, 2 e 3 foi de 95°C por dois minutos para desnaturação inicial; 40 ciclos de 95°C por um minuto; 54°C por um minuto e 72°C por um minuto para anelamento e extensão; 72°C por cinco minutos para a extensão final do produto amplificado (THOMAZELLI *et al.*, 2007). Para o VPI-4 foram utilizadas as ciclagens: um ciclo de 95°C por três minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por um minuto e 72°C por um minuto; seguido de um ciclo para extensão final de 72°C por cinco minutos (AGUILAR *et al.*, 2000). Em cada reação realizada para cada tipo de VPI sempre se utilizava o controle positivo e negativo dos vírus pesquisados.



#### 5.2.4. *Nested* PCR para o VPI-4

A reação do *nested* PCR foi realizada com o produto do PCR para amplificação da região de fosfoproteína (P) com aumento da temperatura em alguns ciclos. Para esta reação foi feita uma mistura de reagentes contendo: 15,25  $\mu$ L de água ultra-pura; 5  $\mu$ L de *buffer* com  $MgCl_2$  a 2 mM; 0,5  $\mu$ L de dNTP a 0,2 mM; 1,5  $\mu$ L de cada *primer* forward e reverse a 10 pMol; 0,25  $\mu$ L de Taq polimerase a 1U/  $\mu$ L (BIOTOOLS B&M Labs, Madri, Espanha) e 4  $\mu$ L do produto de PCR do VPI-4. Este processo resultou em 30  $\mu$ L do produto amplificado. As ciclagens para o VPI-4 foram de 95°C por dois minutos para desnaturação inicial; 40 ciclos de 95°C por um minuto, 58°C por um minuto e 72°C por um minuto para anelamento e extensão; 72°C por dez minutos para a extensão final do produto amplificado (AGUILAR *et al.*, 2000).

#### 5.2.5. *Nested* PCR para a subtipagem do VPI-4A e 4B

Para a subtipagem do VPI-4 (4A e 4B) foi realizada a reação do *nested* PCR com o produto obtido na etapa anterior (5.2.3) com o aumento da temperatura em alguns ciclos. Para esta reação foi feita uma mistura de reagentes contendo: 15,25  $\mu$ L de água ultra-pura; 5  $\mu$ L de *buffer* com  $MgCl_2$  a 2 mM; 0,5  $\mu$ L de dNTP a 0,2 mM; 1,5  $\mu$ L de cada *primer* forward e reverse a 10 pMol; 0,25  $\mu$ L de Taq polimerase a 1U/  $\mu$ L (BIOTOOLS B&M Labs, Madri, Espanha) e 4  $\mu$ L do produto de PCR do VPI-4. Este processo resulta em 30  $\mu$ L do amplificado. As ciclagens para a subtipagem 4A e 4B foi de: 95°C por dois minutos para desnaturação inicial; 40 ciclos de 95°C por um minuto, 58°C por um minuto e 72°C por um minuto para anelamento e extensão; 72°C por dez minutos para a extensão final do produto amplificado (AGUILAR *et al.*, 2000).

#### 5.2.6. Corrida eletroforética

Para a detecção dos produtos das reações de PCR e *nested* PCR foi realizada a eletroforese em gel de agarose (Pronadisa®, Conda™) a 1,5% em TBE *Buffer* (Invitrogen™). Utilizou-se para coloração uma solução de Blue Green Loading Day (6x) (Invitrogen™). As amostras foram submetidas à eletroforese em cuba horizontal (Digel™) durante 40 minutos a 110 volts. A visualização das bandas ocorreu em um transluminador de luz ultravioleta e a imagem foi capturada com o aparelho fotodocumentador (Vilber Lourmat)

### **5.2.7. Análise estatística**

Estudos comparativos foram realizados em duas etapas: primeira que utilizava entre grupos de pacientes positivos para o VSR, ADh, influenza, e VPI sem diferenciar os tipos de influenza e parainfluenza e a segunda que utilizou-se unicamente amostras positivas para um dos quatros tipos de VPI sem que houvesse co-deteccão viral. A comparação de dados categóricos foi realizada com aplicação do Teste de Qui-Quadrado de Pearson e do teste Exato de Fisher. Em todas as situações, o nível de significância máximo adotado para conclusões afirmativas, foi de 5%.

Tabela 1- Relação dos pares de *primers*, alvo da amplificação, seqüências e tamanho dos fragmentos utilizados no estudo.

Vírus	<i>Primers</i>	Gene	Polaridade	Seqüências	Fragmento amplificado (pb)	Referência
VPI-1	HPIV-F1	HN	Positiva	CCGGTAATTTCTCATACCTATG	317	Echevarria <i>et al.</i> , 1998
	HPIV-R1		Negativa	CCTTGGAGCGGAGTTGTTAAG		
VPI-2	HPIV-F1	HN	Positiva	CCATTTACCYAAGTGATGGAAT	203	Echevarria <i>et al.</i> , 1998
	HPIV-R1		Negativa	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA		
VPI-3	HPIV-F1	HN	Positiva	ACTCCCAAAGTTGATGAAAAGAT	102	Echevarria <i>et al.</i> , 1998
	HPIV-R1		Negativa	TAAATCTTGTTGTTGAGATTGA		
VPI-4	PIP4+	P	Positiva	CTGAACGGTTGCATTCAGGT	433-452	Aguilar <i>et al.</i> , 2000
	PIP4-		Negativa	AGGACTCATTCTTGATGCAA		
VPI-4	PIS41	P	Positiva	AAAGAATTAGGTGCAACCAG	245	Aguilar <i>et al.</i> , 2000
	PIS42		Negativa	GTGTCTGATCCCATAAGCAGC		
VPI-4A	PIS4A	P	Positivo	ATGATGGTGGAACCAAGATT	178	Aguilar <i>et al.</i> , 2000
	PIS42		Negativo	GTGTCTGATCCCATAAGCAGC		
VPI-4B	PIS4B	P	Positivo	AACCAGGGAAACAGAGCTC	84	Aguilar <i>et al.</i> , 2000
	PIS42		Negativo	GTGTCTGATCCCATAAGCAGC		

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Características da população de estudo

Um total de 542 crianças atendidas no HIAS com diagnóstico de pneumonia foi incluído no estudo. A distribuição desta população nos dois anos de estudo foi de 259 crianças (47,79%) em 2013 e 283 (52,21%) em 2014.

Características da população de estudo quanto ao gênero, idade e setor de atendimento são apresentadas na Tabela-2.

TABELA 2- Características da população de estudo.

Características	Número	Percentual
<b><u>Gênero</u></b>		
Masculino	316	58,30%
Feminino	226	41,70%
Total	542	100,00%
<b><u>Idade (Meses)</u></b>		
0 -12	353	65,13%
13- 24	96	17,71%
25 - 36	39	7,20%
37 - 48	35	6,45%
49 - 60	19	3,51%
Total	542	100,00%
<b><u>Setor de atendimento</u></b>		
Emergência	122	22,50%
Enfermaria	361	66,61%
Reanimação/ UTI	59	10,89%
Total	<b>542</b>	<b>100,00%</b>

Apesar de predominarem no estudo crianças do sexo masculino e aquelas com menos de 12 meses de idade, em nenhuma destas características analisadas a diferença observada apresentou uma significância estatística. Com relação ao observado neste estudo, o aumento no número de crianças com pneumonia foi inversamente proporcional ao número de anos vividos pelas crianças, com apenas 19 estando no seu quinto ano de vida.

Uma parcela das crianças do estudo foi atendida em enfermaria do HIAS. As pneumonias de maior gravidade, isto é, aquelas nas quais as crianças foram atendidas no setor de reanimação e UTI, no momento em que a coleta e o questionário foram realizados corresponderam a 10,89% do total.

A maioria das crianças incluídas no estudo apresentou algum fator de risco dentre os estudados para a pneumonia (64,5%), conforme pode ser visualizado na Tabela-3.

A apresentação de dois ou mais fatores de risco foi mais frequente (21,22%; 115/542) que o achado isolado de algum destes fatores. A presença de IRA no domicílio do paciente (19,93%; 108/542) e fumo passivo (9,41%; 51/542) foram os fatores de risco mais encontrados isoladamente. A presença de IRA no domicílio do paciente foi também o fator de risco mais citado nos casos em que houve a associação de fatores de risco.

TABELA 3- Ausência ou presença de fatores de risco na população de estudo.

<b>Fator de risco</b>	<b>Número</b>	<b>Percentual</b>
Ausente	192	35,42%
IRA em domicílio	108	19,93%
Fumo passivo (fumante em casa)	51	9,41%
Não foi amamentado	41	7,56%
Frequenta creche/escola	18	3,32%
Prematuridade	17	3,14%
IRA em domicílio e fumante em casa	50	9,23%
IRA em domicílio e não foi amamentado	23	4,24%
IRA em domicílio e prematuridade	11	2,03%
Prematuridade e não foi amamentado	6	1,11%
IRA em domicílio e frequente creche/escola	4	0,74%
Fumante em casa e prematuridade	2	0,37%
Fumante em casa e não foi amamentado	2	0,37%
IRA em domicílio, frequente creche/escola e não foi amamentado	6	1,11%
IRA em domicílio, frequente creche/escola e fumante em casa	5	0,92%
IRA em domicílio, não foi amamentado e prematuridade	3	0,55%
IRA em domicílio, fumante em casa e prematuridade	3	0,55%
<b>Total</b>	<b>542</b>	<b>100,00%</b>

Crianças previamente saudáveis representaram a maioria da população de estudo (73,62%; 399/542). Entre as co-morbidades referidas, a cardiopatia foi a predominante (11,45%; 62/542), seguida de doença neurológica (5,90%; 32/542). Pacientes que apresentavam a associação de co-morbidades constituíram aproximadamente 3% da população de estudo, sendo novamente a cardiopatia a mais frequentemente relatada nestas associações. A Tabela-4 mostra as co-morbidades encontradas na população de estudo.

TABELA 4- Co-morbidades na população de estudo.

<b>Co-morbidade</b>	<b>Número</b>	<b>Percentual</b>
Ausente	399	73,63%
Cardiopatia	62	11,45%
Neuropatia	32	5,90%
Asma	14	2,58%
Refluxo gastroesofágico	10	1,85%
Pneumopatia	5	0,92%
Imunossupressão	4	0,74%
Cardiopatia e neuropatia	9	1,66%
Cardiopatia e refluxo gastroesofágico	2	0,37%
Cardiopatia e pneumopatia	1	0,18%
Cardiopatia e asma	1	0,18%
Pneumopatia e refluxo gastroesofágico	1	0,18%
Neuropatia e refluxo gastroesofágico	1	0,18%
Cardiopatia, neuropatia e refluxo gastroesofágico	1	0,18%
<b>Total</b>	<b>542</b>	<b>100,00%</b>

Na Figura-5 são apresentados os sinais e sintomas referidos pelos responsáveis pelas crianças incluídas no estudo durante a realização do questionário.

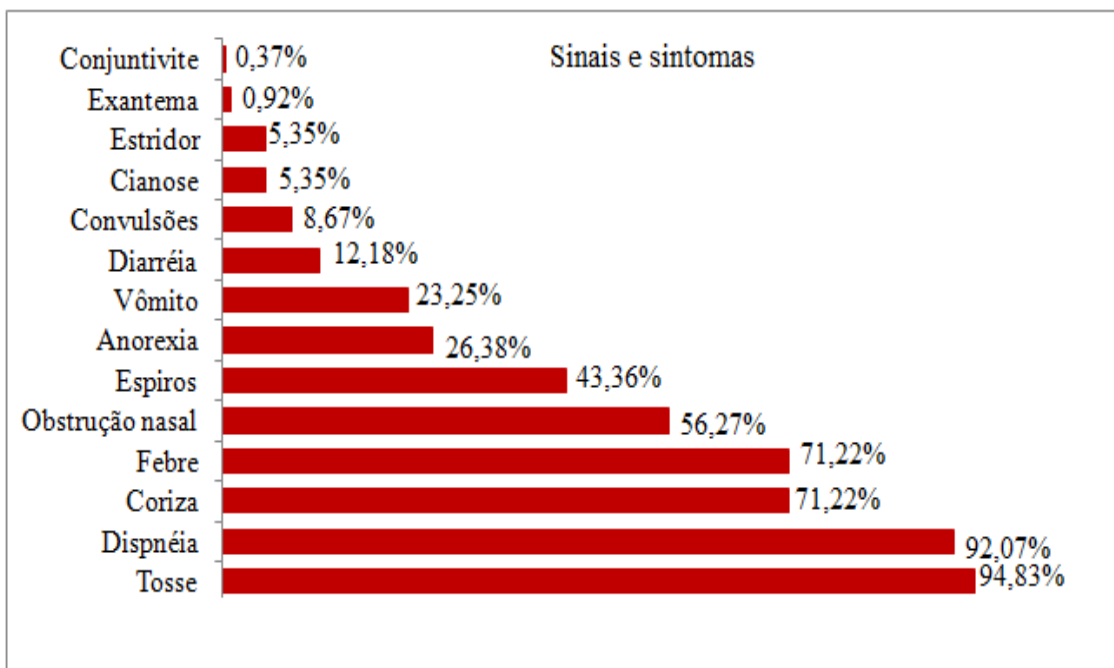


Figura 5- Sinais e sintomas apresentados pela população de estudo.

A associação de vários sinais e sintomas é comum nas IRAs e foi observado na totalidade dos casos de pneumonia do estudo. Destes, a tosse (94,83%), dispnéia (92,07%), febre (71,22%) e coriza (71,22%) foram os sintomas e/ou sinais mais frequentes apresentados pela população.

Manifestações gastrointestinais foram frequentes na apresentação da pneumonia, sendo mais encontrado a anorexia (26,38%), vômito (23,25%) e diarréia (12,18%).

## 6.2 Alterações ao raio-x do tórax

Na análise das imagens apresentadas pelos pacientes ao raio-x de tórax, as alterações mais observadas foram condensação e infiltrado intersticial que totalizaram aproximadamente (86%, 240/278) e (82%, 219/264) dos pacientes com pneumonia negativos para os vírus pesquisados e positivos para o vírus sincicial respiratória, adenovírus, influenza (A/B) e VPI (1, 2, 3 e 4) simultaneamente. Na tabela-5 são apresentados os resultados do exame radiológico de tórax dos pacientes incluídos no estudo. Observe-se que não foi realizada a radiografia torácica para 24 dos pacientes incluídos no estudo. Estes casos ocorreram em dias em que a máquina de radiografia estava indisponível.

TABELA 5- Achados da radiografia de tórax dos pacientes incluídos no estudo positivos ou negativos para algum dos vírus pesquisados por imunofluorescência ou RT-PCR.

<b>Achados radiológicos</b>	<b>PNM positivos</b>	<b>PNM negativos</b>
Condensação	113(40,65)	90(34,09)
Infiltrado intersticial	127(45,68)	129(48,86)
Derrame pleural	7(2,52)	7(2,65)
Não realizada	13(4,68)	11(4,17)
Dois ou mais achados radiológicos	18(6,47)	27(10,23)
<b>Total</b>	<b>278</b>	<b>264</b>



### 6.3. Distribuição mensal das pneumonias e vírus detectados

Dos 542 casos de pneumonias analisados, 365 (67,34%) foram positivos para pelo menos um dos vírus pesquisados, sendo detectados 165 VPI (45,20%), 136 VSR (37,26%), 34 ADh (9,31%) e 30 vírus influenza (8,21%). Os 165 VPI detectados foram distribuídos entre 85 VPI-3 (51,51%), 42 VPI-4 (25,45%), 34 VPI-1(20,60%) e 4 VPI-2 (2,42%). A IFI detectou 10 VPI-1 e 23 VPI-3. A PCR confirmou os resultados da IFI. Todos os VPI-4 e VPI-2 foram detectados somente pela PCR, enquanto que 71% e 73% dos VPI-1 e VPI-3 foram exclusivamente detectados por esta técnica, respectivamente. Dois picos de pneumonia ocorreram em 2013, o primeiro associado ao início da estação chuvosa, nos meses de fevereiro e março, e um segundo menor, no mês de outubro na estação seca. Em 2014, ocorreram dois picos de pneumonias, sendo o primeiro observado de abril a maio, no final da estação chuvosa iniciada em janeiro e que se estendeu até maio. Nos meses de setembro e outubro de 2014 ocorreu o segundo pico de pneumonias deste ano. Com relação ao período de circulação dos diferentes vírus pesquisados na população de estudo, o VSR, o vírus influenza e o VPI-4 apresentaram associação ao período chuvoso ( $P < 0,0001$ ) enquanto que o VPI-3 apresentou associação ao período seco. O adenovírus não apresentou nenhuma relação com a estação chuvosa ou seca, podendo circular em qualquer período do ano.

A Figura-6 apresenta a distribuição mensal de pneumonias, dos vírus detectados e do volume de chuvas durante o período de estudo.

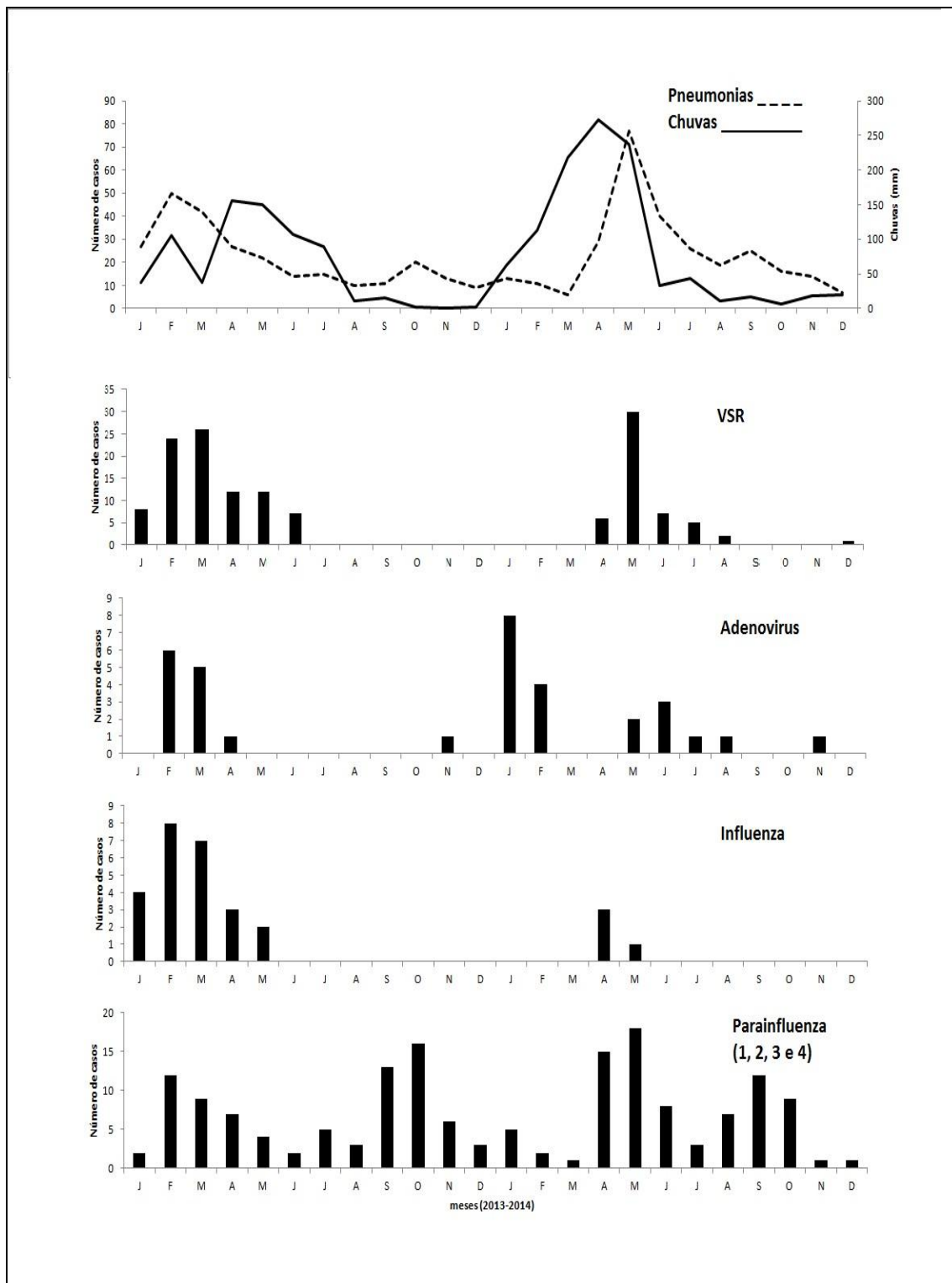


Figura 6- Distribuição mensal do total de pneumonias, dos vírus pesquisados e dos índices pluviométricos durante o período de estudo.

#### 6.4 As co-deteccões virais

Um total de 47 (28,48%, 47/165) co-infecções foram detectadas, somando-se os casos pesquisados pela IFI e pela RT-PCR. Destas co-infecções 43 (91,49%) envolviam dois vírus e quatro delas envolviam três vírus, como é apresentado na tabela-5. Dos VPI, o VPI-4 foi o mais detectado nas co-infecções (52,38%, 22/42), apesar de ser apenas o segundo VPI em número de deteccões, após o VPI-3. O vírus ao qual o VPI-4 mais se associou foi o VSR (25,53%). As co-ífeccões pelo VPI-4 representaram (46,81%, 22/47) das infeccões onde este vírus foi detectado, sendo a maioria em associação a um único vírus (42,55%, 20/47) e o restante a dois outros vírus. As várias co-infecções detectadas no estudo são apresentadas na tabela-6.

TABELA 6- Co-deteccões virais identificadas nas amostras analisadas.

<b>Co-deteccões</b>	<b>Número</b>	<b>Percentual (%)</b>
VRS + VPI-4	12	25,53
VSR + VPI-3	6	12,77
VSR + VPI-1	6	12,77
FLU + VPI-4	3	6,38
FLU + VPI-3	2	4,25
VPI-1 + VPI-3	7	14,89
VPI-3 + VPI-4	2	4,25
VPI-1 + VPI-4	2	4,25
VPI-1 + VPI-2	1	2,13
ADH + VPI-2	1	2,13
ADH + VPI-4	1	2,13
VSR + FLU + VPI-1	1	2,13
VSR + ADH + VPI-1	1	2,13
ADH + FLU + VPI-4	1	2,13
VPI-1 + VPI-3 + VPI-4	1	2,13
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>100,00%</b>

VSR: vírus sincicial respiratório; ADh: adenovírus; VPI: vírus parainfluenza (1, 2, 3 e 4); FLU: vírus influenza (A e B).

## 6.5 Características relacionadas aos vírus detectados nas amostras analisadas

Dos vírus detectados nas amostras analisadas, o VSR e os VPI foram detectados com predominância estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) em crianças nos seus primeiros doze meses de vida. Não foi observada diferença na detecção dos demais vírus nas outras faixas etárias.

O VSR e VPI foram detectados com predominância estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) em pacientes atendidos na enfermaria quando comparado aos adenovírus e vírus influenza. De todos os vírus pesquisados o VSR foi o único que mostrou uma relação estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) com o atendimento de crianças nos setores de reanimação/UTI, o que de certo modo revela um maior grau de gravidade das pneumonias associado a este vírus. Não houve qualquer associação estatisticamente significativa quando se comparou os demais vírus com os locais de atendimentos.

Dentre os sintomas apresentados pelos pacientes com pneumonias verificou-se que a febre, a coriza e anorexia associaram-se com significância estatística ( $P < 0,0001$ ) a pacientes infectados pelos VPI. A dispnéia foi associada de forma estatisticamente significativa aos VSR e VPI ( $P < 0,0001$ ). Nenhuma outra associação foi significativa para os demais sintomas e sinais com o vírus influenza ou ao adenovírus.

Com relação ao tratamento utilizado nas pneumonias positivas para os diferentes vírus a única associação estatisticamente significativa foi entre o uso de antitérmico nos pacientes infectados pelo VPI ( $P < 0,0001$ ).

Com relação ao período de circulação dos diferentes vírus pesquisados na população de estudo, o VSR, o vírus influenza e o VPI-4 apresentaram associação ao período chuvoso ( $P < 0,0001$ ) enquanto que o VPI-3 apresentou associação ao período seco. O adenovírus não apresentou nenhuma relação com a estação chuvosa ou seca, podendo circular em qualquer período do ano.

## 6.6 Aspectos epidemiológicos e sazonais das pneumonias positivas para cada VPI

Um total de 165 VPI foi detectado nas amostras analisadas (45,20%; 165/365), sendo 82 em 2013 e 83 em 2014. Contudo nesta secção do presente estudo serão excluídos todos os casos de co-infecção envolvendo algum VPI, para uma análise mais fidedigna das características clínicas e epidemiológicas das pneumonias associadas a cada um dos quatro tipos de VPI. Desta forma, após a exclusão das co-infecções, foram detectados 104 casos de pneumonia positivas para VPI (28,49%; 104/365). O VPI-3 foi mais detectado (64,42%; 67/104), seguido pelo VPI-4 (19,23%; 20/104), VPI-1 (14,42%; 15/104) e VPI-2 (1,92%; 2/104).

Dos 42 VPI-4 detectados no estudo 71,42% circularam em 2014, o que representa uma circulação três vezes maior deste vírus neste ano quando comparado ao ano anterior. O VPI-4 circulou em 10 meses do período de estudo, sendo que a circulação foi predominante nos primeiros semestres de cada ano. Em 2013, 75% dos VPI-4 circulantes foram detectados em amostras coletadas no primeiro semestre, principalmente associadas aos meses de fevereiro e março. Já em 2014, dos 30 VPI-4 circulantes 96,67% (29/30) circularam no primeiro semestre, marcadamente nos meses de abril e maio. A circulação deste vírus correlacionou-se com o período chuvoso na cidade Fortaleza ( $P < 0,0001$ ).

O VPI-3 foi o que circulou na maioria dos meses de estudo (22/24), sendo esta circulação predominante no segundo semestre de cada ano, marcadamente nos meses de setembro e outubro. A circulação deste vírus correlacionou-se ao período seco de cada ano ( $P < 0,0001$ ).

O VPI-1, assim como o VPI-3, circulou preferencialmente nos meses setembro e outubro de cada ano, não se correlacionando a estação chuvosa ( $P = 0,027$ ).

Devido à pequena circulação do VPI-2 não foi possível estabelecer qualquer correlação com a estação chuvosa ou seca. A figura-7 mostra a distribuição dos VPI ao longo do período de estudo.

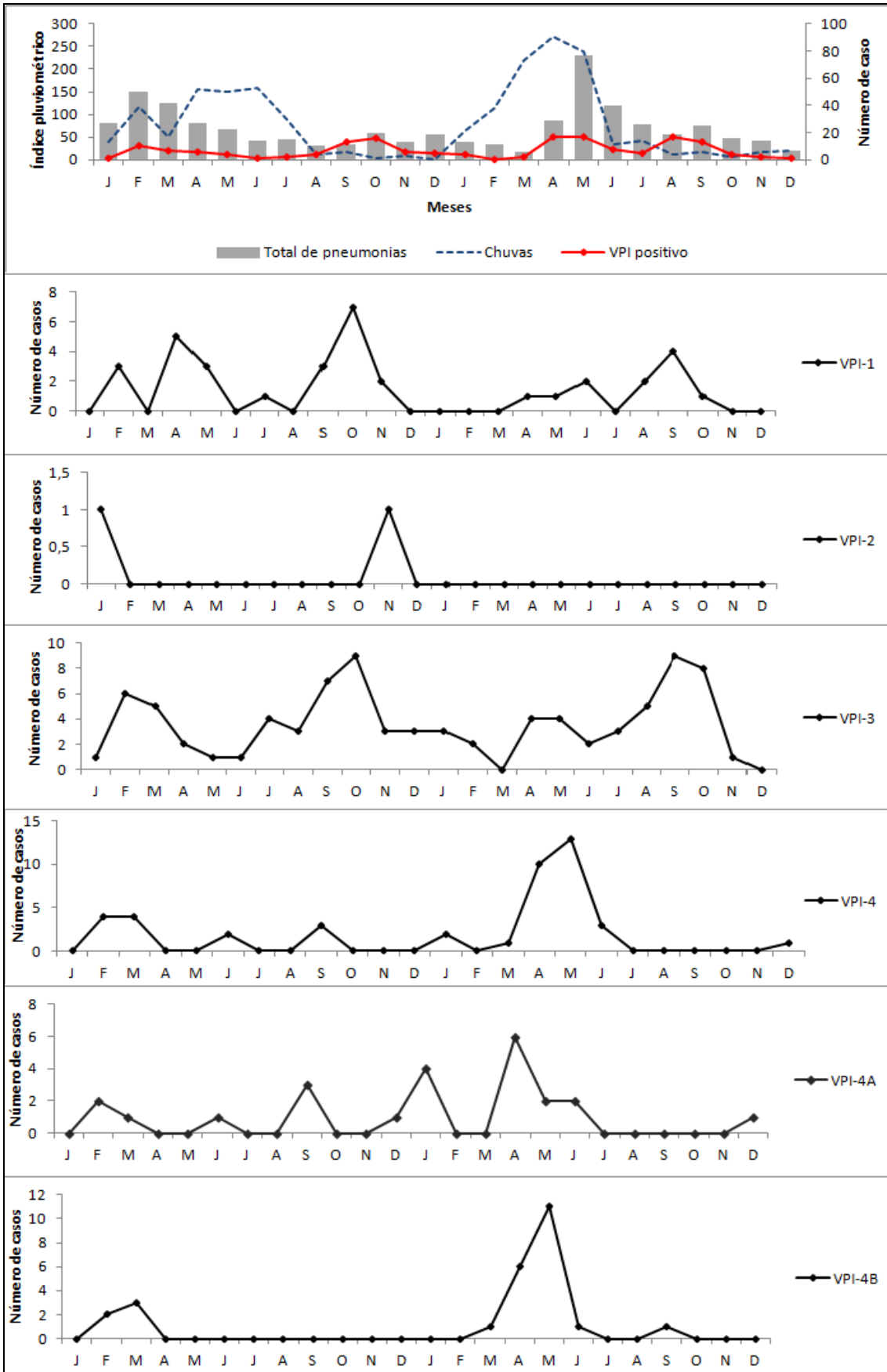


Figura 7- Distribuição total das pneumonias positivas para os vírus parainfluenza durante o período de estudo.

### 6.7. Características da população com pneumonias positivas para os VPI

As características da população positiva para os VPI foram analisadas quanto ao gênero, idade e setor de atendimento assim como realizado para a população total incluída no estudo. Estas características são apresentadas na Tabela-7.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando foi analisado o gênero da população de estudo em relação os quatro tipos de VPI ( $P > 0,05$ ). Crianças do gênero feminino predominaram quando a pneumonia foi associada ao VPI-1 e VPI-4, com 53% e 55%, respectivamente, contudo a predominância de crianças do gênero masculino foi observada em crianças com pneumonia positiva para VPI-3 (58%) o mais detectado entre os VPI.

Com relação à idade o VPI-3 e o VPI-4 foram observados com frequência significativamente maior em crianças na faixa etária de 0-12 meses ( $P < 0,0001$ ). Para os demais VPI não houve uma associação significativa estatisticamente com nenhuma das faixas etárias analisadas.

Com relação ao local de atendimento das crianças com infecções por VPI, embora as enfermarias tenham sido o local de atendimento predominante, observou-se uma associação significativa estatisticamente entre o VPI-3 e o atendimento em Reanimação/UTI ( $P < 0,0001$ ).

TABELA 7- Características da população pelos tipos de vírus parainfluenza detectados.

<b>Características clínicas</b>	<b>Total (n=104)</b>	<b>VPI-1 (n=15)</b>	<b>VPI-2 (n=2)</b>	<b>VPI-3 (n=67)</b>	<b>VPI-4 (n=20)</b>	<b>P-valor</b>
<b><u>Sexo</u></b>						
Masculino	58(55,77)	7(47)	1(50)	41(61,19)	9(45)	$P > 0,05$
Feminino	46(44,23)	8(53)	1(50)	26(38,81)	11(55)	$P > 0,05$
<b><u>Idade</u></b>						
0 - 12	73(70,19)	10(66,7)	2(100)	45(67,16)	16(80)	<b><math>P &lt; 0,0001</math></b>
13 - 24	17(16,35)	2(13,3)	0(0)	12(17,91)	3(15)	$P = 0,0036$
25 - 36	7(6,73)	1(6,6)	0(0)	5(7,46)	1(5)	$P = 0,0072$
37 - 48	14(13,46)	2(13,33)	0(0)	12(17,91)	0(0)	$P = 0,0072$
49 - 60	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	--
<b><u>Setor de atendimento</u></b>						
Emergência	23(22,12)	3(20)	0(0)	14(20,89)	6(30)	$P > 0,05$
Enfermaria	68(65,38)	11(73,33)	2(100)	43(64,18)	12(60)	$P = 0,0127$
Reanimação/UTI	7(6,73)	1(6,6)	0(0)	5(7,46)	1(5)	<b><math>P &lt; 0,0001</math></b>

Na Figura-8, estão listados os sinais e sintomas apresentados pelas crianças com pneumonia positiva exclusivamente para os quatro tipos de VPI. As manifestações clínicas mais frequentemente relatadas foram: a tosse (presente em 96% dos casos), a dispnéia (89,43%) e coriza (72,11%). A apresentação de tosse apresentou relação estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) para os VPI-1, VPI-3 e VPI-4. A febre e dispnéia ocorreram com significância estatística nas crianças com pneumonia positiva para o VPI-3 ( $P < 0,0001$ ).

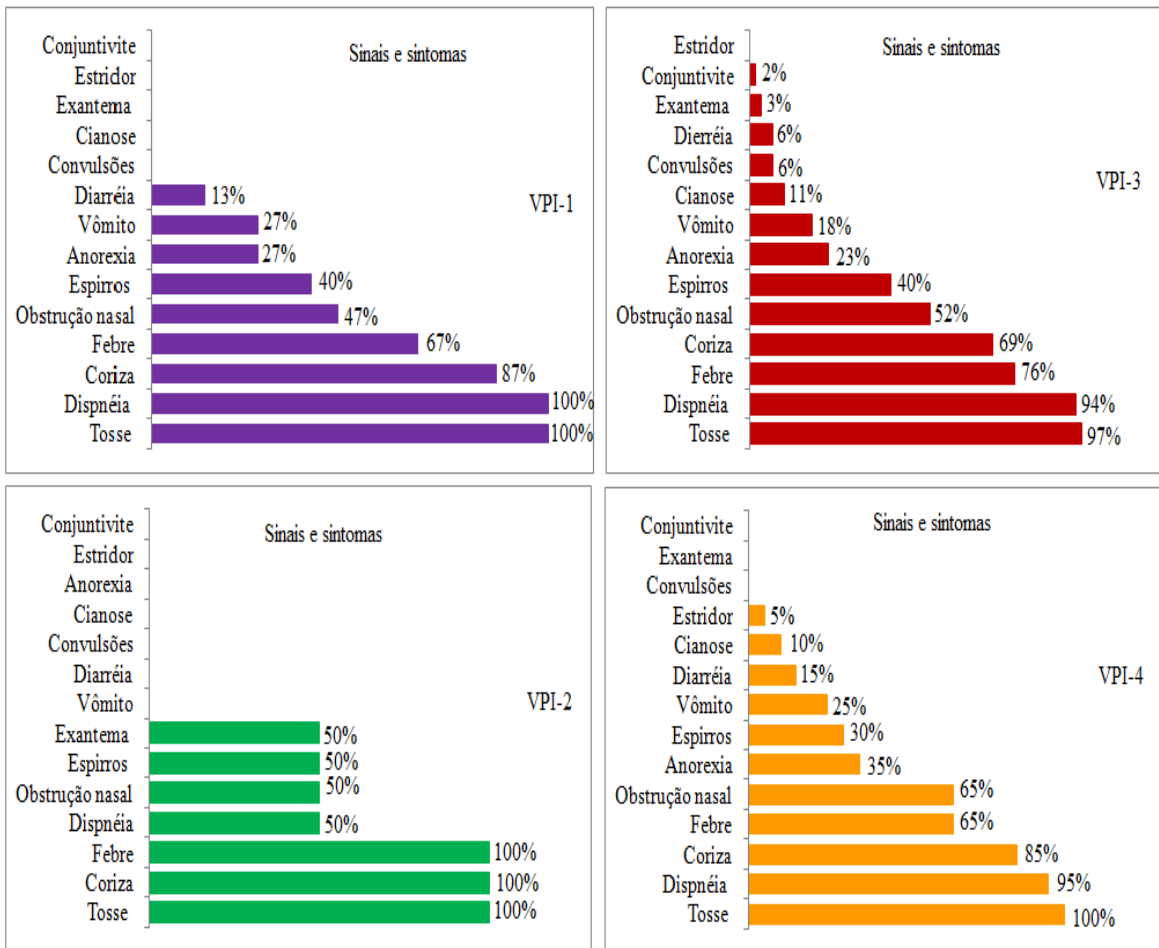


Figura 8- Sintomas e sinais apresentados pelas crianças com pneumonia positiva para os diferentes tipos de vírus parainfluenza.



A maioria das crianças infectadas pelos VPI não apresentava nenhum dos fatores de risco analisados. Não foi observada a associação de qualquer fator de risco analisada aos quatro tipos VPI. Predominaram entre os diferentes tipos de VPI os fatores de riscos isolados excetos para os VPI-4. A presença de familiar com IRA foi o fator de risco mais comumente identificado, seja isoladamente ou em associação (Tabela-8)

A maioria das crianças era previamente saudável (69,23%), contudo, as comorbidades mais observadas nas crianças com pneumonia por VPI foram a cardiopatia (11,54%) e a neuropatia (4,80%).

TABELA 8- Distribuição dos fatores de risco e co-morbidades entre as crianças positivas para os vírus parainfluenza.

<b>Características Clínicas</b>	<b>Total (n=104)</b>	<b>VPI-1 (n=15)</b>	<b>VPI-2 (n=2)</b>	<b>VPI-3 (n=67)</b>	<b>VPI-4 (n=20)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Fatores de risco</b>						
Familiar com IRA	13(12,5)	2(13,33)	0(0)	10(14,92)	1(5)	P>0,05
Fumante em casa	12(11,54)	1(6,67)	1(50)	7(10,45)	3(15)	P>0,05
Frequenta creche/ escola	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	P>0,05
Não aleitamento materno	5(4,81)	0(0)	0(0)	5(7,46)	0(0)	P>0,05
Prematuridade	8(7,69)	0(0)	0(0)	6(8,95)	2(10)	P>0,05
Dois ou mais fatores	31(29,81)	2(13,33)	1(50)	19(28,36)	9(45)	P>0,05
<b>Co-morbidade</b>						
Cardiopatia	12(11,54)	2(13,33)	0(0)	7(10,45)	3(15)	P>0,05
Pneumopatia	3(2,88)	1(6,67)	0(0)	2(2,98)	0(0)	P>0,05
Neuropatia	5(4,80)	0(0)	0(0)	4(5,97)	1(5)	P>0,05
Imunossupressão	1(0,96)	0(0)	0(0)	1(1,49)	0(0)	P>0,05
Asma	2(1,92)	0(0)	0(0)	2(2,98)	0(0)	P>0,05
Refluxo gastroesofágico	4(3,85)	0(0)	1(50)	2(2,98)	1(5)	P>0,05

Na tabela-9 são apresentados os tratamentos utilizados nas pneumonias positivas para os VPI.

O tratamento instituído para as crianças com pneumonias positivas para os diversos tipos de VPI não mostrou qualquer associação estatisticamente positiva para o uso de salbutamol, corticoide e antitérmico. Por sua vez as pneumonias positivas para o VPI-3 foram caracterizadas pela associação significativa estatisticamente ( $P < 0,0001$ ) ao uso de aerossol e o uso de antibiótico.

Tabela 9– Tratamento instituído nas pneumonias positivas para cada tipo de vírus parainfluenza.

<b>Características clínicas</b>	<b>Total (n=104)</b>	<b>VPI-1 (n=15)</b>	<b>VPI-2 (n=2)</b>	<b>VPI-3 (n=67)</b>	<b>VPI-4 (n=20)</b>	<b>P-valor</b>
<b><u>Tratamento</u></b>						
Aerossol/ salbutamol	80(76,92)	10(66,67)	1(50)	51(63)	18(90)	P=0,0003
Antitérmico	65(62,5)	11(73,33)	1(50)	39(58,21)	14(70)	P>0,05
Corticoide	45(43,27)	5(33,33)	2(100)	26(38,80)	12(60)	P>0,05
Antibiótico	86(82,69)	14(93,33)	2(100)	53(79,10)	17(85)	<b>P&lt;0,0001</b>
Ventilação mecânica	8(7,69)	1(6,7)	0(0)	7(10,44)	0(0)	--

## 7.0. DISCUSSÃO

O percentual de pneumonias virais infantis de 67,34% do presente estudo encontra-se entre os mais altos já citados. Vários fatores podem influenciar nestas taxas, dentre os quais podemos citar a técnica empregada para detecção viral, a duração do estudo além do número de vírus pesquisados. A população deste estudo foi composta por crianças com idade até cinco anos, nas quais as pneumonias geralmente causam maior impacto gerando as taxas de morbimortalidade citadas na literatura o que certamente aumenta a taxa de detecção encontrada, quando comparada às relatadas em estudos com pacientes adultos (FENG *et al.*, 2014; CROTTY *et al.*, 2015). Além desta característica, o presente estudo estendeu-se por 24 meses de coleta de amostras contínuas que foram analisadas para pesquisa dos quatro tipos de VPI por PCR após já terem sido submetidas a IFI para pesquisa de sete diferentes vírus, dentre os quais os VPI 1, 2 e 3. Todas as amostras positivas para VPI por IFI foram confirmadas pela PCR.

A utilização de um único método ou a associação de vários métodos para detecção viral pode também influenciar as taxas de detecção. Estudos que empregam unicamente métodos moleculares de detecção viral apresentam maiores taxas de detecção viral devido à maior sensibilidade destes métodos para os diversos vírus respiratórios geralmente incluídos nas pesquisas, quando comparados a estudos que utilizam métodos clássicos de detecção como o isolamento viral em cultura de células e a imunofluorescência (MARCONE *et al.*, 2015)

O terceiro fator a ter uma influência na taxa de detecção viral foi o número de vírus pesquisados. No presente estudo, as amostras já tinham sido submetidas à IFI, para os sete vírus, inclusive os VPI 1 a 3. Com o emprego do PCR para detecção exclusiva de VPI, a taxa de detecção viral aumentou consideravelmente em 60%, tornando inclusive, amostras consideradas previamente negativas em positivas.

Outro fator a ser discutido foi o tempo de realização do estudo. No presente estudo foram utilizadas amostras coletadas durante 24 meses por cinco dias consecutivos de cada semana. Neste contexto, há estudos que utilizando métodos semelhantes de detecção viral por um período inferior de tempo apresentam taxas de detecção viral inferiores, e estudos com período de execução maior com maiores taxas de detecção superiores, apesar de empregarem métodos como a imunofluorescência e o isolamento viral em cultura celular (FRY *et al.*, 2006; ELBASHA *et al.*, 2013).

Neste estudo, o VPI foi o mais detectado entre os vírus pesquisados nas amostras

analisadas, superando o VSR e o vírus influenza que têm sido considerados os vírus mais detectados em casos de pneumonias pediátricas (MATHISEN *et al.*, 2010; BERKLEY *et al.*, 2010; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2012; HAMMITT *et al.*, 2012; ESPOSITO *et al.*, 2012; ELBASHA *et al.*, 2013; QU *et al.*, 2015). Devemos, no entanto, lembrar que ao nos referir a VPI estamos englobando quatro tipos virais. Se analisarmos cada tipo individualmente, veremos que o VSR assume a liderança, sendo então seguido pelo VPI-3, VPI-4, VPI-1, adenovírus (34 casos) e influenza.

Em se tratando exclusivamente da pesquisa de vírus em pneumonias infantis, nas quais eram pesquisados os VPI-1 a 4, foram revistos seis estudos (CILLA *et al.*, 2008; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2012; HAMMITT *et al.*, 2012; ESPOSITO *et al.*, 2013; ELBASHA *et al.*, 2013; QU *et al.*, 2015). O percentual mais baixo e mais alto de detecção dos VPI nestes estudos foi de 1,8% e 16,81% (CILLA *et al.*, 2008; ESPOSITO *et al.*, 2013). A taxa de detecção de VPI encontrada no presente estudo (45,20%) foi superior às taxas encontradas em qualquer outro estudo mesmo aqueles que como nós utilizaram a PCR para detecção viral. Enquanto a coleta realizada em nosso estudo foi contínua por 24 meses, no estudo realizado na Itália, com a menor detecção de VPI a pesquisa foi realizada apenas de novembro a abril durante cinco anos. Sabe-se que em países de clima temperado, neste intervalo de meses é mais frequente a detecção de influenza e vírus sincicial respiratório (GASPARINI *et al.*, 2013; ESPOSITO *et al.*, 2015). Outro aspecto interessante é que a maioria das crianças que foram positivas para VPI em nosso estudo foram hospitalizadas enquanto que nos outros estudos revistos eram crianças atendidas na emergência ou hospitalizadas (CILLA *et al.*, 2008; ESPOSITO *et al.*, 2013). Neste aspecto poderia se sugerir que em Fortaleza, os VPI isoladamente ou em associação a outros vírus levem a um maior número de hospitalizações.

Ao se comparar o presente estudo a outro também realizado em Fortaleza sobre VPI, vemos diferenças que merecem comentários. No estudo anteriormente publicado, de seis anos de duração, a pesquisa viral era feita exclusivamente por IFI. Os VPI (1 a 3) representaram 12% dos vírus pesquisados, sendo superados pelo VSR e influenza. O VPI-3, VPI-1 e VPI-2 apresentaram taxas de detecção de 83,76%; 11,96%; 4,27%, respectivamente (FÉ *et al.*, 2008). No presente estudo com a utilização do PCR e a inclusão de mais um tipo, o VPI-4, estes vírus passaram a representar 45,20% dos vírus pesquisados, superando todos os outros vírus pesquisados anteriormente pela IFI. Quanto à ordem de frequência de detecção, o VPI-3 manteve-se a frente dos demais,

sendo seguido pelo VPI-4, VPI-1 e VPI-2. A mesma ordem de detecção dos diversos tipos de VPI foi relatada em um estudo argentino (VILLARAN *et al.*, 2014). Em um estudo americano, o VPI-1 foi por sua vez o mais detectado embora o VPI-4 tenha se mantido no segundo lugar em número de detecções (FROST *et al.*, 2014). A detecção de VPI-4 relatada neste estudo e em outros supera a de VPI-2 (AGUILLAR *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014; WEIXIAN *et al.*, 2015).

O índice de co-infecções virais observados no presente estudo (28,48%) é compatível com as taxas encontradas na maioria dos outros estudos, onde a frequência varia entre 6,1% e 39,9% (CILLA *et al.*, 2008; MATHISEN *et al.*, 2010; BEZERRA *et al.*, 2011; PRETORIUS *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2014; RHEDIN *et al.*, 2015; BERCE *et al.*, 2015). Em outro estudo brasileiro, realizado na cidade de Recife, também da região nordeste do país assim como Fortaleza foi observada a maior taxa de co-infecções virais revisadas 39,9% (BEZERRA *et al.*, 2011).

A co-infecção mais frequentemente encontrada em nosso estudo foi VSR e VPI-4. Como os períodos epidêmicos de VSR em Fortaleza costumam acontecer por cinco a seis meses é comum a co-circulação de outros vírus dentro do seu período de atividade, como já bem caracterizado para o vírus influenza (MOURA *et al.*, 2009). A detecção das co-infecções VSR+VPI-4 pode ser explicada pela ocorrência sazonal simultânea dos períodos epidêmicos destes dois vírus em Fortaleza, conforme será discutido posteriormente. A importância da detecção de dois ou mais vírus em amostras clínicas respiratórias não está claramente definida, havendo controvérsias. Um estudo americano relatou uma maior taxa de hospitalização entre as crianças com co-infecções virais (ABERLE *et al.*, 2005), embora resultados semelhantes não tenham sido observados em outros estudos (HARADA *et al.*, 2013; ARRUDA *et al.*, 2014).

Os dados obtidos neste trabalho mostram a ocorrência de dois picos de pneumonia por ano, o maior deles no primeiro semestre e um segundo de menor intensidade no segundo semestre. Em países do hemisfério sul, como o Brasil, o primeiro semestre do ano corresponde ao verão e início do outono. No entanto a ocorrência das quatro estações não é observada em todo o território brasileiro. Na cidade de Fortaleza, situada a apenas 4° ao sul da linha do equador, não há as quatro estações observadas nas regiões sudeste e sul do Brasil. Seu principal evento climático é a ocorrência de chuvas, o que resulta na apresentação de uma estação chuvosa e de uma estação seca (FÉ *et al.*, 2008). Estudos publicados sobre a sazonalidade de vírus respiratórios na cidade de Fortaleza relacionaram o VSR e influenza à estação chuvosa e

o VPI-3 e VPI-1 à estação seca (MOURA *et al.*, 2006; FÉ *et al.*, 2008; MOURA *et al.*, 2009; ALONSO *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2013).

Os resultados deste estudo confirmam os já apresentados anteriormente para a circulação dos VPI-1, 2 e 3 (FÉ *et al.*, 2008). No que se refere ao VPI-3 foi estatisticamente significativa a associação da sua circulação aos períodos secos dos meses dos segundos semestres dos dois anos de estudo. No presente estudo, o período com maior circulação do VPI-3 ocorreu nos meses de setembro e outubro. Este achado assemelha-se aos observados na primavera em regiões de clima subtropical, como Porto Alegre e São Paulo (GARDINASSI *et al.*, 2012; DE-PARIS *et al.*, 2014; PECCHINI *et al.*, 2015), e também aos vistos em região de clima temperado, como nos Estados Unidos (FRY *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014). No Nordeste brasileiro, um estudo realizado em Pernambuco, mostrou uma circulação do VPI-3 ao longo de todo ano de estudo, mas sem sazonalidade marcante (BEZERRA *et al.*, 2011). O período de maior circulação do VPI-3 em Fortaleza tinha sido nos meses de setembro a novembro conforme publicado anteriormente e confirmado neste estudo (FÉ *et al.*, 2008).

A maior circulação dos VPI-1 também ocorre no segundo semestre em Fortaleza, contudo em menor número que o do VPI-3. Estudos anteriores mostram que o VPI-1, apresenta picos bianuais ou ocorre durante anos ímpares (AGUILAR *et al.*, 2000; FRY *et al.*, 2006; WEINBERG *et al.*, 2009; HSIEH *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014). O VPI-1 pode apresentar o pico de circulação simultânea com o VPI-3. No entanto, nos anos em que a circulação do VPI-3 foi baixa, o VPI-1 pode apresentar um período de circulação mais prolongado (FRY *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014).

Neste estudo, pelo pequeno número de amostras em que o VPI-2 foi detectado, não foi possível caracterizar a sua sazonalidade. A circulação deste vírus foi detectada neste estudo apenas em 2013. A circulação do VPI-2 é bem menos compreendida que as dos outros VPI pesquisados comumente (VPI-1 e VPI-3) devido à pequena detecção deste vírus na maioria dos estudos. No entanto a circulação do VPI-2 já foi relatada em biênios, anual assim como semestrais (FRY *et al.*, 2006; WEINBERG *et al.*, 2009; HSIEH *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014). Este achado é compatível ao referido neste estudo.

O VPI-4 por sua vez, teve ocorrência diferente dos outros VPI, estando esta relacionada à estação das chuvas nos dois anos de estudo. Do total de casos de

pneumonias positivas para VPI-4, 92,86% ocorreram no primeiro semestre em associação à estação das chuvas assim como já descrito para o VSR e influenza (MOURA *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2009; ALONSO *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2013). Esta atividade mais acentuada no primeiro semestre do ano do VPI-4 foi também relatada em um estudo realizado no Gabão, país de clima tropical da África (LEKANA-DOUKI *et al.*, 2014). A atividade do VPI-4 ao longo do ano embora em maior número de casos no segundo semestre (setembro – outubro e novembro) foi relatada em dois estudos realizados nos Estados Unidos e China (LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014). No mais longo estudo no qual são pesquisados os quatro tipos de VPI, realizado nos Estados Unidos não foi possível estabelecer uma sazonalidade para o VPI-4 nos 14 anos estudados (FRY *et al.*, 2006). É importante ressaltar que neste estudo a pesquisa dos VPI foi realizada através do isolamento viral e detecção de antígenos, o que certamente, levou a uma detecção inferior à possivelmente relatada se fosse empregada uma técnica de maior sensibilidade como o PCR.

Este é o primeiro estudo brasileiro a enfatizar o papel dos quatro tipos do VPI em pneumonias infantis. Na cidade de Fortaleza já havia sido publicado um estudo sobre o papel dos VPI 1, 2 e 3 em infecções respiratórias altas e baixas, no qual tais vírus haviam sido pesquisados por IFI (FÉ *et al.*, 2008). Comparando-se o resultado de detecção dos VPI nos dois estudos observa-se um aumento da taxa de detecção dos VPI de 12,5% para 30,44%. São fatores que podem ser implicados no crescimento da taxa de detecção a utilização de um método de maior sensibilidade na detecção de vírus e a inclusão do VPI-4, detectado em 42 amostras analisadas (sendo o único vírus detectado em 20 amostras isoladas, 20 co-infecções duplas e 2 triplas). Além destes fatores, a inclusão apenas de crianças até cinco anos de idade com quadro de pneumonia pode ter colaborado para o acréscimo, visto já que no estudo anterior foram incluídas crianças de 0 a 16 anos com qualquer tipo de infecção respiratória.

Parece que dependendo da região de estudo, estação do ano e tamanho das amostras analisadas, os VPI podem apresentar uma prevalência variável. Em dois estudos realizados na China as taxas de prevalência para VPI foram de 3,7% e 5,9% (LIU *et al.*, 2013; WEIXIAN *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, os VPI foram detectados em 6,5% das 752 amostras testadas (FROST *et al.*, 2014). Em um estudo realizado em diversos países da América Central e da América do Sul a taxa de detecção dos VPI foi de 3,2% (VILLARAN *et al.*, 2014).

Na maioria dos levantamentos realizados, o VPI-3 é mais frequente detectado

seguido do VPI-1 (AGUILAR *et al.*, 2000; VEGA-BRICEÑO *et al.*, 2007; FÉ *et al.*, 2008; BERLKEY *et al.*, 2010; HSIEH *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2011; KHOR *et al.*, 2012; MIZUTA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; PECCHINI *et al.*, 2015; WEIXIAN *et al.*, 2015). O resultado desse estudo quanto à frequência de detecção do VPI-3 e VPI-4 foi semelhante ao observado em outro estudo latino-americano (VILLARAN *et al.*, 2015). No entanto, o resultado relativo à frequência de detecção dos diversos VPI do presente trabalho é divergente de um estudo realizado no Japão onde o VPI-1 (52,1%) foi o tipo mais frequente seguido pelo VPI-3 com 25,4% (YANO *et al.*, 2014). Outro estudo que mostra o VPI-1 como mais frequentemente detectado seguido pelo VPI-4 foi realizado nos Estados Unidos (FROST *et al.*, 2014). Diversos estudos tem mostrado que a frequência de detecção do VPI-4 é bem maior do que VPI-2 (AGUILAR *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014). Em alguns anos desde 2001 quando foi iniciado o sistema de vigilância de vírus respiratórios no Laboratório de Virologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará não se observa a detecção de VPI-2, a exemplo de 2014, seja empregando-se a IFI em todas as amostras coletadas (e não unicamente as de crianças com pneumonia) seja utilizando-se a PCR, como no presente estudo.

O predomínio observado de crianças do sexo masculino na população de estudo com pneumonia positiva para VPI foi relatado em outros trabalhos sobre estes vírus (AGUILAR *et al.*, 2000; VEGA-BRICEÑO *et al.*, 2007; FÉ *et al.*, 2008; BERLKEY *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2011; KHOR *et al.*, 2012; MIZUTA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014; PECCHINI *et al.*, 2015).

No estudo em questão 70,19% das crianças com pneumonia positiva para VPI estavam no seu primeiro ano de vida, o que é visto em diversos estudos (AGUILAR, 2000; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014.; WEIXIAN *et al.*, 2015). A baixa idade das crianças é considerada um fator de risco para a gravidade das infecções e a ocorrência de reinfecções (CROWE, 2003, BILLAUD *et al.*, 2006; SCHOMARKER *et al.*, 2012). A maior frequência de detecção do VPI-4 foi entre crianças no seu primeiro ano de vida (80%) um resultado que contrasta ao apresentado em um estudo latino-americano onde as infecções pelo VPI-4 nesta mesma faixa etária foram de apenas 4% (VILLARAN *et al.*, 2014). Não foi encontrado nenhum caso de infecção pelos quatro tipos de VPI em crianças com idade entre 49-60 meses, isso pode se justificar pela pouca quantidade de crianças de cinco anos de idade (19 crianças). Vários estudos, no entanto, tem mostrado que os VPI podem causar infecções nessa faixa etária assim como em adultos e idosos



(LIU *et al.*, 2013; VILLARAN *et al.*, 2014; FROST *et al.*, 2014; DIA *et al.*, 2014; WEIXIAN *et al.*, 2015).

A maioria dos pacientes positivos para os VPI foi atendida na enfermaria seguida de emergência, colaborando com a maioria dos achados na literatura (WEINBERG *et al.*, 2009; HSEIH *et al.*, 2010; O'CALLAGHAN-GORDO *et al.*, 2011; LUKŠIĆ *et al.*, 20013; LIU *et al.*, 2013). Das crianças infectadas pelo VPI-3, um número considerável apresentou pneumonia de evolução grave, uma vez que houve a necessidade de internação destas crianças em sala de reanimação ou UTI (8%) além do uso de ventilação mecânica. Apesar destes quadros mais graves, nenhuma das crianças que foi hospitalizada no HIAS com pneumonia positiva para VPI evoluiu para o óbito. Como neste estudo houve a inclusão de pacientes que foram atendidos na emergência e retornaram para suas casas ou foram transferidos para outros hospitais não foi possível saber sobre a evolução destes casos.

A maioria dos pacientes com pneumonia positiva para VPI apresentou fatores de risco para infecção respiratório (69,23%). Para o VPI mais detectado em nosso estudo, o VPI-3 a ocorrência de IRA domiciliar foi maior de 16%. Estes dados corroboram com um estudo realizado na cidade de Fortaleza-Ce que mostra que a aglomeração de pessoas por cômodo pode ter facilitado a transmissão dos VPI (FÉ *et al.*, 2008). Não apresentaram infecção pelos VPI crianças que frequentavam creche ou escola. Isso pode se justificar pelo fato que a maioria dos pacientes infectados pelos VPI tinha 12 meses de idade (70,19%). A falta de amamentação e a prematuridade foram encontradas com maior frequência em casos de infecções pelo VPI-3. A ocorrência de prematuridade em crianças infectadas por qualquer um dos quatro tipos de VPI, embora mais frequentemente associada ao VPI-1 foi relatada em um estudo (FROST *et al.*, 2014).

Embora a maioria da população deste estudo não tenha apresentado comorbidades, a cardiopatia e neuropatia foram problemas pré-existentes mais encontrados em casos de infecções pelo VPI-3. Um estudo realizado nos Estados Unidos mostra que a maioria dos pacientes infectados pelo VPI-4 apresentava quadro de doença neurológica como diagnóstico de admissão (FROST *et al.*, 2014).

Na análise dos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes, foi verificada uma associação da ocorrência de tosse e dispnéia aos VPI-1, VPI-3 e VPI-4, corroborando com estudo realizado por Frost *et al.*, 2014. Embora coriza, febre, obstrução nasal, anorexia, vômito, diarreia, conjuntivite, convulsões e exantema tenham sido frequentemente encontrados em casos de infecções pelos VPI, mas não foi verificada

nenhuma associação destes sintomas com a frequência dos VPI. Relatos na literatura mostram que esses sintomas são frequentemente encontrados em casos de infecções pelos VPI, mas sem significado estatisticamente significativo (AGUILAR *et al.*, 2000; FÉ *et al.*, 2008; LAU *et al.*, 2009; HSIEH *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013; FROST *et al.*, 2014). A manifestação do estridor é mais frequente em quadros infecciosos cujos agentes etiológicos identificados são geralmente os VPI-1 e VPI-2 (FROST *et al.*, 2014). Em nosso estudo foi encontrado apenas um caso de estridor em um paciente infectado pelo VPI-4.

A utilização de um método diagnóstico de maior sensibilidade para detecção viral foi útil na confirmação da importância dos VPI como agentes de IRA na população de estudo e apresentou resultados que ressaltam o papel destes vírus, principalmente dos VPI-3, VPI-4 e VPI-1 na etiologia de pneumonias infantis. Os resultados relacionados diretamente aos VPI-4 são dados inéditos no país e alertam para a necessidade de inclusão deste vírus nos kits de IF dada a frequência de sua detecção nos casos analisados.

## 8.0. CONCLUSÕES

- Os VPI são importantes agentes de pneumonias em crianças nos seus primeiros cinco anos de vida.
- Os tipos mais frequentemente detectados de VPI foram o VPI-3 (64,42%), VPI-4 (19,23%), VPI-1 (14,42%) e VPI-2 (1,92%).
- A PCR utilizada neste estudo confirmou todos os resultados positivos para VPI obtidos pela IFI, além de detectar mais 132 destes vírus.
- O VPI-4 apresentou padrão sazonal associado à estação das chuvas enquanto que a circulação de VPI-3 e VPI-1 esteve associada à estação seca.
- Os pacientes infectados pelos VPI-3 apresentaram associação a quadros de pneumonia de maior gravidade.

## **PERSPECTIVAS**

O presente trabalho demonstrou que vêm a somar conhecimentos a respeito dos aspectos clínicos e epidemiológicos dos VPI, principalmente o VPI-4, que até pouco tempo se desconhecia as suas características clínicas e epidemiológicas em casos de pneumonias no Brasil.

Diante deste panorama, este trabalho trouxe perspectivas acerca de pneumonias causadas pelos VPI. Novas alternativas de diagnósticos contribuirão para implantar medidas preventivas nas comunidades e nos ambientes hospitalares minimizando os riscos de transmissão viral.

Acredita-se que a divulgação e o avanço de pesquisas sobre estes vírus, incluindo o desenvolvimento de vacinas e de drogas antivirais eficazes, ajudarão a combater infecção nas populações atendidas nos serviços de saúde de referência no município de Fortaleza.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI, G.R.; PRILL, M. M.; LANGLEY, G.E.; WIKSWO, M.E.; WEINBERG, G.A.; CURNS, A.T.; SCHNEIDER, E. Estimates of parainfluenza virus-associated hospitalizations and cost among children aged less than 5 years in the United States, 1998–2010. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases*, v. 3, n. 4, p.1-7, 2014.

ABERLE, J.H.; ABERLE, S.W.; PRACHER, E. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: Impact on clinical course of disease and interferon- $\gamma$  response. *Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 24, n.7, p. 605-610, 2005.

ABIKO, C.; MIZUTA, K.; AOKI Y.; IKEDA, T.; ITAGAKI, T.; NODA, M.; KIMURA, H.; AHIKO, T. An outbreak of parainfluenza virus type 4 infections among children with acute respiratory infections during the 2011–2012 Winter Season in Yamagata, Japan. *Journal Infection Diseases*, v. 66, n. 1, p.76-78, 2013.

AGUILAR, J. C.; BRENA M. P. P.; GARCIA, M. L.; CRUZ, N.; ERDMAN, D.D.; ECHEVARRIA, J.E. Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 3, p.1191–1195, 2000.

ALMAJHDI, F.N.; ALSHAMAN, M.S.; AMER, H.M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of human parainfluenza virus type 3 isolated from Saudi Arabia. *Journal of Medical Virology*, v. 84, n. 4, p. 1304–1311, 2012.

ALONSO, W. J.; LARANJEIRA, B. J.; PEREIRA, S.A.R. P.; FLORENCIO, C.M.G.D.; MORENO, E.C.; MILLER, M.A.; GIGLIO, R.; SCHUCK-PAIM,C.; MOURA, F.E.A. Comparative dynamics, morbidity and mortality burden of pediatric viral respiratory infections in an equatorial city. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 31, n.1, p. 9-14, 2012.

ALQUEZAR-PLANAS, D.; MOURIER, T.; BRUHN, C.A.W.; HANSEN, A.J.; VITCETZ, S.N.; MØRK, S.; GORODKIN, J.; NIELSEN, H.A.; GUO, Y.; SETHURAMAN, A.; PAXINOS, E.E.; SHAN, T.; DELWART, E.L.; NIELSEN, L.P.

Discovery of a divergent HPIV4 from respiratory secretions using second and third generation metagenomic sequencing. *Scientific Reports*, v. 3, n. 2468, p.1-10, 2013.

ALTENBURG, A.F.; KREIJTZ, J.H.C.M.; VRIES, R.D.; SONG, F.; FUX R.; RIMMELZWAAN G.F.; SUTTER G.; VOLZ, A. Modified vaccinia virus ankara (MVA) as production platform for vaccines against influenza and other Viral respiratory diseases. *Journal of Viruses*, v. 6, n. 3, p. 2735-276, 2014.

ALYMOVA, I.V.; WATANABE, M.; BOYD, K.L.; CHAND, P.; BABU, S.; PERTNER, A.; CHAND, P.; BABU, Y.S.; PORTNER, A. Efficacy of the novel parainfluenza virus haemagglutinin-neuraminidase inhibitor BCX 2798 in mice further evaluation. *Antiviral Therapy*, v. 14; n. 7; p. 891–898, 2009.

AMARAL, L.M.B. Epidemiologia e Caracterização Molecular do Vírus Parainfluenza humano 1, 2 e 3 em crianças menores de cinco anos de idade atendidas no hospital universitário em 2007, São Paulo- Brasil. 2009. 29 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ANDREWES, C.H.; BANG, F.B.; BURNET, F.M.A. A short description of the *Myxovirus* group (influenza and related viruses). *Journal of Virology*, v. 1, p. 176-184, 1959.

ARRUDA, E.; JONES, M.H.; ESCREMIM, D.PF.; CHONG, D.; BUGARIN, G.; NOTARIO, G.; MATSUNO, A.K.; PITREZ, P.M.; VO, P.; SUZUKI, C.; ROSARIO, F.N.; STEIN, R.T. The burden of single virus and viral co-infections on severe lower respiratory tract infections among preterm infants: a prospective birth cohort study in Brazil. *The Pediatric Infectious Journal*, v. 3, n. 10, p. 997-1003, 2014.

AXELSSON, I.; SILFVERDAL, S.A. Pneumonia mortality among children in Brazil: a success story. *Jornal de Pediatria*, v. 87, n. 2, p. 85-87, 2011.

BEN-SHIMOL, S.; LANDAU, D.; ZILBER, S.; GREENBERG, D. Parainfluenza virus type 3 outbreak in a neonatal nursery. *Clinical Pediatric (Phila)*, v. 52, n. 9, p. 866-70, 2013.

BERCE, V.; UNUK, S.; DUH, D.; HOMŠAK, M.; VIČIČ, M. Clinical and laboratory characteristics of viral lower respiratory tract infections in preschool children. *Wien Klein Wochenschrift*, v. 6, n. 4, p. 1-8, 2015.

BERKLEY, J.A.; MUNYWOKI, P.; NGAMA, M.; KAZUNGU, S.; ABWAO, J.; BETT, A.; LASSAUNIÉRE, R.; KRESFELDER, T.; CANE, P.A.; VENTER, M.; SCOTT, J.A.G ; NOKES, J. Viral etiology of severe pneumonia among Kenyan young infants and children. *Journal of the American Medical Association*, v. 303, n. 20, p. 2051-57, 2010.

BEZERRA, P.G. M.; BRITTO, M.C.A.; CORREIA, J.B.; CARMO M.M. B.; DUARTE. A.M.; FONCECA, K. R.; HOPKINS, M.J.; CUEVAS, L.E.; MCNAMARA, P.S. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *Plos One*, v. 6, n. 4, p.1-9, 2011.

BIALASIEWICZ, S.; MCVERNON, J.; NOLAN, T.; LAMBERT, B.S.; ZHAO, G.; WANG, D.; NISSEN, M.D.; SLOOTS, T.P. Detection of a divergent parainfluenza-4 virus in an adult patient with influenza like illness using next-generation sequencing. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 275, p. 1471-2334, 2014.

BILLAUD G.; MORIN, F.; VABRET, A.; BOUCHER; A.; GILLEE, Y.; CRASSARD, N.; GALAMBRUN, C.; FERRARIS, O.; LEGRAND, L.; AYMARD, M.; LINA, B.; FREYMUTH; F.O.; THOUVENOT, D. Human parainfluenza virus type 4 infections: A report of 20 cases from 1998 to 2002. *Journal of Clinical Virology*, v. 34, n. 1, p. 48-51, 2005.

BLACK, R.E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H.L.; LAWN, J.E.; RUDAN, I.; BASSANI, D.G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C.F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: A systematic analysis. Child health epidemiology reference group of WHO and UNICEF.

*Lancet*, v. 375, p. 1969-1987, 2010.

BOONE, S.A.; GERBA, C.P. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 6, p.1687-1696, 2007.

BOOR, S.; DAWOOD, F.S.; PANDEY, B.G.; SAHA, S.; GUPTA, V.; KRISHNAN, A.; RAI, S.; SINGH, P.; ERDMAN, D.; LAL, R.B. Rates of respiratory virus-associated hospitalization in children aged < 5 years in ruralnorthern India. *The British Infection Association*, v. 1, n. 9, p.11.005, 2013.

BRYCE J.; BLACK R.E.; VICTORA, C.G, Millennium Development Goals 4 and 5: progress and challenges. *BMC Medicine*, v. 11.n. 225, p. 2-4, 2013.

CALVO, C.; GARCÍA, M.L.G; AMBRONA, P.; RICO M.; POZO F.; DEL, M. M. M.; PÉREZ-BREÑA P.; CASAS I. The burden of infections by parainfluenza virus in hospitalized children in Spain. *The Pediatric Infectious Diseases Journal*, v. 30, n. 9, p. 56-50, 2011.

CAMPBELL, A.P.; GUTHRIE, K.A.; ENGLUND, J.A.; MAGIPOULO, I. Clinical outcomes associated with respiratory virus detection before allogenic hematopoietic stem cell transplant. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, n. 2, p. 192-202, 2015.

CANCHOLA, J.; VARGOSKO A. J.; KIM, H.W.; PARROTT, R.H.; CHRISTMAS, E.; JEFFRIES, B.; CHANOCK, R.M. Antigenic variation among newly isolated strains of parainfluenza type 4 virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, n.5, p. 357–364, 1964.

CARDOZO . Risk factors for acute respiratory disease hospitalization in children under one year of age. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo; v.41, n.3, p.351-358, 2007.

CHANG A.; DUTCH R.E., Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple paths to a chi Minh City, Vietnam. *Health Effects Institute*, v.5, n.72, p.73-83, 2012.



CHANOCK, R. M.; PARROTT, R. H.; COOK, B.E.; ANDREWS, B.E.; BELL, J.A.; REICHELDERFER, T.; KAPIKIAN, A.Z.; MASTROTA, F.M.; HUEBNER, R.J. Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. *New England Journal Medical*, v. 1958; n. 258; p. 207-213, 1958.

CHENOCK, R.M. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile crup. *BMJ, British Medical Journal*, v. 104; p. 555-576, 1956.

CHIU, C.Y.; ROUSKIN, S.; KOSHY, A.; URISMAN, A.; FISCHER, K.; YAGI, S.; SCHNURR, D.; ECKBURG, P.B.; TOMPKINS, L.S.; BLACKBURN, B.G.; MERKER, J.D.; PATTERSON, B.K.; GANEM, D. Microarray detection of human parainfluenzavirus-4 infection associated with respiratory failure in an immunocompetent adult. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, n. 15, p. 71–6, 2006.

CILLA, G.; ONATE, E.; PEREZ-YARZA, E.G.; MONTES, M.; VICENTE, D.; PEREZ-TRALLERO, E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *Journal of Medical Virology*, v. 80, n. 9, p. 1843-1849, 2008.

COSTA, L. F.; YOKOSAWA, J.; MANTESE, O. C.; OLIVEIRA, T.F.; SILVEIRA, H.L.; NEPOMUCENO, L.L.; MOREIRA, L.S.; DYONISIO, G.; ROSSI, L.M.; OLIVEIR, R.C.; RIBEIRO, L.Z.; QUEIRÓZ, D.A. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 3, p. 301-306, 2006.

COTUGNO, N.; MANNO, E.C.C.; STOPPA, F.; SINIBALDI, S.; SAFFIRIO, C.; D'ARGENIO, P.; MARANO, M.; DI NARDO, M.; PALMA, P. Severe parainfluenza pneumonia in a case of transient hypogammaglobulinemia of infancy. *BMC Infectious Diseases*, v. 2, n. 3, p. 30-58, 2013.

CROWE Jr, J.E.; WILLIAMS, J.V.; Immunology of viral respiratory tract infection in infancy. *Pediatric Respiratory Reviews*, v. 4, n. 2, p. 112–119, 2003.

CROTTY, M.P.; MEYERS, S.; HAMPTON, N.; BLEDSOE, S.; RITCHIE D.J.; BULLER R, S.; STORCH, G.A.; KOLLEF, M.H.; MICEK, S.T. Impact of antibacterials on subsequent resistance and clinical outcomes in adult patients with viral pneumonia: an opportunity for stewardship. *Critical Care*, v. 19, n. 404, p. 1-11, 2015.

Diretrizes Brasileiras em Pneumonia Adquirida na Comunidade em Pediatria (PAC) - 2007. *Jornal Brasileira de Pneumonia*, v. 33, n. 1, p. 31-50, 2007.

DIA, N.; RICHARD, V.; KIORI, D.; CISSE, E.H.A.K.; SARR, F.D.; FAYE, A.; GOUDIABY,D.G.; DIOP, O.M.; NIANG, M.N. Respiratory viruses associated with patients older than 50 years presenting with ILI in Senegal, 2009 to 2011. *BMC Infectious Diseases*. v. 14, n.189, p. 3-6, 2014.

DE-PARIS, F.; BECK, C.; PIRES, M.R.; SANTOS,R.P.; KUCHENBECKER,R.S.; BARTH, A.L. Viral epidemiology of respiratory infections among children at a tertiary hospital in Southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 2, p. 223-226, 2014.

ECHEVARRÍA, J.E.; ERDMAN, D.D.; SWIERKOSZ, E.M.; HOLLOWAY, B.P.; ANDERSON, L.J. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2 and 3 from clinical samples by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 5, p. 1388-1391, 1998.

ELBASHA, N.; EL RIFAI, N.; DRAZ, I.; EL KHOLY, A.; Contribution of viruses to severe pneumonia in children. *Egyptian Pediatric Association Gazette*, v. 3, n. 61, p.73-77, 2013.

ESPOSITO, S.; DALENO, C.; PRUNOTTO, G.; SCALA, A.; TAGLIABUE, C.; BORZANI, I.; FOSSALI, E.; PELUCCHI,C.; PRINCIPI, N. Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza Journal*, v. 7, n. 1, p. 18-26, 2013.

ESPOSITO, S.; PIRALLA, A.; ZAMPIERO, A.; BIANCHINI, S.; PIETRO, G.D.; ALESSIA SCALA, A.; PINZANI, R.; FOSSALI, E.; BALDANTI,F.; PRINCIPI, N. Characteristics and their clinical relevance of respiratory syncytial virus types and

genotypes circulating in Northern Italy in five consecutive winter seasons. *Plos One*, v. 10, n. 6, 1-14, 2015.

FALSEY, A.R. Current management of parainfluenza pneumonitis in immunocompromised patients: a review. *Infection and Drug Resistance*, v. 5, p. 121-127, 2012.

FÉ, M.M.M.; MONTEIRO, A. J.; MOURA, F. E. A. Parainfluenza virus infections in a tropical city: Clinical and epidemiological aspects. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n.3, p. 192-197, 2008.

FENG, L.; LI, Z.; ZHAO, S. NAIR, H.; LAI, S.; XU, W.; LI, M.; WU, J.; REN, L.; LIU, W.; YUAN, Z.; CHEN, Y.; WANG, X.; ZHAO, Z.; ZHANG, H.; LI, F.; YE, X.; LI, S.; FEIKIN, D.; YU, H.; YANG, W. Viral etiologies of hospitalized acute lower respiratory infection patients in China, 2009-2013. *Plos One*, v. 9, n. 6, p. 99419, 2014.

FENSTERL, V.; SEN, G.C., Interferons and viral infections. *Wiley Inter Science*, v. 35, n.1, p.14-20, 2009.

FROST, H.M.; ROBINSON, C. C.; DOMINGUEZ, S.R. Epidemiology and clinical presentation of parainfluenza type 4 in children: A 3-year comparative study to parainfluenza types 1–3. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 209, n.1, p. 695 – 702, 2014.

FRY, A.M.; CURNS, A.T.; HARBOUR, K.; HUTWAGNER, L.; HOLMAN, R.C.; LARRY, A J. Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990–2004. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, n. 16, p. 1016–1022, 2006.

FUKUSHIMA, K.; TAKAHASHI, T.; TAKAGUCHI, M.; UEYAMA, H.; ITO, S.; KUREBAYASHI, Y.; KAWANISHI, T.; MCKIMM-BRESCHKIN, J.L.; TAKIMOTO, T.; MINAMI, A.; SUZUKI, T. Plaque formation assay for human parainfluenza virus type 1. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v. 34, n. 7, p. 996-1000, 2011.

GARCÍA-GARCÍA, M.L.; CALVO, C.; POZO, F. VILLADANGOS, P.A.; PÉREZ-BREÑA, P.; CASAS, I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-

acquired pneumonia. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 31, n. 8, p. 808–813, 2012.

GARDINASSI, L.G.; SIMAS, P.V.M.; SALOMÃO, J.B.; DURIGON, E.L.; TREVISAN, D.M.Z.; CORDEIRO, J.A.; LACERDA, M.N.; RAHAL, P.; SOUZA, F.P. Seasonality of viral respiratory infections in southeast of Brazil: the influence of temperature and air humidity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 1, n. 5, p. 98-108, 2012.

GARDNER, S.D. The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England and serological studies of this prevalence. *The Journal of Hygiene*, v. 67, p.545-550, 1969.

GASPARINI, R.; BONANNI, P.; AMICIZIA, D.; BELLA, A.; DONATELLI, I.; CRISTINA, M.L.; PANATTO, D.; LAI, P.L. Influenza epidemiology in Italy two years after the 2009–2010 pandemic. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v.9, n.3, p. 561- 567, 2013.

GREENHOW, T.L.; WEINTRUB, P.S. Utility of direct fluorescent antibody testing of nasopharyngeal washes in children with and without respiratory tract illness. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 25, n. 6, p. 501-505, 2006.

HALL, C.B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *New England Journal Medical*, v. 344; n. 25; p. 1917–1928, 2001.

HAMMITT, L.L.; KAZUNGU, S.; MORPETH, S.C. GIBSON, D.G.; MVERA, B.; BRENT, A.J.; MWARUMBA, S.; ONYANGO, C.O.; BETT, A.; AKECH, D.O.; MURDOCH, D.R.D.; NOKES, J.; SCOTT, J.A.G. A preliminary study of pneumonia etiology among hospitalized children in Kenya. *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, n. 2, p. 190-9, 2012.

HARDICK, J.; SADIQ, S.; PERELSTEIN, E.; PETERSON, S.; ROTHMAN, R.; GAYDOS, C.A. A case-control study evaluating RT-PCR/ESI-MS technology compared to direct fluorescent antibody and xTAG RVP PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.79, n. 4, p. 187–189, 2014.

HARADA, Y.; KINOSHITA, F.; YOSHIDA, L.M.; MINH, L.E.N.; SUZUKI, M.; MORIMOTO, K.; TOKU, Y.; TOMIMASU, K.; MORIUCHI, H.; ARIYOSHI, K. Does respiratory virus co-infection increase the clinical severity of acute respiratory infection among children infected with respiratory syncytial virus. *The Pediatric Infectious Diseases Journal*, v. 32, n. 5, p. 441-445, 2013.

HENRICKSON K.J. Parainfluenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 2, p. 242-264, 2003.

HOMAIRA, N.; LUBY, S.P.; PETRI, W.A.; VAINIONPAA, R.; RAHMAN, M.; HOSSAIN, K.; SNIDER, C.B.; RAHMAN, M.; ALAMGIR, A.S.M.; ZESMIN, F.; ALAM, M.; GURLEY, E.S.; ZAMAN, R.U.; AZIM, T.; ERDMAN, D.D.; FRY, A.D.M.; BRESEE, J.; WIDDOWSON, M.A.; HAQUE, R.; AZZIZ-BAUMGARTNER, E. Incidence of respiratory virus associated pneumonia in urban poor young children of Dhaka, Bangladesh, 2009–2011. *Plos One*, v. 7, n. 2, p. 320-356, 2012.

HONG, H.L.; HONG, S.B.; KO, G.B.; HUH, J.W.; SUNG, H.S.; DO, K.H.; KIM, S.H.; LEE, S.O.; KIM, M.N.; JEONG, J.Y.; LIM, C.M.; KIM, Y.S.; WOO, J.H.; KOH, Y.; CHOI, S.H.; Viral infection is not uncommon in adult patients with severe hospital-acquired pneumonia. *Plos One*, v. 9, n. 4, p. 958-965, 2014.

HSIEH, Y.J.; CHINA, H.; CHIU, N.C.; HUANG, F.Y. Hospitalized pediatric parainfluenza virus infections in a medical center. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, V. 43, n. 5, p. 360–365, 2010.

HUANG, C.Y.; CHANG, L.; LIU, C.C.; HUANG, Y.C.; CHANG, L.Y.; HUANG, Y.C.; CHIU, N.C.; LIN, H.C.; HO, Y.H.; CHI, H.; HUANG, L.M. Risk factors of progressive community acquired pneumonia in hospitalized children: A prospective study. *Journal of Microbiology and Immunology Infection*, v. 48, n. 3, p. 36-42, 2015.

JAIN, S.; WILLIAMS, D.J.; ARNOLD, S.R. KROW AMPOFO, M.D., ANNA M. BRAMLEY, M.P.H., REED, C.; STOCKMANN, C.; ANDERSON, E.J.; GRIJALVA, C.G.; SELF, W.H.; ZHU, Y.; PATEL, A.; HYMAS, W.; CHAPPELL, J.D.; KAUFMAN, R.A.; KAN, J.H.; DANSIE, D.; LENNY, N.; HILLYARD, D.R.; HAYNES, L.M.;

LEVINE, M.; LINDSTROM, S.; WINCHELL, J.M.; KATZ, J.M.; ERDMAN, D.; SCHNEIDER, E.; HICKS, L.A.; WUNDERINK, R.G.; EDWARDS, K.M.; PAVIA, A.T.; MCCULLERS, J.A.; FINELLI, L. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among US children. *New England Journal Medical*, v. 372, n. 9, p. 835–45, 2015.

JORNOT, L.; CORDEY, S.; CARUSO A.; GERBER, C.; VUKICEVIC, M.; TAPPAREL, C.; KAISER, L.; BURGER, D.; ROOSNEK, E.; LACROIX, J.S.; ROCHAT, T. T Lymphocytes promote the antiviral and inflammatory responses of airway epithelial cells. *Plos One*, v. 6, n. 10, p. 262-93, 2011.

JUNIOR R.B.M.; CARNEY, S.; GOLDEMBERG, D.; BONINE, L.; SPANO, L.C.; SIQUEIRA, M.; CHECON, RE. Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 6, p.716-721, 2014.

KARRON, R.A., COLLINS, P.L. Parainfluenza Viruses in Knipe DM, Howley PM 6<sup>th</sup> ed: *Fields Virology Philadelphia*, Lippincott, 2013. p. 997-1020.

KELLY, M.S.; SMIEJA, M.; LUINSTRA, K.; WIRTH, K.E.; GOLDFARB, D.M.; STEENHOFF, A.P.; ARSCOTT-MILLS, T.; CUNNINGHAM, C.K.; BOIDITSWE, S.; SETHOMO, W.; SHAH, S.S.; FINALLE, R.; FEEMSTER, K.A. Association of respiratory viruses with outcomes of severe childhood pneumonia in Botswana. *Plos One*, v. 10, n. 5, p. 1-12, 2015.

KING, A.M.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E.B. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier. 2012. Available form <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy>. Acessado em: 22.Nov. 2015.

KHOR, C.S.; SAM, I. C.; HOOI, P.S.; QUEK, K.F.; CHAN, Y.F. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC Pediatrics*, v. 12, n. 32, p. 1471-2431, 2012.

KOMADA, H.; KAWANO, M.; UEFUJI, A.; ITO, M.; TSURUDOME, M.; HATAKEYAMA, E.; NAKANISHI, M.; SAKUE, S.; JOH, C.; SUZUMURA, E.; TAMAKI, T.; TOMIOKA, T.; NISHIO, M.; TSUMURA, H.; UEMATSU, J.; YAMAMOTO, H.; O'BRIEN, M.; BANDO, H. Completion of the full-length genome sequence of human parainfluenza virus types 4A and 4B: sequence analysis of the large protein genes and gene start, intergenic and end sequences. *Journal of Virology*, v. 156, n. 3, p. 161–166, 2011.

KONDO, K.H.; BANDO, M.; TSURUDOME, M.; TSURUDOME, M.; KOMADA, H.; NISHIO, M.; ITO, Y. Sequence analysis of the phosphoprotein (P) genes of human parainfluenza type 4A and 4B viruses and RNA editing at transcript of the P genes: the number of G residues added is imprecise. *Journal of Virology*, v. 178, n. 8, p. 321–326, 1990.

KRUNIC, N.; MERANTE, F.; YAGHOUBIAN, S.; HIMSWORTH, D.; JANECKO, R. Advances in the diagnosis of respiratory tract infections: role of the Luminex xTAG respiratory viral panel. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1222, n. 0077-8923, p. 6–13, 2011.

LAMB, R.A., PARKS, G.D. Parainfluenza Viruses in Knipe DM, Howley PM 6<sup>th</sup> ed: *Fields Virology Philadelphia*, Lippincott, 2013. p. 958-964.

LAMBERT, D.M.; BARNEY, S.; LAMBERT, A.L.; GUTHRIE, K.; MEDINAS, R.; DAVIS, D.E.; BUCY, T.; ERICKSON, J.; MERUTKA, G.; PETTEWAY, S.R. JR. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93; n. 5; p. 2186–2191, 1996.

LAU, S.K.P.; TO, W.; TSE, P.W.T.; CHAN, A.K.H.; WOO, P.C.Y.; TSOI, H.W.; LEUNG, A.F.Y.; LI, K.S.M.; CHAN, P.K.S.; LIM, W.W.L.; YUNG, R.W.H.; CHAN, K.H.; Yuen, K.Y. Human parainfluenza virus type 4 outbreak and the role of diagnostic tests. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 17, p. 4515–4521, 2005.

LAU, S.K.P.; LI, K.S.M.; CHAU, K.; SO, L.Y.; LEE, R.A.; LAU, Y.L.; CHAN, K.H.; LIM, W.W.L.; WOO, P.C.Y.; YUEN, K.Y. Clinical and molecular epidemiology of human parainfluenza virus 4 infections in Hong Kong: subtype 4B as common as subtype 4A. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 18, p. 1549–1552, 2009.

LE, T. G.; NGO, L.; MEHTA, S.; DO, V.D.; THACH, T.Q.; VU, X.D.; NGUYEN, D.T.; COHEN, A. Effects of short-term exposure to air pollution on hospital admissions of young children for acute lower respiratory infections in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Research Report ( Health Effects Institute)*, v. 5, n. 72, p. 72-82, 2012.

LELAND, D.S.; GINOCCHIO, C.C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical Microbiology Review*, v. 20, n. 1, p. 49–78, 2007.

LESSLER, J.; REICH, N.G.; BROOKMEYER, R.; PERL, T.M.; NELSON, K.E.; CUMMINGS, D.A. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases*, v. 9, n. 5, p. 291-300, 2009.

LEWANDOWSKA-POLAK, A.; BRAUNCAJS, M.; PARADOWSKA, E.; JARZĘBSKA, M.; KUROWSKI, M.; MOSKWA, S.; LEŚNIKOWSKI, Z.J.; KOWALSKI, M.L. Human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) induces production of IFN  $\gamma$  and RANTES in human nasal epithelial cells (HNECs). *Journal of Inflammation*, v. 12 n. 16, p. 2-7, 2015.

LIU, L.; OZA, S.; HOGAN, D.; PERIN, J.; RUDAN, I.; LAWN, J.E.; COUSENS, S.; MATHERS, C.; BLACK, R.E. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*, v. 385, n. 393, p. 430-40, 2015.

LIU, W.K.; LIU, Q.; CHEN, D.H.; LIANG, H.X.; CHEN, X.K.; HUANG, W.B.; QIN, S.; ZI-YANG, F.; ZHOU, R. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infectious Diseases*, v. 13, n. 28, p. 2-8, 2013.

LEKANA-DOUKI, S.E.; NKOGHE, D.; DROSTEN, C.; NGOUNGOU, E.B.; DREXLER, J.F.; LEROY, E.M. Viral etiology and seasonality of influenza-like



illness in Gabon, March 2010 to June 2011. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 373, p. 2-11, 2014

LOUGHLIN, G.M.; MOSCONA, A. The cell biology of acute childhood respiratory disease: Therapeutic implications. *Pediatric Clinics of North America*, v. 53, n. 5, p. 929-959, 2006.

LUKŠIĆ, I.; KEARNS, K.P.; SCOTT, F.; RUDAN, I.; CAMPBELL, H.; NAIR, H. Viral etiology of hospitalized acute lower respiratory infections in children under 5 years of age – a systematic review and meta-analysis. *Croatian Medical Journal*, v. 54, n. 3, p. 122-34, 2013.

MANIKAM, L.; LAKHANPAUL, M., MANJULA, M.; KUMAR, L.V. Epidemiology of community acquired pneumonia. *Journal of pediatrics and child health*, v. 4, n. 3, p. 22-27, 2012.

MARCONE, D.N.; ELLIS, A.; VIDELA, C.; EKSTROM, J.; RICARTE, C.; CARBALLAL, G.; VIDAURRETA, S.M.; ECHAVARRÍA, M. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 32, n. 3, p. 105-110, 2013.

MARCONE, D.N.; DURAND, L.O.; AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; VIDAURRETA, S.; EKSTROM, J.; CARBALLAL, G.; ECHAVARRÍA, M. Incidence of viral respiratory infections in a prospective cohort of outpatient and hospitalized children aged  $\leq 5$  years and its associated cost in Buenos Aires, Argentina. *BMC Infectious Diseases*. v. 15, n. 447, p. 1-9, 2015.

MATHISEN, M.; BASNET, S.; SHARMA, A.; VALENTINER-BRANTH, P.; CHANDYO, R.K.; BASNET, S.; SHARMA, B.N.; ADHIKARI, R.K.; HVIDSTEN, D.; SHRESTHA, P.S.; SOMMERFELT, H. Respiratory viruses in young Nepalese children hospitalized with severe pneumonia. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 30, n. 12, p. 103-26, 2010.

McADAM, A.J.; RILLEY, AM. Developments in tissue culture detection of respiratory viruses. *Clinical Laboratory Medical*, v. 29, n. 4, p. 623-634, 2009.

MIZUTA, K.; ABIKO, C.; AOKI, Y.; IKEDA, T.; ITAGAKI, T.; KATSUSHIMA, F.; KATSUSHIMA, Y.; MATSUZAKI, Y.; NODA, M.; KIMURA, H.; AHIKO, T. Epidemiology of parainfluenza virus types 1, 2 and 3 infections based on virus isolation between 2002 and 2011 in Yamagata, Japan. *Microbiology and Immunology*, v. 56, n. 5 p. 855–858, 2012.

MOSCANA, A. Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *Science in medicine*, v. 115, n. 7, p. 1688-1698, 2005.

MOURA, F.E.A.; PERDIGÃO, A.C.B.; SIQUEIRA, M.M. Seasonality of influenza in the tropics: A distinct pattern in Northeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 1, p. 180-183, 2009.

MOURA, F.E.A.; BORGES, L.C.; SOUZA, L.S.F.; RIBEIRO, D.H.; SIQUEIRA, M.M.; RAMOS, E.A.G. Estudos de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). *Journal Pathology and Medicine Laboratory*, v. 38, n.4, p. 275- 282, 2006.

MOURA, F.E.A.; PERDIGÃO, A.C.B.; RIBEIRO, J.F.; FLORÊNCIO, C.M.; OLIVEIRA, F.M.; PEREIRA, S.A.; BOTOSSO, V.F.; SIQUEIRA, M.M.; THOMAZELLI, L.M.; CALDEIRA, R.N.; OLIVEIRA, D.B.; DURIGON, E.L. Respiratory syncytial virus epidemic periods in an equatorial city of Brazil. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 7, n. 2, p. 1128-35, 2013.

NAIR H.; SIMÕES, E.A.; RUDAN, I.; GESSNER, B.D.; AZZIZ-BAUMGARTNER, E.; ZHANG, J.S.; FEIKIN, D.R.; MACKENZIE, G.A.; MOĪSI, J.C.; ROCA, A.; BAGGETT, H.C.; ZAMAN, S.M.; SINGLETON, R.J.; LUCERO, M.G.; CHANDRAN, A.; GENTILE, A.; COHEN, C.; KRISHNAN, A.; BHUTTA, Z.A.; ARGUEDAS, A.; CLARA, A.W.; ANDRADE, A.L.; OPE, M.; RUVINSKY, R.O.; HORTAL, M.; MCCRACKEN, J.P.; MADHI, S.A.; BRUCE, N.; QAZI, S.A.; MORRIS, S.S.; ARIFEEN, S. WEBER, M.W.; SCOTT, J.A.; BROOKS,

W.A.; BREIMAN, R.F.; CAMPBELL, H. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *The Lancet*, v. 381, n. 9875, p. 1380–1390, 2013.

NASCIMENTO-CARVALHO, C.M.; RIBEIRO, C.T.; CARDOSO, M.R. BARRAL, A. The role of respiratory viral infections among children hospitalized for community-acquired pneumonia in a developing country. *Pediatric Infectious Diseases Journal*, v. 27, n. 41, p. 939-43, 2008.

NASCIMENTO-CARVALHO, C.M.; CARDOSO, M.R.; BARRAL, A.; ARAÚJO-NETO, C.A.; OLIVEIRA, J.R.; SOBRAL, L.S.; SAUKKORIPI, A.; PALDANIUS, M.; VAINIONPÄÄ, R.; LEINONEN, M.; RUUSKANEN, O. Seasonal patterns of viral and bacterial infections among children hospitalized with community-acquired pneumonia in a tropical region. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 42, n. 11-12, p. 839-844, 2010.

O'CALLAGHAN-GORDO, C.; BASSAT, Q.; MORAIS, L.; DÍEZ-PADRISA, N.; MACHEVO, S.; NHAMPOSSA, T.; NHALUNGO, D.; SANZ, S.; QUINTÓ, L.; ALONSO, P.L.; ROCA, A. Etiology and epidemiology of viral pneumonia among hospitalized children in rural Mozambique: a malaria endemic area with high prevalence of human immunodeficiency virus. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 30, n. 1, p. 39- 42, 2011.

OGILVIE, M.M.; VATHENEN, A.S.; RADFORD, M.; CODD, J.; KEY, S. Maternal antibody and respiratory syncytial virus infection in infancy. *Journal of Medical Virology*, v. 7, n. 5, p. 263–271, 1981.

PARK, S.Y.; BAEK, S.; LEE, S.O. HUANG, J. Efficacy of oral ribavirin in hematologic disease patients with paramyxovirus infection: analytic strategy using propensity scores. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 9, n. 3, p. 57-983, 2013.

PECCHINI, R.; BEREZIN, E.N.; SOUZA, M.C.; VAZ-DE-LIMA, L.A.; SATO, N.; SALGADO, M.; UEDA, M.; PASSOS, S.D.; RANGEL, R.; CATEBELOTAET, A. Parainfluenza virus as a cause of acute respiratory infection in hospitalized children. *The*

*Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 9, n. 4, p. 358-362, 2015.

PRETORIUS, M.A.; MADHI, S.A.; COHEN, C.; NAIDOO, D.; GROOME, M.; MOYES, J.; BUYS, A.; WALAZA, S.; DAWOOD, H.; CHHAGAN, M.; HAFFJEE, S.; KAHN, K. Respiratory viral coinfections identified by a 10-plex real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assay in patients hospitalized with severe acute respiratory illness — South Africa, 2009 – 2010. *The Journal of infectious diseases*, v. 206, n. 1, p. 159 – 65, 2012.

QU, J.X. ; GU, L.; PU, Z.H.; YU, X.M.; LIU, Y.M.; LI, R.; WANG, Y.M.; CAOL, B.; WANG, C. For Beijing Network for Adult Community-Acquired Pneumonia (BNACAP). Viral etiology of community-acquired pneumonia among adolescents and adults with mild or moderate severity and its relation to age and severity. *BMC Infectious Diseases*, 15:89, 2015 DOI 10.1186/s12879-015-0808-0.

RAY, C.G.; MINNICH, L.L. Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 25, n. 2, p. 355-357, 1987.

REN, L.; GONZALEZ, R.; XIE, Z.; XIONG, Z.; LIU, C.; XIANG, Z.; XIAO, Y.; LI, Y.; ZHOU, O.; LI, J.; YANG, Q.; ZHANG, J.; CHEN, L.; WANG, W.; VERNET, G.; PARANHOS-BACCALÀ, G.; SHEN, K.; WANG, J. Human parainfluenza virus type 4 infection in Chinese children with lower respiratory tract infections: A comparison study. *Journal of Clinical Virology*, v. 51, n. 3, p. 209–212, 2011.

RHEDIN, S.; LINDSTRAND, A.; HJELMGREN, A.; RINDER, M.R.; ÖHRMALM, L.; TOLFVENSTAM, T.; ÖRTQVIST, A.; ROTZÉN-ÖSTLUND, M.; ZWEYGBERG-WIRGART, B.; BIRGITTA HENRIQUES-NORMARK, B.; BROLIDEN, K.; NAUCLER, P. Respiratory viruses associated with community-acquired pneumonia in children: matched case–control study. *The BMJ Thorax*, v. 1, n. 93 p. 1–7, 2015.

RHEDIN, S.; LINDSTRAND, A.; ROTZÉN-ÖSTLUND, M.; TOLFVENSTAM, T.; ÖHRMALM, L.; RINDER, M.R.; ZWEYGBERG-WIRGART, B.; ÖRTQVIST, A.; HENRIQUES-NORMARK, B.; BROLIDEN, K.; NAUCLER, P. Clinical utility of

PCR for common viruses in acute respiratory illness. *The Pediatrics Journal*, v.133, n. 3, p. 538–45, 2014.

RODRIGUES, F.E.; TATTO, R.B.; VAUCHINSKI, L.; LEÃES, L.M.; RODRIGUES, M.M.; RODRIGUES, V.B.; CATHARINO, A.; CAINELLI, M.; PRATES, G.P.; CERQUEIRA, T.M.; ZHANG, L. Pneumonia mortality in Brazilian children aged 4 years and younger. *Jornal de Pediatria, (Rio J)* v. 87, n. 2, p. 111-114, 2011.

RUDAN, I.; O'BRIEN, K.L.; NAIR, H.; LIU, L.; THEODORATOU, E.; QAZI, S.; LUKŠIĆ, V.; WALKER, C.L.F.; BLACK, R.B.; CAMPBELL, H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. *Journal of global health*, v. 3, n. 1, p. 10401, 2013.

RUUSKANEN, O.; LAHTI E.; JENNINGS L.C.; MURDOCH, D.R. Viral pneumonia. *The Lancet*, v. 3, n. 77, n. 12, p. 64–75, 2011.

SATO, M.; WRIGHT, P.F.; Current status of vaccines for parainfluenza virus infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 27, n. 10, p. 123–125, 2008.

SCHMIDT, A.C.; NUTT, A.S.; BARTLETT, E.J.; SCHOMACKER, H.; BOONYARATANAKORNKIT, J.; KARRON, R.; COLLINS, P.L. Progress in the development of human parainfluenza virus vaccines. *Review of Respiratory Medicine*, v. 5, n. 4, p. 515-526, 2011.

SCHOMACKER, H.; SCHAAP-NUTT, A.; COLLINS, P.L.; SCHMIDT, A.C. Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Current Opinion in Virology*, v. 2, n. 3, p. 294-299, 2012.

SEO, S.; XIE, H.; CAMPBELL, A.P.; KUYPERS, J.M.; LEISENRING, W.M.; ENGLUND, J.A.; BOECKH, M. Parainfluenza virus lower respiratory tract disease after hematopoietic cell transplant: Viral Detection in the Lung Predicts Outcome. *Biology Blood Marrow Transplant*, v. 58, n. 10, p. 1357– 68, 2014.

SRIDHAR S, LUK HK, WOO PC. First report of severe parainfluenza virus 4B and rhinovirus C coinfection in a liver transplant recipient treated with immunoglobulin. *Journal of Clinical Virology*, v. 61, n. 4, p. 611-614, 2014.

TAKAHASHI, T.; TAKANO, M.; KUREBAYASHI, Y.; AGARIKUCHI, T.; SUZUKI, C.; FUKUSHIMA, K.; TAKAHASHI, S.; OTSUBO, T.; IKEDA, K.; MINAMI, A.; SUZUKI, T. Rapid Fluorescent Detection Assay for Human Parainfluenza Viruses. *Biology Pharmacology Bull*, v. 38, n. 8, p. 1214–1219, 2015.

THOMAZELLI, L.M.; VIEIRA, S.; LEAL, A.L.; SOUSA, T.S.; OLIVEIRA, D.B.L.; GOLONO, M.A.; GILLIO, A.E.; STWIEN, K.E.; ERDMAN, D.D.; DURIGON, E.L. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Southeast Brazil. *Jornal de Pediatria*, v. 83, n. 5, p. 422-428, 2007.

VACHON, M.; DIONNE, N.; LEBLANC, E.; MOISAN, D.; BERGERON, M.G.; BOIVINET, G. Human parainfluenza type 4 infections, Canada. *Emerging Infection Diseases*, v. 12, n. 11, p. 1755–1758, 2006.

VEGA-BRICEÑO, L.E.; PULGAR, D. B.; POTIN, M.S. FERRES, F.G.; SÁNCHEZ, I.D. Características clínicas y epidemiológicas de la infección por virus parainfluenza en niños hospitalizados. *Journal of Infections Diseases*, v. 24, n. 5, p. 377-383, 2007.

VILLARAN, M.V.; GOMEZ, J.G.J.; ARANGO, A.E.; GONZALES, G.; CHICAIZA, W.; ALEMÁN, W.; RIVERA, I.L.; SANCHEZ, F.; AGUAYO, N.; KOCHHEL, T.J.; HALSEY, E.S. Human parainfluenza virus in patients with influenza-like illness from Central and South America during 2006–2010. *The Influenza Journal*, v. 8, n. 2, p. 217–226, 2014.

WALKER, C. L.; RUDAN, I.; LIU, L.; KOCHHEL, T.J.; HALSEY, E.S.; BLACK, R.E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *The Lancet*, v. 381, n. 9875, p. 1405-1416.2013.

WANG, C.Y.T., ARDENA, K.E., GREERB, R.P.; SLOOTS, T.P.; MACKAY, I.M. A novel duplex real-time PCR for HPIV-4 detects co-circulation of both viral subtypes

among ill children during 2008. *Journal of Clinical Virology*, v. 43, n. 20, p. 451-521, 2012.

WATANABE, M.; MISHIN V.P.; BROWN, S.A.; RUSSELL, C.J.; BOYD, K.; BABU, S.; TAYLOR, G.; XIONG, X.; YAN, X.; PORTNER, A.; ALYMOVA, I.V. Effect of hemagglutinin-neuraminidase inhibitors BCX 2798 and BCX 2855 on growth and pathogenicity of Sendai/human parainfluenza type 3 chimera virus in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53; n. 9; p. 3942–3951, 2009.

WEINBERG, G. A.; HALL, C. B.; IWANE, M.K. KATHERINE A. POEHLING, K.A.; EDWARDS, K.M.; GRIFFIN, M.R.; STAAT, M.A.; CURNS, A.T.; ERDMAN, D.D.; SZILAGYI, P.G. Parainfluenza virus infection of young children: Estimates of the population-based burden of hospitalization. *The Journal of Pediatrics*, v. 9, n.154, p. 694-9, 2009.

WEIXIAN, S.; SHUJUAN, C.; CHENG, G.; TIEGANG, Z.; XIALI, Y.; AIHUA, L.; MENG, C.; MING, L.; FANG, H. Prevalence of human parainfluenza virus in patients with acute respiratory tract infections in Beijing, 2011–2014. *Influenza Other Respiratory Viruses*, 2015, doi: 10.1111/irv.12336.

WISHAUPT, J.O.; RUSSCHER, A.; SMEETS, L.C. VERSTEEGH, F.G.; HARTWIG, N.G. Clinical impact of RT-PCR for pediatric acute respiratory infections: a controlled clinical trial. *Pediatrics*, v. 128. n. 5, p. 1113–1120, 2011.

WRIGHT, P.F.; Parainfluenza viruses. In: MANDELL, G.L.; BANNETT, J.E.; DOLIN, R. (Ed.). *Principles and practice of infectious diseases*, 6. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005. P. 1998, 2003.

YANO, T.; FUKUTA, M.; MAEDA, C.; AKACHI, S.; MATSUNO, Y.; YAMADERA, M.; KOBAYASHI, A.; NAGAI, Y.; KUSUHARA, H.; KOBAYASHI, T.; AMANO, H.; NISHINAKA, T.; OCHIAI, H.; WATANABE, M.; NAKAMURA, H.; SUGA, S.; IHARA, T. Epidemiological investigation and seroprevalence of human parainfluenza virus in Mie Prefecture in Japan during 2009–2013. *Journal of Infections Diseases*, v. 67, n.2, p. 506–508, 2014.

YUSUF, S.; PIEDIMONTE, G.; AUAIS, A.; DEMMLER, G.; KRISHNAN, S.; CAESEELE, P.V.; INGLETON, R.; S.; BROOR, S.; PARVEEN, S.; AVENDANO, L.; PARRA, J.; CHAVEZ -BUENO, S.; SIERRA, T.M.; SIMOES, E.A.F.; SHAHA, S.; WELLIVER, R. The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus. *Epidemiology Infection*, v. 135, n.7, p. 1077-1090, 2007.

ZAKI, A.M.; BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T.M.; OSTERHAUS, A.D.; FOUCHIER, R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England Journal of Medicine*, v. 367, n. 19, p. 1814-20, 2012.

ZHAN, X.; SLOBO, K.S.; KRISHNAMURTHY, S.; KRISHNAMURTHY, S.; LUQUE, L.E.; TAKIMOTO, T.; BART, J.; SURMAN, S.; RUSSELL, C.; PORTNER, A.; HURWITZ, J.L. Sendai virus recombinant vaccine expressing hPIV-3 HN or F elicits protective immunity and combines with a second recombinant to prevent hPIV-1, hPIV-3 and RSV infections *Journal of Vaccine*, v. 26, n. 27-28, p. 3480–3488, 2008.



# APÊNDICES

## APÊNDICE 1

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE PNEUMONIAS INFANTIS ASSOCIADAS AOS QUATRO TIPOS DE VÍRUS PARAINFLUENZA**

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia-o atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(à) seu (sua) filho(a).

---

Eu ....., RG ....., abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a) ..... nascido (a) em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_, seja voluntário do estudo “Aspectos clínicos e epidemiológicos de pneumonias infantis associadas aos quatro tipos de vírus parainfluenza”. Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Estou ciente de que: Este estudo tem como objetivo Descrever o perfil epidemiológico e clínico das pneumonias causadas pelos quatro tipos de VPI na população de estudo.

- I) Serão feitas coletas de secreção nasal do (a) meu (minha) filho (a);
- II) Estas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o tratamento de meu (minha) filho (a); A coleta pode causar um leve desconforto, mas não prejudicará em nada meu (minha) filho (a)
- III) participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho(a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médicos a que ele(ela) estiver sendo submetido;
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;

VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;

OBS: Assinalar abaixo com (x):

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Fortaleza, ..... de ..... de 20....

Paciente /  Responsável .....

Testemunha 1 : \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

Médico Responsável: \_\_\_\_\_

Prof. Responsável pelo Projeto: \_\_\_\_\_  
Dra Fernanda Edna Araújo Moura

**APÊNDICE A- CARTA DE CONCESSÃO DO CEP/HIAS**

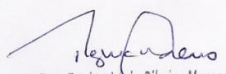
**Ao Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Infantil Albert Sabin**

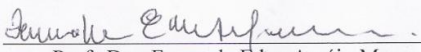
**Ilma Coordenadora**

Como é do seu conhecimento estamos realizando um trabalho sobre “Vacinação de crianças de mais de 6 meses a 2 anos nas campanhas de vacinação contra influenza: impacto dessa ação na saúde de crianças de Fortaleza” ( CAAE: 12248713.5.0000.5054 Registro 024/2013) e no TCLE para coleta das amostras de secreção respiratória não consta solicitação para uso posterior do material colhido para outras pesquisas. No momento estamos elaborando uma nova pesquisa intitulada “Infecções Respiratórias Agudas Hospitalares: Importância dos Vírus como Agentes dessas Enfermidades”. Para esta nova pesquisa precisamos usar parte desse material que será completado com uma coleta prospectiva do mesmo tipo de secreção, como já foi dito por não ter ficado explicitado este reuso das amostras no TCLE e por outro lado a quantidade de pacientes em que foram coletadas as amostras não permitir o resgate da autorização para uso das mesmas, solicito ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin a utilização de todas as amostras clínicas coletadas no projeto assim como a permissão para realização para revisão de prontuários das referidas crianças (amostras e dados de revisão de prontuários) em estudos a serem realizados pelo Laboratório de Virologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (LV-DPML-UFC).

As amostras foram coletadas respeitando as normas de pesquisa com seres humanos de acordo com a Resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde. Devido à quantidade de casos participantes torna-se inviável a busca dos responsáveis legais pelo pacientes para a obtenção de seu consentimento para participar dos futuros projetos de pesquisas sobre vírus respiratórios ou viroses respiratórias desenvolvidos no LV-DPML-UFC. Mediante esta problemática, o coordenador desse laboratório assume o compromisso de que as pesquisas a serem realizadas com as amostras e dados obtidos de prontuários solicitados não acarretarão nenhum prejuízo aos pacientes, não haverá a exposição de suas identidades e não influenciarão em seu tratamento. Além disso, os resultados obtidos dos estudos a serem realizados serão expostos somente em meios científicos preservando a privacidade dos participantes da pesquisa, além de aumentar a carga de informações geradas sobre os temas em pesquisa para profissionais de saúde e outros interessados.

Desde já agradecemos a atenção dispensada,

  
Dra. Regina Lucia Ribeiro Moren  
Coord. Comitê de Ética HIAS  
APROVADO em 12/02/14

  
Prof.ª Dra. Fernanda Edna Araújo Moura  
Coordenadora do LV-DPML-UFC

## APÊNDICE B- PARECER DE APROVAÇÃO DO PROPESQ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Infecções Respiratórias agudas hospitalares: a importância dos vírus como agente destas enfermidades

**Pesquisador:** Fernanda Edna Araújo Moura

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 27486214.2.0000.5054

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 571.477

**Data da Relatoria:** 27/03/2014

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de dissertação que tem como propósito identificar a frequência das IRA hospitalares virais em pacientes de enfermarias hematológicas. Aspirados nasofaríngeos serão coletados da população de estudo e submetidas à reação em cadeia da polimerase precedidas ou não da reação de transcrição reversa. Os vírus pesquisados serão o vírus sincicial respiratório, adenovírus, Influenza A e B, parainfluenza 1, 2, 3 e 4, metapneumovírus e os coronavírus humanos OC43, NL63, 229E e HKU-1. E dessa forma incentivar o uso de medidas de controle já conhecidas que diminuam a ocorrência de IRAH nos pacientes imunodeprimidos.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo geral:** - Conhecer a frequência, as apresentações clínicas, fatores de risco e co-morbidades e consequências das infecções hospitalares virais respiratórias na população de estudo.

**Objetivos específicos:** - Descrever a frequência dos vírus sincicial respiratório, adenovírus, Influenza A e B, parainfluenza 1, 2, 3 e 4, metapneumovírus e coronavírus 229E, OC43, NL63, HKU1, nas infecções respiratórias hospitalares; - Identificar se há ou não relação entre a circulação viral intra-hospitalar com o período epidêmico dos vírus na comunidade; - Comparar as características clínicas das infecções respiratórias hospitalares causadas pelos vírus já citados. -

Continuação do Parecer: 571.477

Descrever fatores de risco e co-morbidades relacionados à ocorrência de IRA hospitalares.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Benefício:** gerar informações pertinentes sobre a incidência dos vírus nas IRAH e as consequências destas infecções para a população estudada.

**Riscos:** será realizada a coleta de secreção nasal através de uma sonda de aspiração e os riscos de sangramento na mucosa nasal e o Incomodo da procedimento estão descritos no TCLE.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trará-se de um estudo longitudinal (retrospectivo e prospectivo realizado de julho de 2012 a setembro de 2015) e observacional em pacientes internados no Hospital Walter Cantídio submetidos à TCTH autólogo durante agosto de 2012 a setembro de 2013 que apresentaram Infecção respiratória hospitalar. E em pacientes internados no período abril de 2014 a novembro de 2015, a amostra clínica a ser coletada será o aspirado nasofaríngeo para detecção viral através de Imunofluorescência Indireta, Extração do material genético viral, Transcrição reversa e Reação em cadeia da polimerase (PCR).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados de forma adequada: folha de rosto, carta de encaminhamento ao CEP, currículo do pesquisador, cronograma, orçamento, termo de anuência dos pesquisadores, termo de concordância do responsável pelo setor de hematologia do HUWC. O TCLE foi referido.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

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

Não se aplica.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

## APÊNDICE 2: REGISTRO NO CEP/HIAS

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS**

Rua Tertuliano Sales, 544 – Vila União  
60410-790 – Fortaleza/Ce – FoneFax (85) 3101.4212 - Email: cep@hias.ce.gov.br

Fortaleza, 12 de junho de 2013

**Registro no CEP HIAS: 024/2013**

**Data da Aprovação: 12/06/2013**

**Título do Projeto:** "Inclusão das crianças na faixa etária de seis meses a dois anos nas campanhas da vacinação de influenza: impacto dessa ação na saúde de crianças de Fortaleza"

**Título Público da Pesquisa:** "Vacinação de crianças de mais de 6 meses a 2 anos de idade contra influenza: impacto dessa ação preventiva"

**CAAE:** 12248713.5.0000.5054

**Pesquisadora Responsável:** Fernanda Edna Araújo Moura

**Instituições:** UFC e HIAS

Levamos ao conhecimento de V. S<sup>a</sup>, que o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Hospital Infantil Albert Sabin – Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, acatou o parecer de aprovação Nº 262.143 do projeto supracitado emitido pelos CEP da Universidade Federal do Ceará - UFC (PROSPEQ).

A pesquisadora deverá apresentar uma cópia do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Regina Lúcia Ribeiro Moreno  
Coord<sup>a</sup>. do Comitê de Ética em Pesquisa

## APÊNDICE- 3

**ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE PNEUMONIAS INFANTIS  
ASSOCIADAS AOS QUATRO TIPOS DE VÍRUS PARAINFLUENZA**

**FICHA CLÍNICA-EPIDEMIOLÓGICA**

Responsável pela coleta: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_\_

**Dados pessoais do paciente**

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) Masc ( ) Fem

Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Idade em meses: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Procedência: ( ) Fortaleza ( ) Outra (citar): \_\_\_\_\_

Pessoa p/ contato: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

( ) Emergência ( ) Observação ( ) Ambulatório/Consultório ( ) Enfermaria Leito \_\_\_\_\_ Prontuário \_\_\_\_\_

**Histórico do paciente**

( ) Não mamou ( ) Mamou < 6 m ( ) Mamou ≥ 6 m ( ) Ainda mama

Vacinação: ( ) Influenza ( ) 2011 ( ) 2012 ( ) Não ( ) Pneumococo ( ) Não

Absenteísmo escolar: ( ) Não ( ) Sim, n° de dias: \_\_\_\_\_

Absenteísmo ao trabalho pela doença atual da criança? ( ) Não ( ) Sim, n° de dias: \_\_\_\_\_

Fator de risco: ( ) Não ( ) Prematuridade ( ) Cardiopatia ( ) Pneumopatia congênita ou crônica ( ) Asma

( ) Doença neurológica ( ) Imunossupressão ( ) Doença do refluxo gastroesofágico ( ) Fumante em casa

( ) Outras: \_\_\_\_\_

Familiar com IRA em casa: ( ) Não ( ) Sim, identificar: \_\_\_\_\_ ( )

( ) O paciente nunca cansou Idade em que cansou pela 1ª vez: \_\_\_\_\_

História de cansaço na família: ( ) Não ( ) Pai ( ) Mãe ( ) Irmão(s) ( ) Tio(s) ( ) Avó(s)

**Doença atual:** Queixa principal: \_\_\_\_\_ Tempo de início de sintomas: \_\_\_\_\_

( ) Coriza ( ) Obstrução nasal ( ) Espirros ( ) Tosse cheia ( ) Febre ( ) Anorexia ( ) Vômitos ( ) Diarreia

( ) Cansaço ( ) Exantema ( ) Conjuntivite ( ) Convulsões ( ) Estridor ( ) Cianose ( ) \_\_\_\_\_ -

**Exame físico:** Peso: \_\_\_\_\_ Temp: \_\_\_\_\_ Freq resp: \_\_\_\_\_

Estado geral: ( ) Bom ( ) Gemente ( ) Cianótico

Orofaringe: ( ) Não examinada ( ) Normal ( ) Hiperemiada ( ) Hipertrofia de amígdalas ( ) Pontos purulentos

( ) Vesículas ( ) Úlceras

Presença de tiragem: ( ) Não ( ) Intercostal ( ) supraclavicular ( ) subdiafrgâmica

Ausculta pulmonar: ( ) Não realizada ( ) Normal ( ) Sibilos ( ) Roncos ( ) Estertores ( ) Estridor

Rx de tórax: ( ) Não solicitado ( ) Normal ( ) Condensação ( ) Infiltrado intersticial ( ) Hiperinsulflação pulmonar

( ) Outros: \_\_\_\_\_

**Hipótese diagnóstica da doença atual:** \_\_\_\_\_

**Tratamento instituído pelo médico**

Paciente fez uso de medicação no hospital durante o atendimento: ( ) Não ( ) Sim

( ) Antitérmico ( ) Aerossol ( ) Salbutamol ( ) Corticoide ( ) Adrenalina ( ) Outros: \_\_\_\_\_

Medicação prescrita para casa: ( ) Não ( ) Sim

( ) Antitérmico ( ) Aerossol ( ) Corticoide ( ) Antibiótico ( ) Outra: \_\_\_\_\_

Destino do paciente: ( ) Retornou p/ casa ( ) Internamento no HIAS ( ) Encaminhamento para outro hospital, identificar o hospital: \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_



## APÊNDICE- 4

**ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DE PNEUMONIAS INFANTIS  
ASSOCIADAS AOS QUATRO TIPOS DE VÍRUS PARAINFLUENZA**

## Ficha de Paciente Hospitalizado

Responsável pela coleta \_\_\_\_\_ Data da coleta \_\_\_\_\_

**Identificação do paciente**

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Pessoa p/ contato \_\_\_\_\_ Telefone \_\_\_\_\_

Data de nascimento \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Feminino ( )  
Masculino ( )

Procedência: Fortaleza ( ) Bairro \_\_\_\_\_ Outro ( )

Prontuário \_\_\_\_\_ Leito \_\_\_\_\_ Bloco \_\_\_\_\_

Médico solicitante (nome e CRM) \_\_\_\_\_

**Histórico do paciente**Vacinação: Influenza (2011 ou 2012): ( ) sim ( ) não / Pneumococo: ( ) sim ( ) não  
( ) Não mamou ( ) Ainda mama ( ) Mamou > 6 meses ( ) Mamou < 6 meses  
Internação por problema respiratório: ( ) Não ( ) Sim N° de vezes \_\_\_\_\_

Absentéismo escolar: ( ) Não ( ) Sim N° de dias \_\_\_\_\_

Absentéismo ao trabalho por causa do internamento da criança? ( ) Não ( ) Sim  
dias: \_\_\_\_\_Acompanhante “gripado”: ( ) Não ( ) Sim Familiar com IRA? ( ) Não ( ) Sim  
Outra criança ou seu acompanhante “gripado” na mesma enfermaria? ( ) Sim ( )  
NãoFator de risco: ( ) Asma ( ) Refluxo gástrico ( ) Cardiopatia congênita ( )  
Prematuridade ( ) Pneumonia congênita ou crônica ( ) Doença neurológica  
crônica (exceto epilepsia) ( ) Imunossupressão (câncer, quimioterapia,  
imunodeficiência) ( ) Outros**Dados da internação**

Data da internação \_\_\_\_\_ Data da alta \_\_\_\_\_ Permanência hospitalar \_\_\_\_\_

Quantos dias após a internação foi solicitada a coleta \_\_\_\_\_

A Infecção Respiratória atual foi a causa da hospitalização ( ) Sim ( ) Não  
Diagnóstico de admissão \_\_\_\_\_**Descrição da Infecção Respiratória Atual** (motivo da solicitação da coleta)

Principal queixa relacionada ao quadro de IRA atual

\_\_\_\_\_  
 Início dos sintomas da IRA atual

\_\_\_\_\_  
 Impressão diagnóstica do médico solicitante ( )Quadro gripal ( )Asma ( )Bronquiolite  
 ( )Pneumonia ( )Bebê chiador Outros

\_\_\_\_\_  
 Manifestações clínicas: ( ) Coriza ( ) Obstrução nasal ( ) Espirro ( ) Tosse ( )  
 Febre ( ) Conjuntivite ( ) Dor de garganta ( ) Dor de cabeça ( ) Gemência ( )  
 Rouquidão ( ) Anorexia ( ) Vômito ( ) Diarreia ( ) Cansaço ( ) Exantema ( )  
 Conjuntivite ( ) Convulsão ( ) Cianose ( ) BAN Outros

\_\_\_\_\_  
 Frequência respiratória \_\_\_\_\_ Dispnéia no momento da coleta ( ) Não ( )  
 Sim

Tiragem ( ) Não ( ) Sim : ( ) Intercostal ( ) Supraclavicular ( )  
 Subdiafragmática

Ausculta pulmonar ( ) Não realizada ( ) Normal ( ) Roncos ( ) Sibilos ( ) Estertores

### Tratamento

( ) Aerossol ( ) Antibiótico ( ) Salbutamol ( ) Corticoide ( ) Adrenalina  
 ( ) Antitérmico ( ) Fisioterapia ( ) Cateter de O2 ( ) Máscara Oxi-Hood  
 ( ) Ventilação Mecânica

Outros: \_\_\_\_\_

### Exames Realizados

Raio-X de Tórax: ( ) Sim ( ) Não

Data	Achados radiológicos
	( ) Normal ( ) Condensação ( ) Infiltrado Intersticial ( ) Hiperinsuflação Outros _____
	( ) Normal ( ) Condensação ( ) Infiltrado Intersticial ( ) Hiperinsuflação Outros _____
	( ) Normal ( ) Condensação ( ) Infiltrado Intersticial ( ) Hiperinsuflação Outros _____
	( ) Normal ( ) Condensação ( ) Infiltrado Intersticial ( ) Hiperinsuflação Outros _____



# ANEXOS

## ANEXO A: ARTIGO SUBMETIDO PARA A PUBLICAÇÃO

Parainfluenza virus type 4 in children

Parainfluenza virus type 4 and respiratory infections in children living in Northeast Brazil

Fernanda Edna Araújo Moura <sup>\*/1,2</sup>, Crister José Ocadaque<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará; Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, CEP- 60430270, Fortaleza Ceará, Brazil

Human parainfluenza viruses (HPIV) are enveloped, non-segmented, negative-strand RNA viruses that are members of the family Paramyxoviridae. The four major serotypes of HPIV (HPIV-1 to 4) are distributed in two genera: Respirovirus (HPIV-1 and 3) and Rubulavirus (HPIV-2 and 4) (Karron & Collins 2013). These viruses are important human respiratory pathogens and the involvement of these viruses is reported in numerous studies of upper or lower respiratory infections in children and adults previously healthy or immunocompromised. (Maeng et al. 2012; Hasman et al.2009)

## ANEXO B- ARTIGOS PARA SUBMISSÃO

**Título: Aspectos clínicos e epidemiológicos de pneumonias infantis associadas aos quatro tipos de vírus parainfluenza.**

Crister José Ocadaque, Ms; Fernanda Edna Araújo Moura, PhD

Endereço para correspondência: Fernanda Edna Araújo Moura, PhD, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo 1315, CEP 60430270, Fortaleza, Ceará, Brazil. E-mail: [fernandaedna@ufc.br](mailto:fernandaedna@ufc.br)

**Introdução:** As pneumonias são problemas de saúde pública mundial, especialmente em crianças menores que cinco anos de idade. Os vírus parainfluenza (VPI-1, 2 e 3) são agentes frequentes de pneumonia, pouco se conhecendo sobre a participação do VPI-4 devido a dificuldades do seu isolamento em cultura de células, a ausência de antígenos específicos para este vírus nos painéis de rotina de detecção de antígenos de vírus respiratórios.

**Objetivos:** O objetivo do estudo é descrever o perfil epidemiológico e clínico das pneumonias causadas pelos quatro tipos de VPI na população de estudo.

**Matérias e métodos:** Aspirados nasofaríngeos de 542 crianças de até cinco anos atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), que receberam o diagnóstico de pneumonia, foram submetidos à RT-PCR para a detecção dos VPI-1, 2 e 3. O nested PCR foi utilizado para o VPI-4 e subtipagem do VPI-4A e 4B. Estas amostras tinham sido analisadas anteriormente por imunofluorescência indireta para vírus sincicial respiratório (VSR), influenza A e B e adenovírus.

**Resultados:** Os VPI foram os mais detectados, em 165 casos, seguido de VSR (136), adenovírus (34) e influenza (30). As características clínicas e epidemiológicas de pneumonias pelos VPI foram analisadas após exclusão de casos de co-infecção entre os VPI, que totalizaram 104 casos dos 165. Os VPI mais frequentemente detectados, em ordem decrescente, foram os tipos VPI-3 (64,42%), VPI-4 (19,23%), VPI-1(14,42%) e VPI-2 (1,92%). O VPI-4 foi o mais associado a co-infecções seja com outros VPI ou com os outros vírus pesquisados. O VPI-4 foi o único VPI cuja circulação esteve associada à estação chuvosa dos dois anos de estudo ( $p < 0,0001$ ). O VPI-3 e o VPI-1 apresentaram pico de circulação associado à estação seca.

**Conclusão:** Os VPI são agentes frequentes de pneumonias em crianças menores que cinco anos em Fortaleza.