



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

FRANCISCO MÁRIO SIDNEY OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANOS EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM PNEUMONIA ATENDIDOS EM UM HOSPITAL DE
REFERÊNCIA EM FORTALEZA-CE NOS ANOS DE 2011 E 2012**

FORTALEZA – CE

2014

FRANCISCO MÁRIO SIDNEY OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANOS EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM PNEUMONIA ATENDIDOS EM UM HOSPITAL DE
REFERÊNCIA EM FORTALEZA-CE NOS ANOS DE 2011 E 2012**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Fernanda Edna Araújo Moura

FORTALEZA – CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

O47d Oliveira, Francisco Mário Sidney.
Detecção de coronavírus humanos em pacientes pediátricos com pneumonia atendidos em um hospital de referência em Fortaleza-CE nos anos de 2011 e 2012/ FranciscoMário Sidney Oliveira. – 2014.

84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.

Área de concentração: Microbiologia humana e animal.

Orientação: Profa. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura.

1. Pneumonia Viral. 2. Coronavírus. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 4. Criança. I. Título.

CDD 616.241

FRANCISCO MÁRIO SIDNEY OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS HUMANOS EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM PNEUMONIA ATENDIDOS EM UM HOSPITAL DE
REFERÊNCIA EM FORTALEZA-CE NOS ANOS DE 2011 E 2012**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA



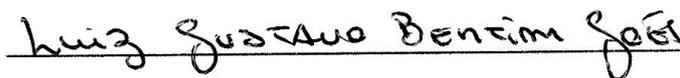
Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Edna Araújo Moura (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof^ª. Dr^ª. Sônia Mara Raboni

Universidade Federal do Paraná (UFPR)



Dr. Luiz Gustavo Betim Góes

Universidade de São Paulo (USP)

A Deus, por sempre iluminar o meu caminho;

A minha mãe, pelo afeto, apoio e compreensão em todos os momentos;

Ao meu avô, por sempre acreditar em mim (*in memoriam*);

A todos meus amigos, irmã, tios e avó, pela amizade, torcida e incentivo;

A minha namorada Alice Alves, por todo amor, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Edna Araújo Moura, pela orientação, paciência e toda atenção ao longo deste trabalho.

A Prof^ª. Dr^ª. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, atualmente coordenadora do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, por toda atenção dispensada aos alunos.

A todos os professores Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, por dividirem seus conhecimentos.

Aos integrantes do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), pela colaboração neste trabalho.

Aos Doutores participantes da banca examinadora: Prof^ª. Dr^ª. Sônia Mara Rabonie ao Dr. Luiz Gustavo Bentim Góes pelas críticas e sugestões relacionadas ao trabalho.

Ao Dr. Edison Luiz Durigon e ao Dr. Luciano Matsumiya Thomazelli do Laboratório de Virologia Clínica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), pela atenção e ajuda neste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia, pela paciência, companhia e incentivo, em especial Caroline Gurgel, Samuel Arruda e Christer Ocadaque.

Aos profissionais do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), pela disponibilidade em ajudar com a coleta de amostras e dados durante o período de estudo.

As crianças e aos seus responsáveis, por permitirem a coleta de material e informações.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“A sua Falta de Fé é

Perturbadora”

Darth Vader

RESUMO

Quatro genótipos de coronavírus humanos (CoVh-229E, OC43, NL63 e HKU1) são frequentemente associados a doenças no trato respiratório superior como também no inferior. Apesar da diversidade de coronavírus associados a infecções respiratórias agudas humanas pouco se conhece sobre o impacto das infecções a eles associadas em populações infantis que vivem em regiões tropicais. O presente estudo teve como objetivo detectar os CoVh em amostras de nasofaringe provenientes de pacientes pediátricos com pneumonia atendidos na emergência e nas enfermarias de um hospital de referênciana cidade de Fortaleza – Ceará, durante os anos de 2011 e 2012. Para tanto, foram coletadas 522 aspirados de nasofaringe, onde a princípio foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção dos vírus influenza A e B, sincicial respiratório (VSRh), adenovírus (ADVh), e parainfluenza 1, 2 e 3 (VPIh 1, 2 e 3), sendo 99 (19%) amostras positivas por esta técnica. As amostras negativas por IFI foram submetidas à reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para detecção dos CoVh. Das 423 amostras negativas por IFI, 71 (16,80%) tiveram o resultado positivo para os CoVh, onde o tipo 229E foi o mais frequente (34,11%), seguidos pelos tipos OC43 e NL63 com 28,23% cada e como menor detecção o HKU1 (9,4%). Todos os tipos de CoVh puderam ser observados durante o período de estudo. Uma taxa de 67,60% das crianças infectadas pelos CoVh foram atendidas na emergência, mas vale ressaltar a alta taxa de detecção em pacientes hospitalizados (32,40%). Quanto aos sinais e sintomas clínicos, observamos uma maior frequência de coriza, tosse, febre e dispnéia nos pacientes positivos para os CoVh. Identificamos o tipo HKU1 em uma criança com um mês de idade que foi a óbito, onde o único fator de risco observado foi a idade. Nossos resultados demonstram a circulação de quatro tipos de CoVh no Nordeste do Brasil, sendo detectados em pacientes pediátricos com pneumonia, mostrando a possível importância desses vírus em síndromes respiratórias mais graves. Este estudo representa a primeira análise sobre a epidemiologia dos CoVh em nosso estado.

Palavras-Chave: Pneumonia Viral. Coronavírus. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Criança.

ABSTRACT

Four genotypes of human coronavirus (CoVh-229E, OC43, NL63 and HKU1) are often associated with diseases of the upper respiratory tract as well as in the lower. Despite the diversity of human coronavirus associated with acute respiratory infections, little is known about the impact of infections associated with them in child populations living in tropical regions. The present study had as objective detect CoVh in nasopharyngeal samples from pediatric patients with pneumonia treated at emergency rooms and wards of a referral hospital in the city of Fortaleza - Ceará, during the years 2011 and 2012. To that end, we collected 522 nasopharyngeal aspirates, where the principle indirect immunofluorescence (IIF) was used for detection of influenza A and B viruses, respiratory syncytial virus, adenovirus and parainfluenza 1, 2 and 3, and 99 (19%) samples positive by this technique. Negative samples by IFA were subjected to polymerase chain reaction in real-time (RT-qPCR) for detection of CoVh. Of the 423 negative samples by IFA, 71 (16.80%) had a positive result for CoVh, where the type 229E was the most frequent (34.11%), followed by genotypes OC43 and NL63 with 28.23% each and with lower detection HKU1 genotype (9.4%). We observed 14 (19.71%) co-detections with at most two genotypes among CoVh. All types of CoVh were observed during the study period. A rate of 67.60% of the infected children was treated by CoVh in emergency, but it is worth mentioning the high detection rate in hospitalized patients (32.40%). HKU1 genotype identified in a child with one month old who died, where the only risk factor was age observed. Our results show the circulation four types of CoVh in our city, being detected in pediatric patients with pneumonia, demonstrating the potential importance of these viruses in severe respiratory syndromes.

Keywords: Viral Pneumonia. Coronavirus. Real-Time Polymerase Chain Reaction. Child.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Microscopia eletrônica por coloração negativa de cepas229E em cultura de células WI-38. Ampliação (100.000) (A). Microscopia eletrônica do coronavírus OC16 coradas negativamente a 2% com ácido fosfotugstico (PTA) e montadas em grades de cobre em células WI-38. Ampliação (144.000x).....**19**
- Figura 2** - Características morfológicas e estruturais da partícula viral do coronavírus. São descritos as glicoproteínas S (Spike), a hemaglutinaesterase HE; glicoproteína de membrana M; proteína de envelope E; a proteína do nucleocapsídeo; e o genoma viral de RNA fita simples (A). Microscopia eletrônica por coloração negativa da partícula do SARSCoV.....**24**
- Figura 3** – Representação esquemática dos genomas dos CoVh-229E, NL63, OC43 e SARSCoV.....**26**
- Figura 4** – Representação esquemática do ciclo de replicação dos coronavírus.....**28**
- Figura 5** – Sintomas e sinais apresentados pela população de estudo.....**44**
- Figura 6** – Distribuição mensal dos casos de pneumonias e do índice pluviométrico nos período de estudo.....**46**
- Figura 7** – Distribuição mensal das infecções pelos CoVh no período de estudo.....**47**
- Figura 8** – Distribuição mensal dos CoVh detectados e do volume de chuvas no período de estudo.....**48**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Descrição dos coronavírus em relação ao seu hospedeiro, tropismo celular, receptor celular, via de transmissão e distribuição mundial.....	21
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores e sondas para a reação em cadeia da polimerase em tempo real específicas para cada tipo de coronavírus.....	41
Tabela 2 – Características da população de estudo.....	43
Tabela 3 – Distribuição anual do total de casos de pneumonia e casos positivos para os CoVh.....	45
Tabela 4 – Distribuição por ano de estudo, de coronavírus identificados isoladamente e em co-deteções em relação à técnica de RT-qPCR.....	45
Tabela 5 – Comparação dos casos positivos e negativos para CoVh em relação ao gênero, a idade e o setor de atendimento.....	49
Tabela 6 – Comparação dos casos positivos para os CoVh específicos em relação aos pacientes hospitalizados e não hospitalizados.....	50
Tabela 7 – – Frequência dos casos positivos ou negativos para os tipos de CoVh pesquisados em relação as comorbidades.....	50
Tabela 8 – Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação aos fatores de risco.....	51
Tabela 9 - Distribuição dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação aos sinais e sintomas apresentados pela população de estudo.....	52
Tabela 10 - - Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação a ausculta pulmonar.....	53
Tabela 11 - Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação a presença e ausência de tiragem.....	54
Tabela 12 - Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação as alterações radiológicas.....	54
Tabela 13 Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação ao conduta terapêutica medicamentosa.....	55
Tabela 14 – Descrição dos valores C_T dos CoVh específicos e das coinfeções em relação às comorbidades.....	56
Tabela 15 - Descrição dos valores C_T dos CoVh específicos e das coinfeções em relação à idade dos pacientes.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AcM – Anticorpo monoclonal

ADVh – Adenovírus humano

ARDS – *acute respiratory distress syndrome*

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CI – Intervalo de confiança

CoVh – Coronavírus humano

CoVh – EMC – Coronavírus humano-Erasmus Medical Center

CoVh-229E - Coronavírus humano 229E

CoVh – HKU1 - Coronavírus humano HKU1

CoVh – NL63 - Coronavírus humano NL63

CoVh-OC43 - Coronavírus humano OC43

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

HE – Hemaglutinina esterase

HIAS – Hospital Infantil Albert Sabin

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses

IFI – imunofluorescência indireta

IRA – Infecção respiratória aguda

Kb – Quilo bases

MEM-E - Meio essencial mínimo de Earle

MERS-CoV – Middle East Respiratory Syndrome Coronavírus

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

OR – *Odds Ratio*

ORF – *Open Read Frames*

PBS – Tampão salina-fosfato

PNM - Pneumonia

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA - Ácido ribonucléico

RPM – Rotações por minuto

RT –PCR – Reação em cadeia da polimerase precedida da etapa de transcrição reversa

SARS-CoV – *Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus*

ssRNA - Ácido ribonucléico fita simples

VSR- vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Histórico	19
2.2	Classificação e Taxonomia dos Coronavírus	20
2.3	Morfologia e Estrutura viral	23
2.4	Genoma Viral	25
2.5	Replicação	27
2.6	Doenças Associadas aos Coronavírus Humanos	28
2.7	Epidemiologia dos Coronavírus Humanos	30
2.8	Diagnóstico dos Coronavírus Humanos	32
3	PERGUNTAS DE PARTIDA	34
4	HIPÓTESE	35
5	OBJETIVOS	36
5.1	Objetivo Geral	36
5.2	Objetivos Específicos	36
6	MATERIAIS E MÉTODOS	37
6.1	Tipo de Estudo	37
6.2	Local de Estudo	37
6.3	Critérios Inclusão	37
6.4	Critério de Exclusão	37
6.5	População de Estudo	37
6.6	Aspectos Éticos	38
6.7	Coleta de Amostras e Processamento	38
6.8	Reação de Imunofluorescência Indireta (IFA)	39
6.9	Extração do RNA viral	40
6.10	PCR em Tempo Real em uma etapa (qPCR-onestep)	40
7	RESULTADOS	42
7.1	Caracterização da população de estudo	42
7.2	Coronavírus Humanos identificados nas pneumonias analisadas	44
7.3	Co-deteccões Virais	45
7.4	Distribuição mensal das pneumonias positivas para os Coronavírus humanos	46
7.5	Distribuição dos casos de pneumonias, das infecções pelos Coronavírus humanos em relação ao índice pluviométrico	46
7.6	Gênero	48

7.7	Idade	49
7.8	Setor de Atendimento	49
7.9	Comorbidade	50
7.10	Fatores de risco	51
7.11	Sinais e Sintomas Apresentados	52
7.12	Exame Físico dos Pacientes	52
7.13	Alterações no Exame Radiológico	54
7.14	Conduta Terapêutica Medicamentosa	55
7.15	Descrição do Cycle Threshold (C_T) das amostras positivas para os CoVh	55
8	DISCUSSÃO	57
9	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICES	80
	APÊNDICE A	81
	APÊNDICE B	84
	APÊNDICE C -	86
	APÊNDICE C (Continuação)-	87
	APÊNDICE D - Artigo	88
	ANEXO	90
	ANEXO A -	91

1 INTRODUÇÃO

Os coronavírus humanos (CoVh) são reconhecidos como uma causa comum de infecções tanto no trato respiratório inferior como no superior e dependendo da metodologia diagnóstica aplicada podem implicar em até 30% dos casos em períodos epidêmicos (HAN *et al.*, 2007; HEMMING, 1994; HOLMES, 2001; VAN DER HOEK, 2007). Dessa forma os CoVh podem ser responsáveis por um percentual de infecções respiratórias onde o agente causador não é identificado em estudos que não utilizaram técnicas moleculares específicas para esses vírus (GÓES, 2012).

A utilização de metodologias moleculares tem proporcionado um melhor entendimento sobre os vírus respiratórios, contribuindo para uma melhor compreensão sobre estes agentes como causadores de infecções respiratórias agudas (IRA) (HART E CUEVAS *et al.*, 2007; VALLET *et al.*, 2004). A evolução das metodologias moleculares como a reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e a reação em cadeia polimerase em tempo real (PCR em tempo real ou qPCR) para detecção dos vírus, possibilita a identificação de um grande número de patógenos simultaneamente relacionados a IRA (AREDEN *et al.*, 2005).

As IRA constituem as síndromes clínicas mais frequentes nos seres humanos, sendo a principal causa de morbidade relacionadas a doenças infecciosas, mortalidade nos extremos de idade e em populações menos favorecidas de países em desenvolvimento (WEIIS, 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) avalia que as infecções do trato respiratório são a causa principal de morte nos países em desenvolvimento (DOMINGUEZ *et al.*, 2012; MCINTOSH *et al.*, 1967), onde os vírus são os agentes etiológicos mais importantes relacionados.

Na última década, um vírus de RNA denominado coronavírus tem sido amplamente estudado e novos tipos foram descobertos associados a doenças respiratórias graves. Em meados da década de 1960 até o ano de 2003, os CoVh humanos eram considerados como causadores de resfriado comum, onde apenas dois tipos eram conhecidos (CoVh-229E e CoVh-OC43). No entanto, apesar de se acreditar que as infecções por coronavírus tinham sintomatologia branda, na época atual quatro novos CoVh tem sido descritos como causadores de doenças respiratórias mais graves, como o SARS-CoV e MERS-CoV associados a pneumonia atípica e o CoVh-NL63 e CoVh-HKU1 associados bronquiolite e

laringotraqueobronquite (VAN DER HOEK *et al.*, 2005; WOO *et al.*, 2005; ZAKI *et al.*, 2012).

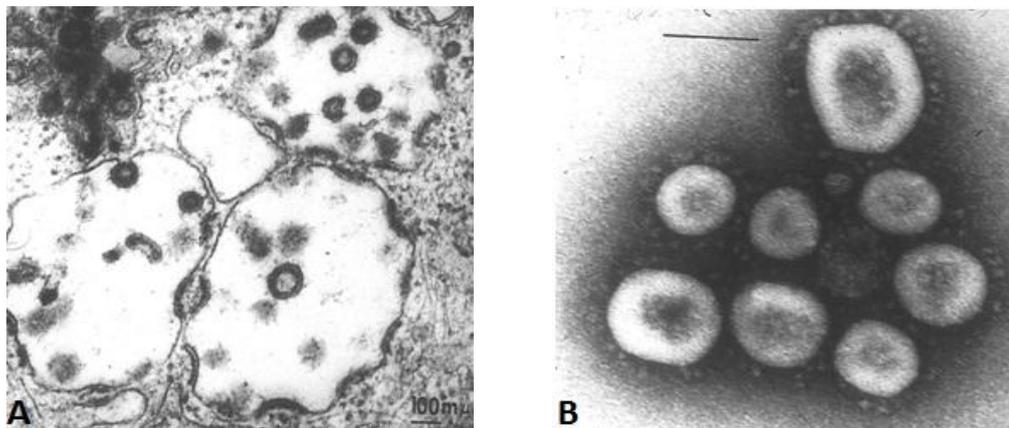
Estudos clínico-epidemiológicos sobre os CoVh no Brasil são escassos e limitados a região sudeste do país (CANDEIAS; CARVALHO; ANTONACIO, 1972; BELLEI *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; GÓES *et al.*, 2011; CABEÇA *et al.*, 2012; CABEÇA; GRANATO; BELLEI, 2013). Na região nordeste um único estudo demonstra a ocorrência dos CoVh sem discriminar os tipos específicos (BEZERRA *et al.*, 2011). Este estudo é o primeiro em nosso estado (Ceará) sobre os CoVh, onde é ressaltada a importância desses vírus como agentes de pneumonias infantis de gravidade variável.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A descoberta do coronavírus causando doenças em humanos ocorreu no ano de 1966, onde Hamre & Procknow cultivaram um vírus em cultura de células a partir de amostras de estudantes de Medicina com resfriado comum da Universidade de Chicago, esse agente foi chamado de 229E (KANH e MCINTOSH, 2005). No mesmo ano McIntosh *et al* em 1967, obteve sucesso em seis linhagens éter-sensíveis de amostras respiratórias de humanos que foram nomeadas de OC, pois cresceram em cultura de órgão traqueal (Figura 1). Dessa forma, um novo coronavírus denominado OC43 foi adaptado a culturas de tecidos, onde apresentou uma morfologia homogênea aos vírus IBV, B814 e 229E antes descritos.

Figura 1-Microscopia eletrônica por coloração negativa de cepas 229E em cultura de células WI-38.



Ampliação (100.000) (A). Microscopia eletrônica do coronavírus OC16 coradas negativamente a 2% com ácido fosfotungstíco (PTA) e montadas em grades de cobre em células WI-38. Ampliação (144.000x) (B).

Fonte: Becker *et al.*, 1967 (A); McIntosh *et al.*, 1967 (B).

Em 1975 a família *Coronaviridae* foi estabelecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses “ICTV”) (KAHN; MCINTOSH, 2005; TYRREL *et al.*, 1975). Através de estudos posteriores foram descobertas diferenças antigênicas entre os vírus 229E, OC43, IBV e o TGEV. Tais diferenças serviram de base para a classificação dos coronavírus inicialmente em dois grupos, determinados 1 e 2 (GÓES, 2012). Atualmente os coronavírus estão agrupados em quatro gêneros (*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus*, *Gammacoronavirus*) (ICTV, 2012).

A importância dos coronavírus foi renovada no início do ano de 2003 quando um novo CoVh (SARS-CoV) foi identificado causando uma síndrome respiratória aguda grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome* “SARS”) (KZIAZEK *et al.*, 2003; DROSTEN *et al.*, 2003). O SARS-CoV surgiu inicialmente causando essa doença em novembro de 2002 em Guangdong na China e se alastrou por 29 países em 100 dias de epidemia com uma taxa de mortalidade de 9,6% (774 mortes em 8.098 casos) (STADLER *et al.*, 2003).

O advento de técnicas moleculares sensíveis para detecção e o aumento do interesse nos estudos sobre os coronavírus, induziu a descoberta de novos coronavírus associados a doenças respiratórias em humanos, como o tipo NL63 que foi identificado na Holanda, em uma criança de sete anos de idade com bronquiolite e conjuntivite. Este novo vírus foi isolado em cultura de células a partir de amostras de nasofaringe e caracterizado a partir de técnicas moleculares (VAN DER HOEK *et al.*, 2004).

Em 2005, o CoVh-HKU1 foi descoberto na China em um paciente de 71 anos de idade que apresentava doença pulmonar crônica. Pelo fato deste vírus ser fastidioso, houve apenas um relato de cultivo e sem efeito citopático aparente. A identificação foi realizada por amplificação do material genético com uso da RT-PCR destinada inicialmente para o SARS-CoV, como também o sequenciamento revelou que havia uma distinção do tipo HKU1 em relação aos outros CoVh já relatados (WOO *et al.*, 2005).

A vista que novos coronavírus foram descobertos sendo relacionados a doenças graves em humanos, era evidente que outro vírus de origem zoonótica poderia surgir causando doenças e mortes nos seres humanos (ANDERSON; BARIC, 2012), então em setembro de 2012 emergiu um betacoronavírus inicialmente chamado de CoV-EMC (Erasmus Medical Center), hoje denominado MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) pelo ICTV. Este vírus foi primeiramente detectado em um paciente na Arábia Saudita que morreu de pneumonia e insuficiência renal (ZAKI *et al.*, 2012; GUERY *et al.*, 2013).

2.2 Classificação e Taxonomia dos Coronavírus

Os coronavírus são membros da ordem *Nidovirales*, onde incluídos nessa ordem estão às famílias *Coronaviridae*, *Arteviridae*, *Roniviridae* e *Mesoniviridae*. A nomenclatura *Nidovirales* é originado do latim “Nidus” que significa ninho caracterizado pela quantidade de RNAs mensageiros subgenômicos (mRNAs) produzidos durante replicação, que confere a principal característica dos nidovirus. Foram identificadas semelhanças na sequência gênica

dos membros da ordem *Nidovirales*, propondo que estes vírus evoluíram de um ancestral comum.

Na família dos Artervírus estão incluídos patógenos de suínos, equinos e murinos, enquanto que nas famílias dos Ronivírus e Mesonivírus compreendem patógenos de invertebrados como crustáceos e insetos respectivamente, mas patógenos humanos não são conhecidos nas famílias acima citadas. (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007; ZHONG *et al.*, 2012; LAUBER *et al.*, 2012). A família *Coronaviridae* compreende as subfamílias *Coronavírus* e *Torovírus*. Os torovírus possuem projeções na superfície viral semelhantes aos coronavírus e uma estrutura em forma de rim e estão associados a infecções entéricas em vários animais, incluindo cavalos, porcos, gatos e cabras (KOOPMANS; HORZINEK *et al.*, 2005).

Os coronavírus possuem uma diversidade fenotípica e genotípica, dessa forma são capazes de infectar uma variedade de hospedeiros como mamíferos (ex: camundongos, ratos, suínos, cães, felinos, coelhos, eqüinos, bovinos e morcegos) e aves (ex: galinhas, perus e faisões), sendo associados a doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e do sistema nervoso central com gravidade variável dependendo da espécie infectada (Quadro 1).

Quadro 1 – Características dos coronavírus contendo os grupos recentes, hospedeiros, o tipo de coronavírus, tropismo celular, receptores, via de transmissão e distribuição.

Gênero dos Coronavírus	Vírus	Hospedeiro	Tropismo tecidual	Receptor Celular	Via de Transmissão	Distribuição
Alfacoronavírus	CoVh-229E	Humanos	Trato respiratório	APN	Aerossol	Mundial
	CoVh-NL63	Humano	Trato respiratório	ACE2	Aerossol	Mundial
	TGEV	Suínos	Epitélio do trato respiratório e entérico	APN	Fecal-Oral	Mundial
	FIPV	Felinos domésticos e selvagens	Peritoneo, fígado e órgãos linfóides	APN	Fecal-Oral	Mundial
	BatCoV	Morcegos	?	?	?	Mundial
	PEDV	Suínos	Epitélio entérico e respiratório	?	?	Europa e Ásia
Betacoronavírus	CoVh-OC43	Humanos	Trato respiratório superior	9-O- ácido siálico acetilado	Aerossol	Mundial
	CoVh-HKU1	Humanos	Trato respiratório superior e inferior	?	Aerossol	Mundial

	BCoV	Bovinos	Intestino	9-O- ácido siálico acetilado	Fecal-Oral	Mundial
	MHV	Camundongos	Intestino, fígado, Sistema Nervoso Central	CEACAM	Fecal-Oral	Cobaias de laboratório
	SARS-CoV	Humanos e Civetas	Trato respiratório	ACE2	Aerossol	Mundial
	BatCoV	Morcegos	?	?	?	Mundial
Gammacoronavírus	IBV	Galinhas	Epitélio respiratório, Rim	?	Aerossol	Mundial
	TCoV	Perus	Jejuno, duodeno, íleo	?	Fecal-Oral	EUA
	BWCoV-SW1	Baleia	Fígado?	?	?	Animais de cativeiro
Deltacoronavírus	ALCCoV	Leopardo asiático e Ferretchínês	?	?	Fecal-Oral?	?
	MunCoV	Munia	?	?	?	?

Representados no quadro estão os vírus: CoVh-229E, coronavírus humano 229E; CoVh-NL63, coronavírus humano NL63; TGEV, vírus da gastroenterite em porcos; FIPV, vírus da peritonite felina infecciosa; BaTCoV, coronavírus de morcego; PEDV, vírus da diarreia epidêmica em suínos; CoVh-OC43, coronavírus humano OC43; CoVh-HKU1, coronavírus humano HKU1; BCoV, coronavírus bovino; MHV, vírus da hepatite em murinos; SARS-CoV, coronavírus associado ao SARS; IBV, vírus da bronquite infecciosa; TCoV, coronavírus de peru; BWCoV-SW1, Coronavírus de Baleia Beluga; ALCCoV, Coronavírus de leopardo; MunCoV, Coronavírus de munia.

Fonte: Góes, 2012.

Através de características obtidas por análises genotípicas e sorológicas os coronavírus foram divididos em três grupos, inicialmente denominados 1, 2 e 3. Os grupos 1 e 2 foram compostos por coronavírus isolados de mamíferos e o grupo 3 até recentemente era composto de coronavírus isolados de aves. No grupo 1 estão inseridos os CoVh-229E e NL63, já os tipos CoVh-OC43, HKU1 e o SARS-CoV pertenciam ao grupo 2 (HOLMES, 2001; MAHONY; RICHARDSON, 2005; VAN DER HOEK; PYRC; BERKHOUT, 2006; WEIS; NAVAS-MARTIN, 2005; WOO *et al.*, 2006). O SARS-CoV é um parente distante de todos os outros coronavírus seqüenciados e inicialmente acreditava-se que esse vírus representasse um quarto grupo, porém mais tarde foi classificado como um membro distantes do grupo 2 (GORBALENYA; SNIJDER; SPAAN, 2004). Em 2009, o ICTV propôs a substituição dos três grupos pelos gêneros Alfacoronavírus (Grupo 1), Betacoronavírus (Grupo 2) e Gammacoronavírus (Grupo 3) (WOO *et al.*, 2009) Anteriormente, os grupos alfacoronavírus e os betacoronavírus incluíam coronavirus de mamíferos e os gamacoronavírus de aves, mas atualmente achados recentes sugerem que os gamacoronavírus podem também infectar mamíferos (JONASSEN *et al.*, 2005; WOO *et al.*, 2009) como também foi classificado um

quarto grupo denominado deltacoronavírus que foi isolado de aves e porcos (WOO *et al.*, 2009ab; WOO *et al.*, 2012).

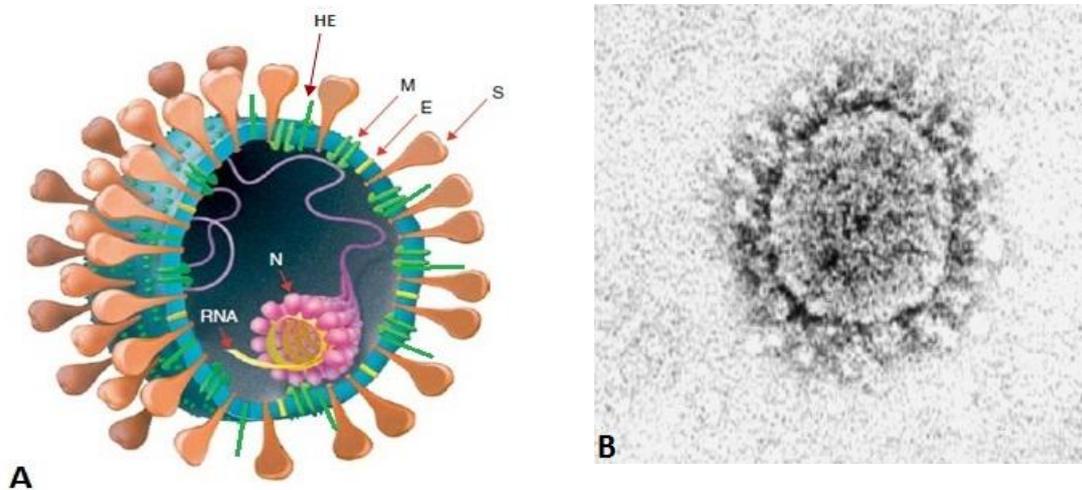
A maioria dos coronavírus infecta naturalmente apenas uma espécie de animal, ou no máximo, um número limitado de espécies dependendo do tipo de coronavírus. O SARS-CoV é uma exceção a regra, pois foi demonstrado que este vírus infecta uma variedade de mamíferos, incluindo humanos, primatas não humanos, civetas, guaxinins, gatos, cachorros e roedores (GUAN *et al.*, 2003; ROBERTS *et al.*, 2005), assim como o MERS-CoV que pode infectar seres humanos e camelos (ZAKI *et al.*, 2012).

A grande diversidade de hospedeiros e tropismo celular dos coronavírus pode ser explicada pelas altas taxas de recombinações em consequência do seu mecanismo singular de replicação (LAI; CAVANAGH 1997; WOO *et al.*, 2012). A diminuição na fidelidade da replicação pode acarretar um maior número de mutações deixando o vírus menos susceptível a atenuações. É demonstrado que os coronavírus suportam um limite de falhas durante sua replicação, isto significa dizer que estes vírus se replicam sempre no limite de erro. Os coronavírus são mutantes estáveis que possuem o maior genoma entre os vírus de RNA, com um sistema único de replicação gerando altas taxas de recombinações que podem ser responsáveis pela adaptação do vírus a novos hospedeiros (SMITH; DENISON, 2012).

2.3 Morfologia e Estrutura Viral

Os coronavírus possuem uma morfologia esférica, com as partículas virais medindo aproximadamente 100 a 160 nm de diâmetro. São vírus pleomórficos com envelope constituído por uma dupla camada de lipídeos e proteínas estruturais. A nomenclatura coronavírus é originada a partir das projeções referentes às espículas (Glicoproteína S) que emergem do envelope dando ao vírion um aspecto de coroa que em latim significa *Corona* (WEIS; NAVAS-MARTIN, 2005; LAI; CAVANAGH 1997). Em todos os coronavírus pode ser encontrada a glicoproteína S (Spike), a glicoproteína M (Transmembrana) que atravessa a bicamada lipídica três vezes e a glicoproteína E (Envelope) que está presente em quantidade muito menor do que outras glicoproteínas virais e em algumas cepas pode-se encontrar a proteína hemaglutinina esterase (HE) (Figura 2).

Figura 2 - Características morfológicas e estruturais da partícula viral do coronavírus.



São descritos as glicoproteínas S (Spike), a hemaglutinaesterase HE; glicoproteína de membrana M; proteína de envelope E; a proteína do nucleocapsídeo; e o genoma viral de RNA fita simples (A). Microscopia eletrônica por coloração negativa da partícula do SARS-CoV(B)

Fonte: Modificado de Holmes, 2003 (A); Ksiazek *et al.*, 2003.

Na partícula viral é possível identificar duas espículas (S e HE) que se alongam para fora do vírion. A glicoproteína S mede 20 nm com aproximadamente 150-180 kD e é responsável pela ligação do vírus ao receptor na célula hospedeira, podendo assim induzir a fusão do envelope viral com a membrana celular de modo que o vírus possa penetrar na célula hospedeira. A proteína S é dividida em três domínios estruturais entre as regiões N-terminal e C-terminal. Seu domínio externo pode ser dividido em dois subdomínios denominados S1 e S2, um domínio transmembrânico e pequeno domínio citoplasmático carboxiterminal. O subdomínio S1 inclui metade da região N-terminal e forma uma porção globular da espícula, sendo responsável pela ligação com os receptores celulares da célula hospedeira (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007). As sequências do S1 são variáveis, podendo conter deleções e substituições no gene da proteína Spike em diferentes coronavírus. É interessante salientar que possíveis mutações estão associadas com alterações na antigenicidade e patogenicidade do vírus, como também podem influenciar no cruzamento da barreira intra e inter-espécies (BALLESTEROS; SANCHEZ; ENJUANES, 1997; LEPARC-GOFFART *et al.*, 1997; LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007). Em contraste, as sequências do S2 são mais conservadas contendo duas repetições de sete aminoácidos que conferem uma estrutura de espiral (De GROOT *et al.*, 1989).

A glicoproteína HE é encontrada em alguns vírions do grupo betacoronavírus e de coronavírus de peru (TCoV) do grupo gamacoronavírus. A presença dessa proteína é

altamente variável no grupo dos betacoronavírus e a estrutura é mutada ou deletada durante uma série de passagens em cultura de célula, demonstrado que a HE não seja essencial para replicação (YOKOMORI; BANNER; LAI, 1991), mas é sugerido que esta proteína pode atuar aumentando a virulência do vírus, influenciando na adsorção, inserção e liberação dos vírions na membrana celular (LISSEBERG *et al.*, 2005).

A glicoproteína M é a proteína mais abundante da membrana viral e apresenta um pequeno domínio aminoterminal que é exposto no exterior do envelope viral o que difere das outras glicoproteínas. Esta proteína não é transportada para a membrana, mas participa no arranjo da partícula viral, interage com as glicoproteínas S e N, e possui glicosilações que parece não ser essencial para infecciosidade viral, mas pode estar associada à interação do vírus com hospedeiro (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007)

A proteína estrutural N é uma fosfoproteína de 50 a 60 kDa que interage com o RNA genômico viral para formar o nucleocapsídeo. Para facilitar a formação de complexos de replicação do RNA, a proteína N pode interagir com a proteína M, dessa forma conduzindo a incorporação de novas particular virais. A proteína N possui uma atividade estrutural, mas pode atuar na transcrição, na patogênese viral e é necessária para recuperação eficiente do vírus (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007).

A menor proteína do envelope viral é a E, que juntamente com a proteína M desempenha um papel importante na montagem do vírion. A proteína E quando expressa sozinha é suficiente para liberação de vesículas a partir de células infectadas, mas essa proteína não é absolutamente essencial para o vírion, pois mesmo os vírus deficientes de E pode ser liberados a partir de células infectadas. Foi possível selecionar um MHV recombinante com deleção no gene E, esse vírus mostrou baixa infecciosidade e uma replicação pouco reprodutiva, indicando que mesmo não sendo essencial a proteína E desempenha um papel importante na produção de um vírus infeccioso (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007).

2.4 Genoma Viral

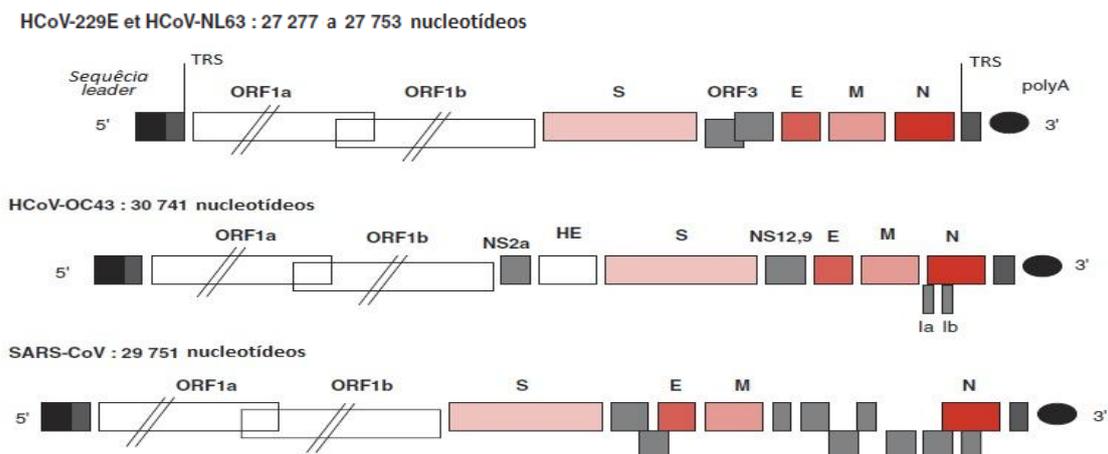
Os coronavírus possuem um genoma constituído de RNA capeado, poliadenilado, de fita simples (ssRNA), não segmentado, policistrônico e de polaridade positiva. É considerado o maior genoma entre os vírus de ssRNA de 27 a 32 kb, ocorrendo na expressão a produção de RNAs subgenômicos com sequências 5' e 3' que caracteriza a ordem *Nidovirales* (Figura

3) (BRIAN; BARIC, 2005; VAN DER HOEK; PYRC; BERKHOUT, 2006; WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005).

A organização genômica é semelhante em todos os coronavírus onde são encontrados de 7 a 14 *open reading frames* (ORFs) e 2/3 da posição 5' do genoma é constituído de duas grandes ORFs (1a e 1b), que codificam poliproteínas que são precursoras de proteínas não estruturais importantes para replicação do genoma viral como as proteínas helicase e a RNA polimerase RNA dependente (RpRd ou L). Nos outros 1/3 do genoma na posição 3' podem ser identificados quatro genes que codificam a proteína Spike (S), envelope (E), do nucleocapsídeo (N) e da membrana (M). Nos betacoronavírus logo após o gene S encontra-se o gene da hemaglutinina esterase (HE) (BRIAN; BARIC, 2005; VAN DER HOEK; PYRC; BERKHOUT, 2006; WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005). Entre os genes das proteínas estruturais são observados os genes que traduzem proteínas específicas e acessórias. Tais proteínas apresentam uma variação nas suas propriedades, número e ordem entre os grupos dos coronavírus, mas são em geral conservadas entre esses grupos (HOLMES, 1999; YOUNT; ROBERTS; SIMS, 2005).

O final das regiões 5' e 3' do genoma existe uma sequência de 65 a 98 nucleotídeos denominada *leader*, onde podem ser encontrados espaços intergênicos contendo sequências reguladoras chamadas sequências regulatórias de transcrição (TRS), que são compostas de 6 a 10 nucleotídeos e tem participação no controle e na regulação da transcrição de cada gene do vírus (SAWICKI; SIDDELL, 2007).

Figura 3 – Representação esquemática dos genomas dos CoVh-229E, NL63, OC43 e SARS-CoV.



São apresentadas as: open reading frames (ORFs 1a e 1b e 3), sequências regulatórias de transcrição, proteína Spike (S), do envelope (E), do nucleocapsídeo (N) e da membrana (M) e hemaglutinaesterase (HE).

Fonte: modificado de Vebret *et al.*, 2005.

2.5 Replicação

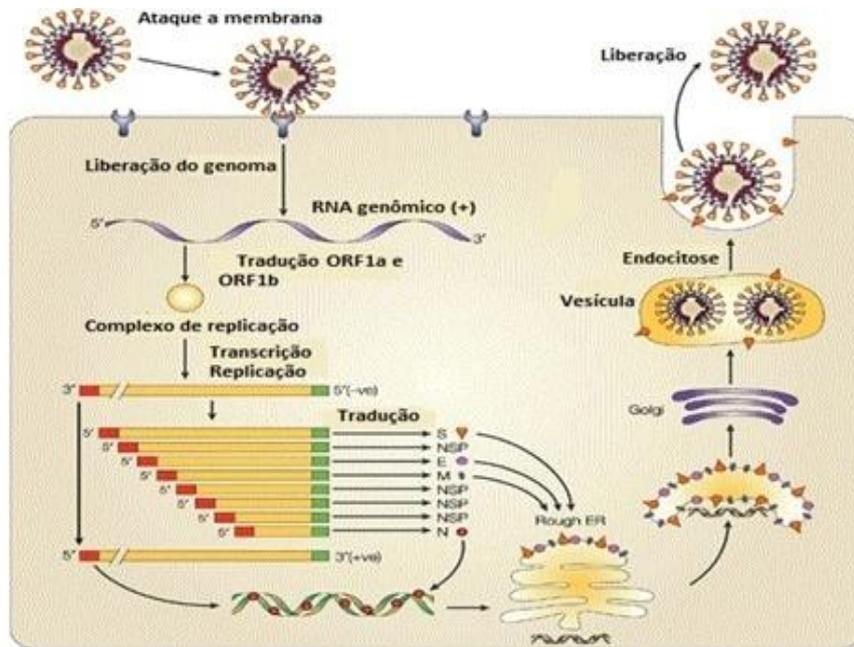
Os coronavírus possuem uma variedade de tecidos alvos, assim como uma variedade de hospedeiros, mas o tropismo desses vírus é em geral por células do trato respiratório, gastrointestinal e possivelmente células neuronais (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 1997; WEVERS; VAN DER HOEK, 2009).

O ciclo de replicação é exclusivamente citoplasmático e corre de acordo com fases convencionais (Figura 4) (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 1997). O primeiro passo do ciclo consiste na fixação do vírus na célula hospedeira através da interação da proteína S com receptores celulares que difere para cada tipo de coronavírus (Quadro 1). A proteína Spike pode auxiliar na fusão direta do envelope viral com a membrana celular, ou o vírus penetra na célula por endocitose mediada pelo receptor, dessa maneira a proteína S induz a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, assim liberando o genoma do vírus no citoplasma. Esta última forma parece variável dependendo da célula e do tipo de coronavírus. O genoma do vírus atua como RNA mensageiro (RNAm) e após a entrada na célula as ORFs 1a e 1b são diretamente traduzidas pelos ribossomos dando origem as poliproteínas replicase 1a e 1ab (BAKER, 2009).

As poliproteínas são processadas pelas proteases virais *papain-like* e poliovírus 3C-like gerando 16 proteínas não estruturais que são denominadas nsp1-nsp16. Através das 16 proteínas não estruturais que se arranjam com membranas e formam vesículas de membrana dupla, em seguida são originados de cinco a sete RNAm subgenômicos nomeados de acordo com o seu tamanho, o maior o RNAm1 tem o mesmo comprimento do RNA genômico a ser empacotado nas novas partículas virais. Esses RNAs codificam todas as proteínas virais localizadas após a ORF1b, sendo constatado que os RNAs subgenômicos possuem a mesma sequência *leader* na porção 5'. Os RNAs subgenômicos são policistrônicos e contêm todas as ORFs dos genes a serem expressos, mas só a primeira ORF desses RNA localizada na sequência *leader* é expressa (ALMAZAN 2000; BAKER, 2009).

O RNA subgenômico replicado e a proteína estrutural N formam um nucleocapsídeo com uma estrutura helicoidal. As proteínas estruturais são inseridas no retículo endoplasmático. Esse nucleocapsídeo é inserido em um compartimento entre o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático onde passa por modificações pós-traducionais. As partículas virais formadas são incorporadas a vesículas, transportadas e liberadas da célula por exocitose (BACKER, 2009).

Figura 4 - Representação esquemática do ciclo de replicação do Coronavírus.



Fonte: modificado de Stadler *et al.*, 2003.

2.6 Doenças Associadas aos Coronavírus Humanos

A identificação do SARS-CoV no começo do ano de 2003 deu um verdadeiro impulso aos estudos e pesquisas sobre os CoVh que até então eram considerados como vírus de pouco impacto clínico. Os CoVh-229E e OC43 estão entre os principais responsáveis pelas infecções respiratórias altas e em conjunto com os rinovírus são considerados os principais agentes do resfriado comum (MYINT, 1994). Uma série de estudos mostra a relação desses vírus com infecções mais graves (pneumonia, bronquite e bronquiolite), mas sua patogenicidade é em geral baixa e o curso da doença é benigno (MYINT, 1994; VABRET *et al.*, 2003).

Estudos clínicos mostram que o tipo CoVh-NL63 é um patógeno respiratório significativo, estando associado a doenças no trato respiratório superior e inferior. Alguns relatos determinam que o tipo NL63 está relacionado à laringotraqueobronquite (crupe) em crianças, sendo tão detectado como os vírus parainfluenza (CHIU *et al.*, 2005; EBIHARA *et al.*, 2005; VAN DER HOEK *et al.*, 2005; VABRET *et al.*, 2005; SUNG *et al.*, 2010). Segundo Van der Hoek *et al.* (2005) crianças infectadas com o NL63 tem seis vezes mais chances de contrair laringotraqueobronquite. Em todos os casos a investigação sobre o CoVh-NL63 pode melhorar o diagnóstico já que o este vírus pode ser detectado de 3 a 9% em amostras respiratórias onde os vírus mais frequentes não foram identificados (ARDEN *et al.*,

2005; BASTIEN *et al.*, 2005; EBIHARA *et al.*, 2005; MOES *et al.*, 2005; VABRET *et al.*, 2005).

O CoVh-HKU1 é também associado a infecções no trato respiratório superior como no inferior. Este vírus está associado a síndromes clínicas graves em crianças como pneumonia e bronquiolite, geralmente acompanhadas de sinais e sintomas clínicos como tosse, rinorréia, convulsões febris e espirros (WOO *et al.*, 2005ab). É relatado na literatura que o tipo HKU1 pode agravar a condição dos pacientes que apresentavam IRA e infecção secundária. É observado no estudo de Gaunt *et al.* (2010) a importância deste coronavírus em co-deteções, onde o HKU1 foi segundo mais co-detectado quando comparado aos outros coronavírus.

Na última década dois coronavírus extremamente patogênicos e letais foram identificados em populações humanas e animais (SARS-CoV e MERS CoV). A relevância da síndrome respiratória aguda grave ocasionada pelo SARS-CoV foi reconhecida no início do ano de 2003 sendo relatada uma taxa de 10 a 50% de mortalidade em indivíduos infectados dependendo da idade (CHERRY *et al.*, 2004; PEIRIS; GUAN; YUEN, 2004; ZHONG, 2004). Curiosamente as crianças infectadas por este vírus apresentam infecção de menor gravidade, onde a mortalidade é rara (WEVERS; VAN DER HOEK, 2009).

Após uma incubação silenciosa o SARS-CoV causa uma sintomatologia semelhante a uma gripe incluindo sintomas como febre alta, mal estar e fadiga. Depois de 4 a 7 dias iniciam-se os sintomas respiratórios (tosse produtiva, dispnéia e rinorréia) (BOOTH *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003). Foi observado que em 2/3 dos indivíduos infectados a doença evolui para uma pneumonia atípica que é caracterizada por um dano alveolar e rapidamente poderia progredir para uma síndrome da angústia respiratória aguda (*acute respiratory distress syndrome* “ARDS”) devido a uma infiltração pulmonar progressiva do sistema imune, formação de membrana hialina, dano alveolar difuso e alta carga viral que pode levar o indivíduo ao óbito (WEVERS; VAN DER HOEK, 2009).

No ano de 2012 foi identificado coronavírus emergente denominado *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). A infecção por este tipo de coronavírus também provoca uma pneumonia atípica, uma síndrome da angústia respiratória aguda e em alguns casos insuficiência renal que muitas vezes é fatal. A infecção e a transmissão do MERS-CoV nos seres humanos ainda precisam ser estudadas para evidenciar a doença causada por este vírus como também esclarecer o papel do hospedeiro na patogênese viral (ABDEL-MONEIM, 2014).

A importância clínica dos CoVh ainda não foi estabelecida e a frequência das infecções respiratórias causadas por estes vírus é complicado de se estimar, principalmente devido a estudos com dados difíceis de analisar, pois variam no período de estudo, idade da população, se os pacientes são hospitalizados ou não e acima de tudo utilizam métodos de diagnóstico não padronizados (PRINCIPI; BOSIS; ESPOSITO, 2010; VEBRET *et al.*, 2005).

2.7 Epidemiologia dos Coronavírus Humanos

Os CoVh OC43, 229E, NL63 e HKU1 exibem uma distribuição mundial, sendo descritos em todos os continentes, com exceção apenas dos polos (GÓES, 2012). Os primeiros estudos publicados na década de 1970 mostram uma prevalência alta dos tipos OC43 e 229E, onde esses vírus exibiam uma circulação típica na primavera com uma frequência de detecção que pode variar de 5 a 35% durante os períodos epidêmicos (MONTO, 1974; MCINTOSH, 1974). Metodologias sorológicas aplicadas para detecção dos CoVh-OC43 e 229E propõem que as infecções por esses coronavírus ocorram principalmente na infância (GÓES, 2012).

Dados epidemiológicos sobre o tipo NL63 mostram uma circulação desse vírus em muitos países como Bélgica, Canadá, Estados Unidos da América (EUA), Austrália, Japão, França e como alta frequência de detecção em janeiro e fevereiro (ARDEN *et al.*, 2005; BASTIEN *et al.*, 2005; EBIHARA *et al.*, 2005; MOES *et al.*, 2005; VABRET *et al.*, 2005). Este coronavírus apresenta tendências de circulação no outono em estudos como em Taiwan e Hong Kong (WU *et al.*, 2008; LEUNG *et al.*, 2009), mas em outros países, como alguns do continente europeu, Coréia do Sul e América do Norte, o predomínio foi mais nos meses de inverno (BASTIEN *et al.*, 2005; ESPER *et al.*, 2005; MOES *et al.*, 2005; SUNG *et al.*, 2010; VABRET *et al.*, 2005). Em outros estudos o tipo NL63 foi mais detectado no verão (CHIU *et al.*, 2005; VENTER *et al.*, 2011), como também no outono (LAU *et al.*, 2006).

Em análises realizadas utilizando a técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) baseando-se na proteína N dos CoVh-229E e NL63 foi observado que mais de 30% das crianças menores de um ano apresentavam anticorpos contra esses coronavírus. Segundo Shao *et al.* (2005) e Hofmann *et al.* (2005) a soropositividade para o tipo NL63 pode variar entre 25 e 70% em indivíduos de até 20 anos, como também na maior parte de indivíduos com idade superior a oito anos, respectivamente. Já o soro de poucos adultos apresentou evidências sorológicas geradas a partir de anticorpos contra o tipo 229E (HOFMANN *et al.*, 2005).

O CoVh-HKU1 foi observado no meses de inverno e outono nos EUA (DOMINGUEZ; ROBINSON; HOLMES, 2009; KISTLER *et al.*, 2007) e nas estações de inverno e primavera em Hong Kong e na China (JIN *et al.*, 2011; WOO *et al.*, 2005). Contudo, não foi observado um padrão sazonal deste tipo de coronavírus nos EUA como também na China. (GORSE *et al.*, 2009; PRILL *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2011; TALBOT *et al.*, 2009;).

No Brasil o primeiro estudo sobre coronavírus foi realizado por Candeias, Carvalho e Antonacio (1972), que identificou através de fixação do complemento o tipo 229E em 4 de 124 amostras de crianças e adolescentes (3,2%) e em 84 de 321 adultos (26,2%), sendo observado uma maior identificação no indivíduos do sexo masculino nos dois grupos. Vários anos depois Bellei *et al.* (2008) detectou a presença dos CoVh-229E e OC43 em pacientes ambulatoriais com IRA ou com sintomas semelhantes a uma gripe (*influenza like*) na cidade de São Paulo, onde 18 amostras de 420 (4,2%) foram positivas para algum coronavírus pesquisado.

Em um estudo realizado por Albuquerque *et al.* (2009) que trabalharam com crianças com quadro de IVAS, foi possível identificar o primeiro relato do tipo HKU1 no Brasil que foi detectado por PCR em tempo real. Alguns estudos no ano de 2011 e 2012 também ressaltaram a importância da infecção em crianças pelos coronavírus no Brasil, onde a maioria trabalhou com quatro tipos de CoVh (ALBUQUERQUE; VARELLA; SANTOS, 2012; BEZERRA *et al.*, 2011; CABEÇA *et al.*, 2012; CABEÇA e BELLEI *et al.*, 2012; GÓES, 2012), como o de Góes *et al.* (2011) que o identificou o tipo CoVh-HKU1 em 6 de 169 (3,6%) em amostras do ano de 1995, demonstrando que este vírus já circulava em nosso país mesmo antes de ser identificado. Cabeça, Granato e Bellei (2013) realizaram um estudo com 1.137 amostras de trabalhadores da saúde, pacientes transplantados renais e células-tronco, crianças com doenças cardíacas, pacientes hospitalizados e ambulatoriais com IRA, onde foi possível observar 11, 2% de positividade para pelo menos um dos quatro CoVh (OC43, 229E, NL63 e HKU1) pesquisados.

2.8 Diagnóstico dos Coronavírus Humanos

As infecções causadas por CoVh não são muitas vezes diagnosticadas pelo fato das doenças respiratórias no trato superior serem leves e alto limitadas, e pela semelhança dos sintomas clínicos causados por diferentes vírus respiratórios que também afetam o trato respiratório inferior. Muitos diagnósticos dos CoVh têm sido feitos por estudos clínicos e

epidemiológicos de infecções do trato respiratório em laboratórios de pesquisa. Inicialmente as detecções dos CoVh e animais eram feitas por isolamento viral, microscopia eletrônica e análises sorológicas, mas com o passar dos anos a identificação através de antígenos e ensaios de PCR passaram a ser realizadas (LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007).

Ensaio sorológicos aplicados no soro de fase aguda e de convalescência têm sido considerada uma forma sensível para detecção dos CoVh. A habilidade para detectar essas infecções pela técnica RT-PCR quando comparada a ensaios sorológicos ainda não está amplamente determinada devido à qualidade da amostra avaliada para o teste e do tipo de ensaio usado. Stephensen *et al.* (1999) foram os primeiros a descrever um ensaio de RT-PCR Pancoronavírus capaz de detectar os CoVh em um ensaio único. Este método se baseia na elaboração de oligonucleotídeos consensos com alvo em sequências de alta similaridade, como o gene da polimerase viral, devido a sua estrutura e funcionalidade altamente conservada, tornando este gene também base para estudos filogenéticos. Este tipo de metodologia foi adaptado para ensaios baseadas na técnica de qPCR, sendo descritos ensaios por Real Time PCR Syber Green ou sistema Exonuclease conhecidos por TaqMan. (KUYPERS *et al.*, 2007). Tais metodologias utilizam oligonucleotídeos degenerados ou específicos, podendo ainda ser usada a combinação dos dois tipos.

2.9 Resposta Imunológica frente aos Coronavírus Humanos

As infecções virais de mamíferos resultam em geral uma resposta imune típica. Estas respostas são iniciadas pelo sistema imune inato que reconhece os padrões moleculares (tais como ssRNA e dsRNA). O sistema imune adaptativo pode matar as células infectadas pelos vírus e anticorpos específicos são produzidos, ocorrendo assim uma montagem das defesas do organismo (FRIEMAN *et al.*, 2008).

Os CoVh pode induzir a proliferação de macrófagos e linfócitos que parecem ser um componente chave de sua patogênese. O sistema imune inato pode ser interferido, como a inibição de algumas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, um exemplo é o interferon tipo I (IFN-I). Há a expressão de quimiocinas CXC, tais como CXCL10, CCL2, CCL3, CCL5 e CCL8 que são reguladas por células dendríticas e macrófagos, podendo contribuir para o influxo de monócitos e até dos próprios macrófagos. A expressão de CXCL8 (IL-8), os quais atraem neutrófilos é regulada no soro dos pacientes. A regulação positiva de moléculas pró-

inflamatórias pode contribuir para a patogênese dos CoVh, dessa maneira foi observado que fator de crescimento transformantes- β e a prostaglandina E2 em concentrações aumentadas podem prejudicar a eliminação dos CoVh. A resposta imunológica frente aos CoVh não é totalmente elucidada, mas pode fornecer um melhor entendimento o tratamento eficaz das síndromes clínicas causadas por estes vírus (FRIEMAN *et al.*, 2008).

3 PERGUNTAS DE PARTIDA

1. Quais são as características clínico-epidemiológicas das pneumonias associadas aos CoVh na população de estudo?
2. Quais os genótipos de CoVh circulantes em cidade de Fortaleza, durante a realização deste estudo ?

4 HIPÓTESES

1. As pneumonias associadas aos CoVh na população de estudo possuem características semelhantes às descritas na literatura em outras regiões do Brasil.
2. Os genótipos de CoVh circulantes em Fortaleza, durante o desenvolvimento do presente estudo são os CoVh-OC43, -NL63, -229E e -HKU1.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Descrever o perfil clínico-epidemiológico das pneumonias positivas para os CoVh em pacientes atendidos na emergência e nas enfermarias do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), na cidade de Fortaleza – Ceará, no período de janeiro de 2011 a outubro de 2012.

5.2 Objetivos Específicos

Determinar a frequência mensal das pneumonias positivas para os CoVh.

Correlacionar a distribuição dos CoVh com a estação chuvosa ou seca na cidade de Fortaleza-Ceará.

Determinar os tipos de CoVh circulantes na população de estudo.

Determinar a frequência de co-deteções entre os CoVh durante o período de estudo.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Tipo de Estudo

O estudo teve um caráter observacional, transversal, analítico e retrospectivo, realizado no período de janeiro de 2011 a outubro de 2012.

6.2 Local de Estudo

O presente estudo foi realizado na cidade de Fortaleza, localizada no litoral do Ceará, nordeste do Brasil. Fortaleza está localizada a 4° ao sul do equador, com um clima tropical caracterizado por uma estação chuvosa, em geral no período de março a junho e uma estação seca nos meses seguintes. O clima é constante com uma umidade relativa do ar que fica em torno dos 70% e uma temperatura média que pode variar entre 26-28° (ALONSO *et al.*, 2012).

Os pacientes que compuseram a população de estudo foram atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), localizado na cidade de Fortaleza. O HIAS é o maior hospital de administração pública que fornece atendimento pediátrico no estado. O HIAS é um centro de especialidades de nível terciário que fornece atendimento tanto a crianças como adolescentes, com atuação em emergência clínica e cirúrgica, procedimentos de alta complexidade em oncologia, neurocirurgia, cirurgia cardíaca e cirurgia crânio-facial, além de unidades de terapia intensiva e unidades neonatais de médio e alto risco.

6.3 Critérios Inclusão

Crianças de ambos os sexos de zero a 16 anos, atendidas na emergência e nas enfermarias do HIAS, com o diagnóstico clínico de pneumonia cujos pais ou responsáveis permitiram suas inclusões no estudo.

6.4 Critérios de Exclusão

Pacientes que tiveram o resultado positivo pela técnica de imunofluorescência indireta para ADVh, VSR, influenza A e PIV 1, 2 e 3.

6.5 População de Estudo

A população de estudo foi constituída de crianças e adolescentes de 0 a 16 anos que apresentavam o diagnóstico clínico de pneumonia segundo as diretrizes da Sociedade

Brasileira de Pediatria (análise da radiografia do paciente, a realização da anamnese do mesmo com os seguintes sinais e sintomas: febre $>37^{\circ}\text{C}$, tosse, dispnéia, desconforto respiratório e estridor), atendidas na emergência e nas enfermarias do HIAS.

6.6 Aspectos Éticos

Este estudo recebeu um parecer favorável pelo Comitê de Ética da HIAS (Protocolo 070/09).

6.7 Coleta de Amostras e Processamento

Secreções respiratórias coletadas por aspiração para estudos de vigilância de viroses respiratórias infantis pertencentes ao Laboratório de Virologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará foram submetidas a uma seleção para análise apenas das coletadas de crianças que receberam o diagnóstico de pneumonia no HIAS.

A coleta da amostra clínica foi realizada de segunda a sexta-feira por biomédicos, enfermeiros e alunos de iniciação científica do Laboratório de Virologia. A amostra era coletada utilizando-se uma sonda de aspiração traqueal nº 6 acoplada a uma seringa de 20 mL (GARDNER; MCQUILIN, 1980). As amostras eram mantidas na própria seringa e acondicionadas em isopor com gelo para ser transportada em até quatro horas para o Laboratório de Virologia. Após a coleta, os pais ou responsáveis assinavam um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) e em seguida uma ficha epidemiológica era preenchida com os dados do paciente e da doença, tais como, sexo, idade, histórico do paciente, histórico familiar, sinais e sintomas, tempo de doença, tratamento instituído, exames realizados, diagnóstico e exame físico.

Em capela de fluxo laminar, a amostra coletada foi diluída em Meio Essencial Mínimo com sais de Earle (2 mL) com penicilina-estreptomicina, glutamina e bicarbonato de sódio, sendo em seguida homogeneizada para que as células fossem liberadas do muco existente na secreção, o que facilitava a visualização de células possivelmente infectadas pelos vírus pesquisados pela técnica de imunofluorescência indireta (MOURA *et al.*, 2006). Uma alíquota desta secreção após processamento era colocada em um criotubo identificado com o número da amostra e então armazenado a -86°C para análise futura. O material restante era centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, para obtenção do sedimento celular que era diluído em tampão salina-fosfato (PBS) para distribuição da suspensão obtida em lâminas de imunofluorescência. Eram preparadas três lâminas para o teste de imunofluorescência indireta

(IFI): a primeira utilizada na triagem para diferenciação de casos positivos e negativos, a segunda para ser utilizada na etapa que identificava o(s) vírus que estavam infectando as células. A última lâmina, de reserva, era estocada em um freezer a -20°C .

6.8 Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

A técnica de IFI foi realizada para detecção de antígenos virais expressos na membrana da célula hospedeira. Este método era empregado com diagnóstico rápido para a identificação dos vírus influenza A e B, adenovírus (ADV), vírus sincicial respiratório (VSR) e parainfluenza 1, 2, 3 (VPI), utilizando o *Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification IFA Kit* (Chemicon ligh diagnostics, temecula, Califórnia, USA), segundo as recomendações do fabricante.

Na lâmina, adicionava-se em um orifício “spot” 8 μl de um *pool* de anticorpos monoclonais (AcM) específicos contra os antígenos dos vírus acima descritos, como também em outro orifício foi adicionado 8 μl de anticorpos de camundongo não infectado representando o controle negativo. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos em uma estufa a 37°C , em seguida as lâminas foram submetidas a duas lavagens por imersão: a primeira com PBS adicionado de Tween 20 e a segunda com PBS sem Tween. Depois essas lâminas eram secadas em estufa a 37°C por 5 a 10 minutos. Após foi acrescentado o mesmo volume de um segundo anticorpo de cabra anti-IgG conjugado ao isotiocianato de fluoresceína nos mesmos orifícios. As condições de incubação, o tempo e as lavagens eram idênticas ao da etapa anterior. Por fim as lâminas foram montadas utilizando um óleo de montagem e cobria-se com lamínulas. A leitura foi feita em um microscópio da marca Olympus modelo BX-40. As amostras foram consideradas positivas quando era possível visualizar células com fluorescência intracitoplasmáticas e/ou nucleares onde foram adicionados anticorpos específicos.

A etapa de identificação específica para todos os vírus era realizada após o resultado positivo da triagem. Para tanto, utilizou-se AcM específico para cada um dos sete vírus pesquisados. Foram adicionados oito μl anticorpo específico e no último orifício foi realizado o controle negativo a partir de anticorpos de camundongo não infectado. As etapas seguintes foram às mesmas já descritas anteriormente na fase de triagem, como também a forma que as amostras foram consideradas positivas.

6.9 Extração do RNA Viral

As amostras clínicas armazenadas e congeladas em freezer a -80°C foram então descongeladas para a extração do genoma viral. Para a extração do RNA viral foi utilizado o kit AxyPrep™ BodyFluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit (AXIGEN BIOTECHNOLOGY, Califórnia, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Ao final foi gerado um volume de $50\ \mu\text{l}$ de extraído, onde foi retirado três μl para reação de PCR em tempo real e o restante do material foi estocado novamente a -80°C .

6.10 PCR em Tempo Real em uma etapa (RT- qPCR-onestep)

As amostras negativas para os vírus testados pela IFA foram submetidas ao qPCR utilizando o *AgPath-ID™ One-Step RT-PCR* (Applied Biosystems, Carlifornia, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. A partir dos extraídos foi realizada a técnica de PCR-*real time* para detecção dos CoVh-229E, CoVh-NL63, CoVh-OC43 e CoVh-HKU1. Os iniciadores e as sondas dos CoVh-HKU1 e CoVh-NL63 foram projetados para detectar regiões conservadas e específicas para replicase 1b e o gene N, identificados a partir de alinhamentos de sequências disponíveis no GenBank (AY884001, DQ190472 e DQ206693-9 para HKU1e NC_005831, AY563107-8, e-82e AY758276 para NL63)(DARE *et al.*, 2007; FOUCHIER *et al.*, 2004; SLOOTS *et al.*, 2006; WOO *et al.*, 2006). A sequência dos primers e sondas dos CoVh-229E e CoVh-OC43 foram descritos em outro estudo (VAN ELDEN *et al.*, 2004)(Tabela 1). A amplificação foi realizada no modelo 7500 Real time PCR Systems (AppliedBiosystems, Carlifornia, USA) com as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo em 45°C durante 10 minutos, seguido por 1 ciclo em 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de 55°C por 1 minuto e 95°C durante 15 segundos.

Amostras foram consideradas positivas para qualquer dos CoVh pesquisados quando os valores do Cycle Threshold (C_r) foram menores que 40. O C_r é ponto no qual o sinal da fluorescência é detectado acima da linha de base em um qPCR.

Tabela 1 - Iniciadores e sondas para a reação em cadeia da polimerase em tempo real específicas para cada tipo de coronavírus.

CoVh	Sequência 5'→3'	Concentração final nmol/L	Gene Alvo	Referência
229E			Nucleoproteína	Van Elden <i>et al.</i> 2004.
Forward	CAGTCAAATGGGCTGATGCA	750		
Reverse	AAAGGGCTATAAAGAGAATAAGGTATTCT	500		
Probe*	CCCTGACGACCACGTTGTGGTTCA	50		
OC43			Nucleoproteína	Van Elden <i>et al.</i> 2004.
Forward	CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT	250		
Reverse	CCTTCCTGAGCCTTCA ATATAGTAACC	250		
Probe*	TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT	50		
NL63			Nucleoproteína	Dare <i>et al.</i> 2007.
Forward	GACCAAAGCACTGAATAACATTTTCC	500		
Reverse	ACCTAATAAGCCTCTTTCTCAACCC	750		
Probe [†]	AACACGCT“T”CCAACGAGGTTTCTCAACTGAG	50		
HKU1			Replicase 1b	Dare <i>et al.</i> 2007.
Forward	CCTTGCGAATG AATGTGCT	100		
Reverse	TTGCATCACCCTGCTAGTACCAC	750		
Probe*	TGTGTGGCGGTTGCTATTATGTTAAGCCTG	50		

* Extremidade 5' com FAM e 3' termina com BHK1.

[†] Extremidade 5' com FAM, 3' contém internamente BHK1 o qual é indicado por T e é marcado na extremidade 3' com um fosfato.

7 RESULTADOS

7.1 Caracterização da População de Estudo

Um total de 522 amostras provenientes de pacientes com pneumonia foi coletado no período de janeiro de 2011 a outubro de 2012. A distribuição anual das amostras da dessa população foi à seguinte: 284 (54,40%) no ano de 2011 e 238 (45,60%) no ano de 2012. Inicialmente, uma triagem baseada na técnica de IFI foi realizada para detecção do VSRh, ADVh, influenza A e VIPh 1, 2 e 3.

No presente estudo incluímos 423 amostras de pacientes com pneumonia que tiveram o resultado negativo pela técnica de IFI para serem analisadas através da técnica de PCR em tempo real para a detecção de quatro tipos de CoVh (229E, OC43, NL63 e HKU1).

Com relação à idade dos pacientes, foram coletadas amostras de crianças e adolescentes, entre zero e 198 meses (16 anos e cinco meses), onde foi observada uma predominância de crianças com até 24 meses de idade, que corresponderam a 71,83% dos pacientes. A média de idade geral da população de estudo foi de $24,94 \pm 2,80$ meses, sendo a média para o sexo masculino de $21,83 \pm 3,22$ meses e para o sexo feminino de $30,66 \text{ meses} \pm 2,78$.

A distribuição da população de estudo quanto ao gênero, idade, fatores de risco, comorbidade e setor de atendimento é apresentada na tabela 2. Os percentuais obtidos para fatores de risco e comorbidade foram considerados conforme o total de casos referidos na tabela.

Quanto ao sexo, foi observada uma predominância de pacientes do sexo masculino (61,22%) quando comparados aos pacientes do sexo feminino (38,78%), mas através do Teste Exato de Fisher identificamos que não há uma significância entre o percentual dos pacientes do sexo masculino e os pacientes do sexo feminino ($P=0,778$).

Em relação ao setor de atendimento, 270 (63,82%) pacientes foram atendidos na emergência e 153 (36,18) nas enfermarias (hospitalizados) do HIAS. Pôde ser observado que a média de idade dos pacientes hospitalizados foi de 23,22 meses sendo menor que a média dos pacientes atendidos na emergência que foi de 28,32 meses.

Segundo a presença de fatores de risco e comorbidades, foi observado que a grande maioria da população de estudo freqüentava creche ou escola (49,42%), em seguida crianças

que não foram amamentadas (18,73%) e pacientes que tinham fumante em sua residência (13,54%). Dentre à frequência de comorbidades, a maior parte dos pacientes apresentou asma (39,53%).

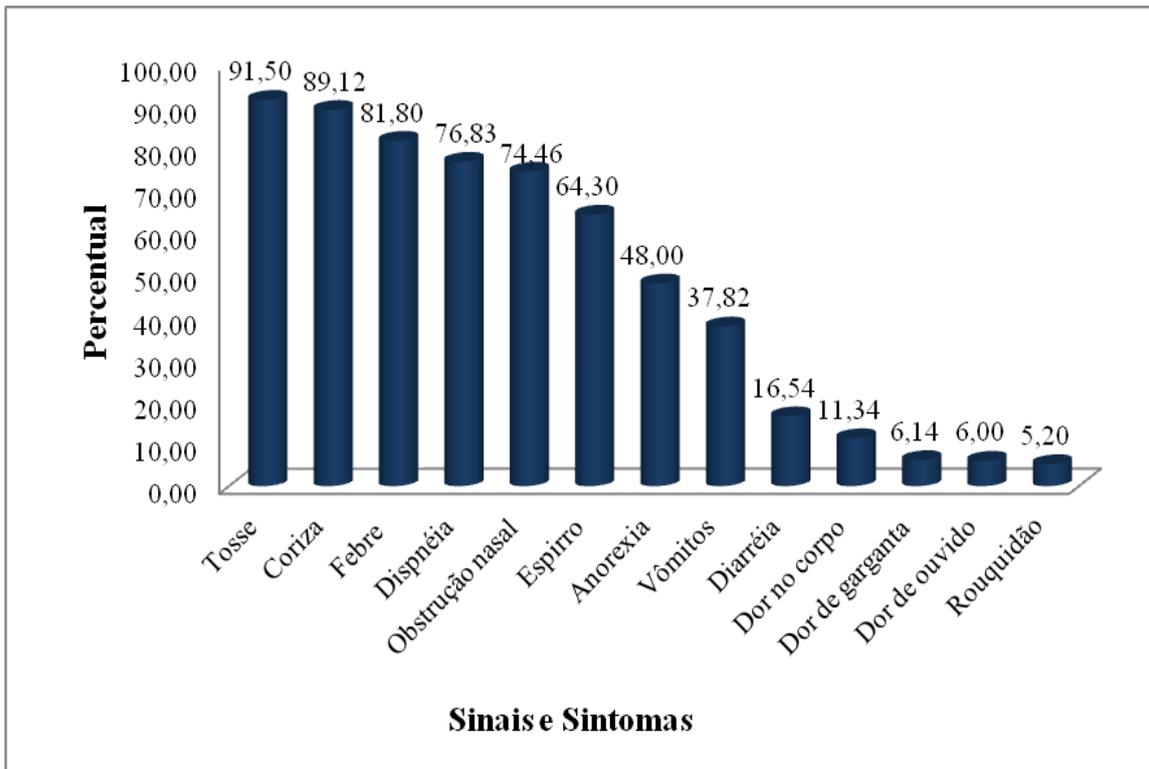
Tabela 2- Características da população de estudo

Característica	Número	Percentual
<u>Gênero</u>		
Masculino	259	61,22
Feminino	164	38,78
Total	423	100
<u>Idade (meses)</u>		
0 a 12	177	41,84
13 a 24	123	29,10
25 a 36	38	9,00
37 a 48	28	6,6
49 a 60	18	4,25
≥ 60	39	9,21
Total	423	100
<u>Fatores de Risco^(*)</u>		
Familiar com IRA	49	11,10
Fumante em casa	60	13,54
Frequenta creche/escola	219	49,43
Nunca mamou	83	18,73
Prematuridade	32	7,21
Total	443 ^(*)	100
<u>Comorbidade^(*)</u>		
Nenhuma	311	70,71
Cardiopatia	27	6,13
Pneumopatia crônica	9	2,00
Doença neurológica	19	4,31
Asma	51	11,60
Refluxo gástrico	23	5,22
Total	440 ^(*)	100
<u>Setor de Atendimento</u>		
Emergência	270	63,82
Enfermaria	153	36,18
Total	423	100

(*) Obs: Os números correspondem há um valor maior do que da população de estudo, pois alguns pacientes apresentaram mais de uma comorbidade ou fatores de risco.

Os sinais e sintomas clínicos mais frequentemente relatados foram tosse (presente em 91,50% dos casos analisados), coriza (em 89,12%), febre (em 81,80%) e dispnéia (em 76,83%) (Figura 5).

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



7.2 Coronavírus Humanos identificados nas pneumonias analisadas

As 423 amostras negativas por IFI foram então submetidas à técnica de RT-qPCR para detecção dos CoVh. Destas, 29 (6,85%) foram positivas para CoVh-229E, 24 (5,67%) para o CoVh-OC43, 24 (5,67%) para o CoVh-NL63 e 8 (1,90%) para o CoVh-HKU1. O total de detecções dos CoVh somados foi de 85 (20,10%), mas o total de amostras positivas por esses vírus foi de 71 (16,80%), sendo menor que o número de detecções, pois foram observadas co-deteções entre os CoVh em algumas amostras. Quando considerados apenas os casos positivos para os CoVh, observamos 34,11% para o tipo 229E, 28,23% para os tipos OC43 e NL63, e 9,41% para o HKU1. A Tabela 3 mostra a distribuição do número total de amostras coletadas e amostras positivas para cada tipo de CoVh.

Tabela 3 – Distribuição anual do total de casos de pneumonia e casos positivos para os CoVh..

Ano	Total de PNM ^(*)	PNM positivas para os CoVh	CoVh-229E	CoVh-OC43	CoVh-NL63	CoVh-HKU1
2011	284	36	11	15	6	7
2012	238	35	18	9	18	1
Total	522	71	29	24	24	8

(*) PNM = Pneumonias

7.3 Co-deteccões Virais

Em relação aos 71 casos para CoVh por RT-qPCR, identificamos 14 associações entre esses vírus (19,71%). O tipo 229E esteve presente em todas as co-deteccões entre os CoVh, sendo 12 (16,90%) com tipo NL63 e duas (2,81%) com tipo OC43. O CoVh-HKU1 não foi observado em nenhuma co-deteccão no período estudado. A Tabela 4 mostra a distribuição total das amostras por ano, às deteccões virais e suas respectivas co-deteccões.

Tabela 4 – Distribuição por ano de estudo, de coronavírus identificados isoladamente e em co-deteccões em relação à técnica de RT-qPCR .

PCR em tempo real						
Ano/Amostra	CoVh	229E	OC43	NL63	HKU1	Co-deteccões
2011/ 211	36	8	13	5	7	2 229E+OC43
						1 229E+NL63
2012/ 213	35	7	9	7	1	11 229E+NL63
Total	71	15	22	12	8	14

7.4 Distribuição mensal das pneumonias positivas para os Coronavírus Humanos.

As infecções pelos CoVh foram observadas na maioria dos meses do período de estudo, com exceção do mês de maio do ano de 2011 e dos meses de junho e setembro de 2012. O primeiro CoVh identificado foi o tipo OC43, que exibiu picos discretos de detecção no mês de julho 2011 e 2012. O tipo CoVh-229E foi detectado em 2011, porém no ano de 2012 este tipo de CoVh exibiu picos iguais nos meses de fevereiro e março. O CoVh-NL63 começou a ser identificado no segundo semestre de 2011 e mostrou um pico de detecção no mês de março de 2012 associado ao tipo 229E. O CoVh-HKU1 foi o menos detectado no período de estudo, sendo identificado principalmente no final de 2011 e no início de 2012. Utilizando o teste de Odds Ratio (OR) observamos uma relação positiva entre os CoVh e os meses com maior número de detecções: julho (OR:2,9882; $P=0,0047$), agosto (OR:2,9388; $P=0,0125$) e novembro (OR:2,6995; $P=0,0494$) de 2011 e fevereiro (OR:4,8286; $P=0,0001$) e março (OR:2,8000; $P=0,0027$) de 2012.

7.5 Distribuição dos casos de pneumonias, das infecções pelos Coronavírus Humanos em relação ao índice pluviométrico

Visando testar a relação do índice pluviométrico para o número total de casos de pneumonias, como para os casos positivos pelos os tipos de CoVh específicos ($P = 0,953$), foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Spearman, porém não foi observado nenhuma correlação positiva ou negativa entre a pluviometria, os casos de pneumonia e os CoVh tipo específicos ($P = 0,085$).

Figura 6 – Distribuição mensal dos casos de pneumonias e do índice pluviométrico nos período de estudo.

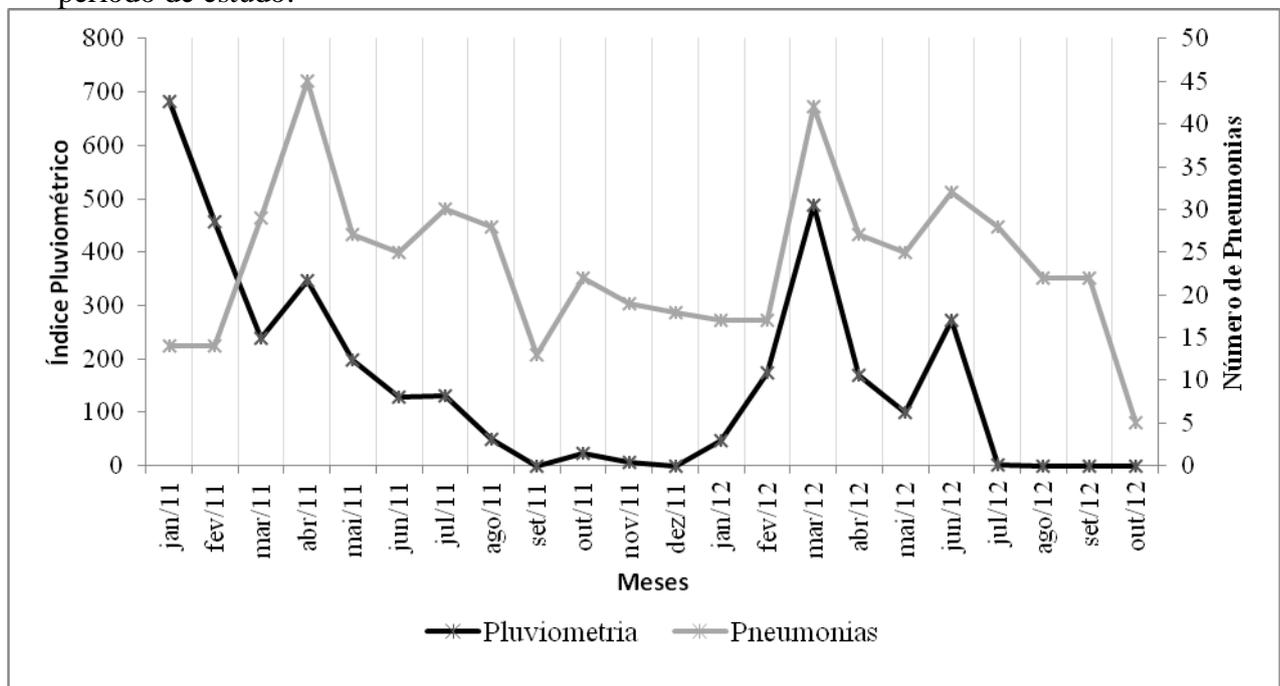


Figura 7 – Distribuição mensal das infecções pelos CoVh no período de estudo.

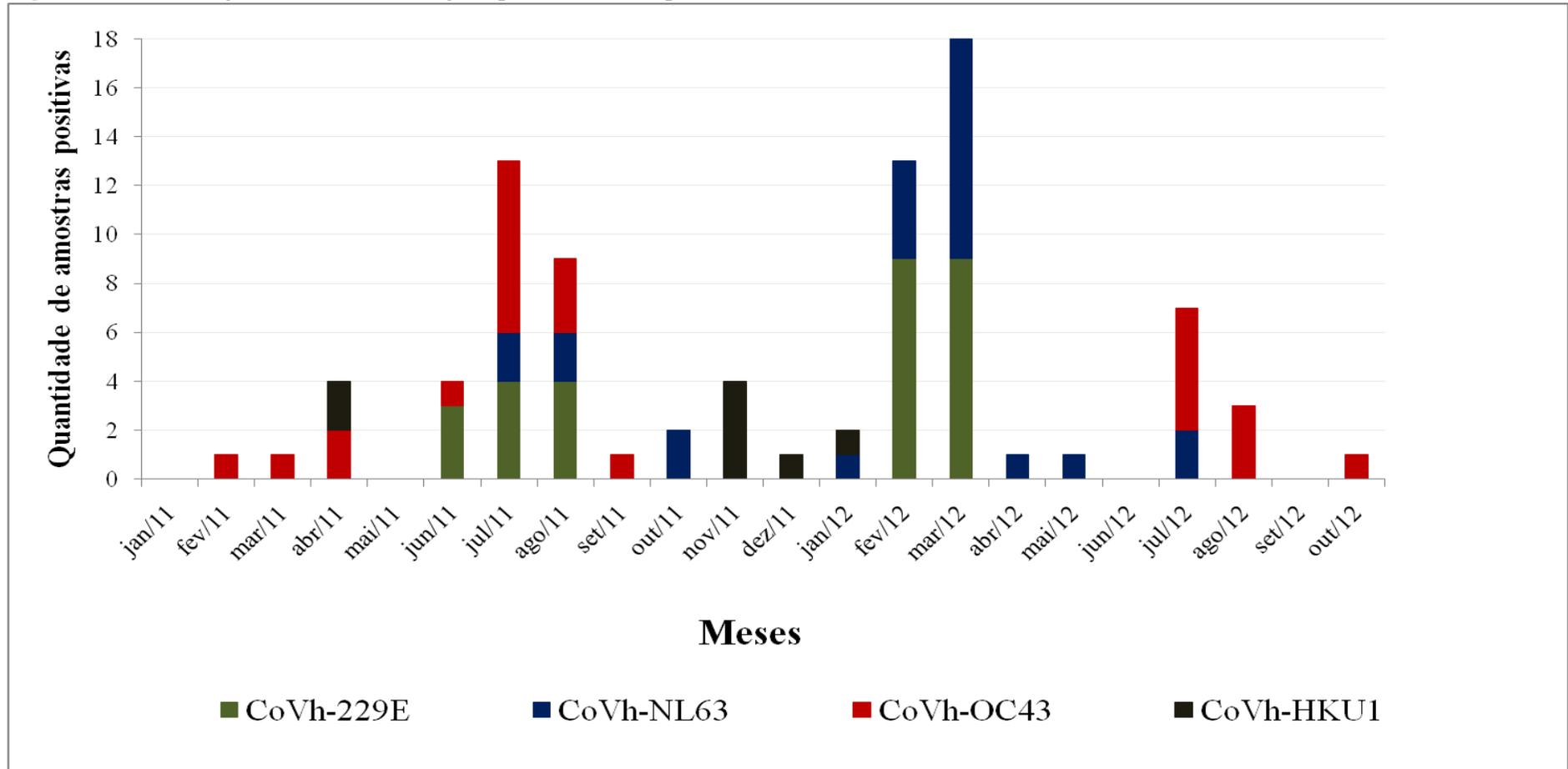
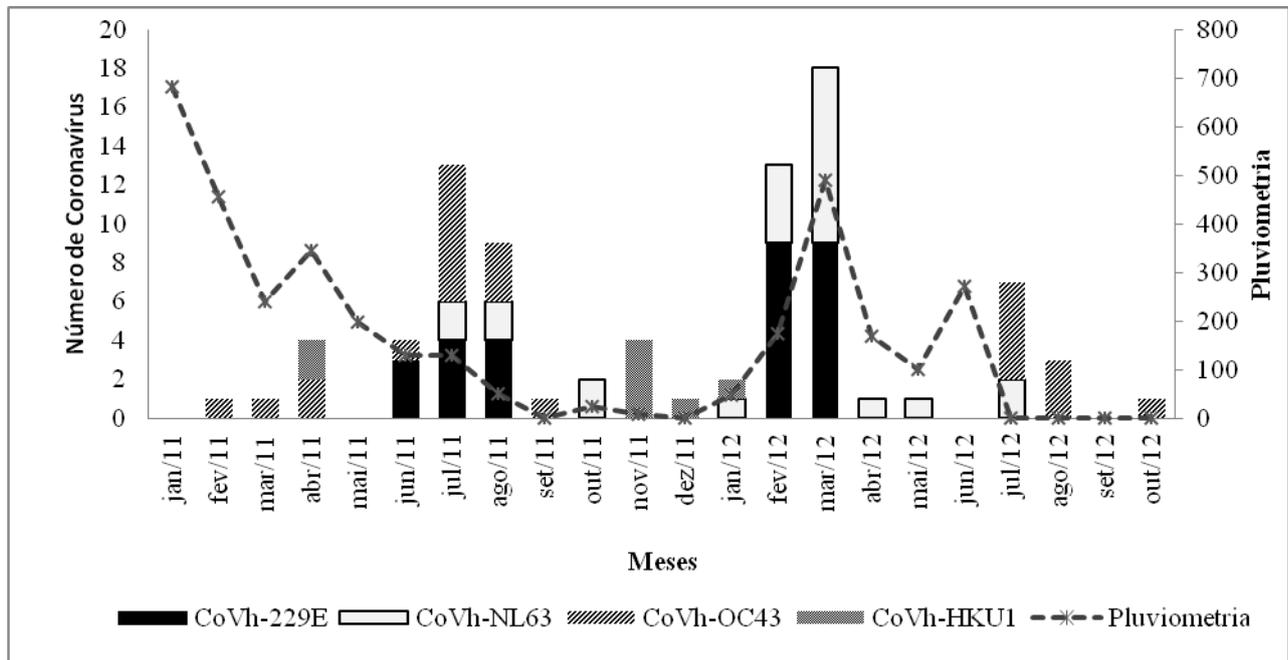


Figura 8 – Distribuição mensal dos CoVh detectados e do volume de chuvas no período de estudo.



Foi realizada a análise estatística das variáveis sexo, idade e setor de atendimento da população de estudo pelo método de OR, comparando os casos positivos e negativos para os CoVh. As distribuições dessas variáveis estão dispostas nas Tabelas 5 e 6.

7.6 Gênero

Os CoVh infectaram mais crianças do sexo masculino, onde a proporção foi de 2,7/1 (menino/menina). Para o tipo 229E, houve 23 casos (79,31%) em meninos (com 11 casos de co-infecções), e seis (20,69%) casos em meninas (com três casos de co-infecções); para o tipo OC43, houve 14 casos (58,33%) em meninos (com um caso de co-infecções), e 10 casos (41,67%) em meninas (com um caso de co-infecção); o tipo NL63 infectou 19 (79,16%) meninos (com 10 casos de co-infecções), e cinco (20,84%) meninas (com dois casos de co-infecção); por fim o tipo HKU1 infectou sete (87,50%) meninos e apenas uma (12,50%) menina, sem casos de co-deteção em ambos os sexos. Utilizando o teste de OR observamos que existe relação entre a variável sexo e os CoVh ($OR= 1.9171; P=0,0244$), este resultado estatístico mostra que a chance dos CoVh infectaram crianças do sexo masculino é mais elevada.

7.7 Idade

Os CoVh foram detectados em todos grupos etários estudados com uma maior predominância em crianças com até 24 meses de idade. A idade dos pacientes infectados pelos CoVh variou entre um a 66 meses, onde a média de idade foi de $18,17 \pm 3,59$ meses. Observamos também uma significância na faixa etária de 37 a 48 meses (OR=2.6857; $P=0.0246$). Utilizando o Teste Exato de Fisher para comparar os tipos de CoVh específicos, não encontramos características estatisticamente significativas.

7.8 Setor de Atendimento

Identificamos um maior número de detecções dos CoVh em pacientes atendidos na emergência (67,60%). Através do teste de OR analisamos os casos positivos e negativos para os CoVh em relação ao local de atendimento e não verificamos significância estatística. Utilizando o Teste Exato de Fisher, analisamos os casos positivos e negativos para cada CoVh e em relação ao setor de atendimento, mas não observamos nenhuma relevância. Utilizando o teste de OR comparamos os tipos específicos de CoVh em relação aos pacientes hospitalizados e não hospitalizados, identificamos que o tipo mais detectado em pacientes hospitalizados foi o tipo 229E, mas podemos observar uma relação estatística negativa do tipo OC43 e pacientes hospitalizados, isto significa dizer que pacientes infectados com o OC43 tinham menos chance de estarem hospitalizados.

Tabela 5 – Comparação dos casos positivos e negativos para CoVh em relação ao gênero, idade e setor de atendimento.

Característica	CoVh (n / %)		OR (95% IC*)	<i>P=Valor</i>	
	Positivo	Negativo			
<u>Gênero</u>					
Masculino	52 (73,3)	207 (58,8)	1.9171	1.0878 - 3.3787	0.0244
Feminino	19 (26,7)	145 (41,2)			
Total	71 (100)	352 (100)			
<u>Idade (meses)</u>					
0 a 12	34 (47,9)	143 (40,6)	1.3430	0.8049 - 2.2408	0.2588
13 a 24	17 (23,9)	106 (30,1)	0.5777	0.3287 - 1.0154	0.0565
25 a 36	9 (12,6)	29 (7,4)	1.9722	0.8912 - 4.3646	0.0938
37 a 48	8 (11,2)	20 (5,6)	2.6857	1.1347 - 6.3569	0.0246
49 a 60	1 (1,4)	17 (4,8)	0.3412	0.0447 - 2.6048	0.2998
> 60	2 (2,8)	37 (10,5)	0.3024	0.0712 - 1.2837	0.1049
Total	71 (100)	352 (100)			
<u>Setor de Atendimento</u>					
Emergência	48 (67,6)	222 (63,1)	1.2221	0.7107 - 2.1016	0.4684
Enfermaria	23 (32,4)	130 (36,9)			
Total	71 (100)	352 (100)			

(*): IC – Intervalo de Confiança

Tabela 6 – Comparação dos casos positivos para os CoVh específicos em relação aos pacientes hospitalizados e não hospitalizados.

CoVh	Não Hospitalizado (n/%)	Hospitalizado		OR (95% IC)	P=Valor
		(n/%)			
229E	16 (55,17)	13 (44,83)	17.604	0.7011 to 4.4201	0.2286
OC43	20 (83,33)	4 (16,67)	0.2692	0.0821 to 0.8827	0.0303
NL63	13 (54,16)	11 (45,84)	18.704	0.7100 to 4.9278	0.2052
HKU1	6 (75,00)	2 (25,00)	0.5833	0.1102 to 3.0874	0.5261
Total	55	30	-	-	-

7.9 Comorbidades

Podemos observar que a maior parte dos pacientes positivos para algum tipo de CoVh (75,30%) não apresentou nenhum tipo de comorbidade, como também os pacientes negativos (73,30%). Utilizando o Teste Exato de Fisher, verificou-se que nenhum tipo de CoVh específico apresentou diferenças estatísticas quanto as comorbidades. Observou-se que a comorbidade mais identificada entre os CoVh foi a asma, mas sem nenhuma relevância estatística ($P=0,147$). A Tabela 7 mostra a frequência dos casos positivos para cada tipo de CoVh e dos casos negativos em relação as comorbidades.

Tabela 7 – Frequência dos casos positivos ou negativos para os tipos de CoVh pesquisados em relação as comorbidades.

Comorbidades	229E	OC43	NL63	HKU1	CoVh negativos
	(n/%)	(n/%)	(n/%)	(n/%)	(n/%)
Nenhuma	20 (69)	19 (79,16)	20 (83,33)	5 (62,50)	258 (73,30)
Cardiopatía	1 (3,44)	1 (4,16)	1 (4,16)	-	20 (5,68)
Pneumopatia crônica	1 (3,44)	-	-	-	4 (1,13)
Doença neurológica	-	-	-	-	13 (3,70)
Asma	3 (10,34)	3 (12,50)	3 (12,50)	2 (25,00)	35 (9,94)
Refluxo gástrico	2 (6,88)	-	-	-	14 (3,97)
Cardiopatía e Refluxo gástrico	1 (3,44)	1 (4,16)	-	-	-
Cardiopatía e Asma	1 (3,44)	-	-	-	-
Asma e Refluxo gástrico	-	-	-	1 (12,50)	2 (0,56)
Total	29 (100)	24(100)	24(100)	8 (100)	346 (100)

7.10 Fatores de Risco

Observamos que os pacientes que frequentavam creches ou escola estavam mais associados aos CoVh (38,82%). Quanto aos pacientes negativos o maior percentual foi de pacientes que não apresentaram nenhum fator de risco (28,97%). Utilizando o Teste Exato de Fisher relacionamos os casos positivos para cada tipo específico de CoVh e para cada fator de risco. Identificamos que o 229E não apresentou relevância estatística quando comparado aos fatores de risco; o tipo OC43 foi mais detectado em pacientes que frequentavam creche ou escola ($P=0,010$), o NL63 também foi mais observado em pacientes que frequentavam creche ou escola ($P=0,019$), mas da mesma forma apresentou significância estatística em para pacientes que não apresentaram fatores de risco ($P=0,036$); O tipo HKU1 mostrou uma importância estatisticamente significativa apenas em pacientes que tinham algum fumante em casa ($P=0,041$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação aos fatores de risco.

Fatores de Risco	229E (n/%)	OC43 (n/%)	NL63 (n/%)	HKU1 (n/%)	CoVh Negativos (n/%)
Nenhum	4 (13,80)	1 (4,16%)	7 (29,16)	1 (12,50)	102 (28,97)
Familiar com IRA	2 (6,89)	2 (8,33%)	2 (8,33%)	-	11 (3,12)
Fumante em casa	-	-	1 (4,16%)	1 (12,50)	18 (5,11)
Frequenta creche/escola	12 (41,37)	11 (45,83)	8 (33,34)	2 (25,00)	96 (27,27)
Não amamentado	3 (10,34)	1 (4,16%)	2 (8,33%)	-	19 (5,39)
Prematuridade	-	-	1 (4,16%)	-	7 (1,98)
Familiar com IRA e Fumante em casa	-	-	-	1 (12,50)	3 (0,85)
Familiar com IRA e Frequenta creche/escola	2 (6,89)	2 (8,33%)	1 (4,16%)	1 (12,50)	10 (2,84)
Fumante em casa e Não amamentado	2 (6,89)	-	-	1 (12,50)	6 (1,70)
Frequenta creche/escola e Não amamentado	3 (10,34)	3 (12,5)	2 (8,33%)	1 (12,50)	26 (7,38)
Frequenta creche/escola e Prematuridade	1 (3,44)	1 (4,16%)	-	-	9 (2,55)
Fumante em casa e Frequenta creche/escola	-	2 (8,33%)	-	-	15 (4,26)
Não amamentado e Prematuridade	-	1 (4,16%)	-	-	2 (0,56)
Total	29	24	24	8	324

7.11 Sinais e Sintomas Apresentados

Com relação aos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes, analisamos através do OR e do Teste Exato de Fisher comparando os casos positivos para cada CoVh e os casos negativos. Identificamos que a tosse, coriza, febre e dispnéia foram os sintomas mais frequentes nos pacientes positivos para os CoVh, quando comparamos os casos positivos e negativos encontramos significância estatística positiva apenas para os pacientes que apresentaram tosse ($P = 0.045$), demonstrando que os pacientes positivos para os CoVh tinham uma chance maior de apresentarem tosse do que os pacientes negativos. Quanto aos tipos específicos de CoVh, utilizando-se do Teste Exato de Fisher, apenas o OC43 apresentou uma relevância com a obstrução nasal ($P=0,029$) e o HKU1 com a coriza ($P=0,027$), mostrando uma relação positiva desses vírus com estes sintomas. A distribuição dos casos positivos para os CoVh e dos casos negativos em relação aos sinais e sintomas estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Distribuição dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação aos sinais e sintomas apresentados pela população de estudo.

Sinais e Sintomas	CoVh Positivos (%)	CoVh Negativos (%)	OR (95% IC)		P-Valor
Tosse	70 (98,59)	317 (90,05)	7.7287	1.0412 - 7.3703	0.0456
Coriza	64 (90,14)	313 (88,92)	1.3884	0.5982 - 3.2222	0.4449
Febre	58 (81,70)	288 (81,81)	0.6236	0.3761 - 1.0339	0.0672
Dispnéia	55 (77,46)	270 (76,70)	1.0550	0.5984 - 1.8599	0.8532
Obstrução nasal	50 (70,42)	265 (75,28)	0.7879	0.4658 - 1.3329	0.3742
Espirro	42 (59,15)	230 (65,34)	0.7957	0.4892 - 1.2940	0.3569
Anorexia	27 (38,02)	176 (50,00)	0.6136	0.3638 - 0.9816	0.0671
Vômitos	24 (33,80)	136 (36,63)	0.8225	0.5003 - 1.3521	0.4410
Diarréia	13 (18,30)	57 (16,19)	1.0205	0.5384 - 1.9344	0.9504
Dor de garganta	2 (2,81)	24 (6,81)	0.5000	0.1470 - 1.7011	0.2672
Rouquidão	2 (2,81)	20 (5,68)	0.4000	0.0917 - 1.7455	0.2229
Convulsões	1 (1,40)	4 (1,13)	0.5840	0.0299 - 11.4128	0.7228
Exantema	-	-	-	-	-
Conjuntivite	-	3 (0,85)	1.0357	0.1143 - 9.3873	0.9751
Total	71 (100)	352 (100)	-	-	-

7.12 Exame Físico dos Pacientes

Analisando os casos positivos para os CoVh e os casos negativos em relação a ausculta pulmonar utilizando o teste de OR, podemos dizer que não existe diferenças estatísticas significantes quando comparado os casos positivos totais para os CoVh e os casos

negativos. Quando comparamos os CoVh específicos com a ausculta pulmonar, identificamos que o tipo 229E esteve mais associado a pacientes que apresentaram roncosp na ausculta (OR:2,7937; $P=0,0343$) e o tipo OC43 foi mais detectado em pacientes que apresentaram roncosp (OR: 3,1731; $P=0,0500$) e sibilosp (OR: 3,4672; $P=0,0012$). Na Tabela 10 é demonstrado a frequência dos casos positivos para cada tipo de CoVh e negativos em relação a ausculta pulmonar.

Tabela 10 - Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação a ausculta pulmonar.

Ausculta Pulmonar	CoVh-229E (n/%)	CoVh-OC43 (n/%)	CoVh-NL63 (n/%)	CoVh-HKU1 (n/%)	CoVh Negativos (n/%)
Normal	-	1 (4,16)	-	1 (12,50)	18 (5,38)
Sibilosp	-	2 (8,33)	1 (4,16)	-	20 (6,00)
Roncosp	9 (31,03)	8 (33,33)	8 (33,33)	3 (37,50)	107 (32,03)
Estertores	1 (3,44)	1 (4,16)	2 (8,33)	1 (12,50)	24 (7,18)
Roncosp e Sibilosp	10 (34,48)	8 (33,33)	7 (29,16)	2 (25,00)	100 (29,90)
Sibilosp e Estertores	6 (20,70)	-	4 (16,66)	1 (12,50)	21 (6,28)
Roncosp e Estertores	2 (6,90)	3 (12,50)	2 (8,33)	-	34 (10,17)
Roncosp e Sibilosp e Estertores.	1 (3,44)	1 (4,16)	-	-	10 (3,00)
Total	29 (100)	24 (100)	24 (100)	8 (100)	334^(*) (100)

OBS(*): O número de pacientes que apresentou algum tipo de ausculta pulmonar disponível no banco de dados.

Quanto aos pacientes que apresentaram tiragem intercostal, utilizando o teste de OR identificamos que a maior parte dos pacientes positivos para os CoVh apresentou tiragem intercostal, subclavicular ou subdiafragmática (62,00%). Observamos que não existe relação significativamente estatística entre os casos positivos totais de CoVh e dos casos negativos quando comparados aos pacientes com tiragem (OR: 1,2302; $P=0,3978$), da mesma forma não houve diferença estatística entre os casos positivos para cada tipo de CoVh e os pacientes com presença de tiragem. A frequência dos casos positivos para cada tipo de CoVh e dos casos negativos em relação a presença e ausência de tiragem é demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação a presença e ausência de tiragem.

CoVh	Presença de Tiragem (n/%) ^(*)	Ausência de Tiragem (n/%)	Total
229E	17 (58,62)	12 (41,38)	29
OC43	9 (37,50)	15 (62,50)	24
NL63	13 (54,16)	11 (45,84)	24
HKU1	5 (62,50)	3 (37,50)	8
CoVh Negativo	164 (46,60)	188 (53,40)	352

OBS (*): Tiragem intercostal, subclavicular e subdiafragmática.

7.13 Alterações no Exame Radiológico

Na análise das alterações radiológicas apresentadas pelos pacientes positivos para algum tipo de CoVh, identificamos que a alteração mais observada foi a condensação (70,60%) seguido do infiltrado intersticial (33%). Através do teste de OR comparamos os casos positivos para os CoVh específicos em relação as alterações radiológicas e identificamos que os pacientes com infiltrado intersticial tem menor chance de estarem infectados com o tipo NL63 (OR:0,3214; $P=0,0228$) e os pacientes com condensação tem uma menor possibilidade de estarem infectados pelo tipo HKU1 (OR: 0,1258; $P=0,0156$). Na Tabela 12 é exibida a frequência dos casos positivos para os CoVh específicos e dos casos negativos em relação as alterações radiológicas.

Tabela 12 - Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação as alterações radiológicas.

Alteração Radiológica	229E (n/%)	OC43(n/%))	NL63(n/%))	HKU1(n/%))	CoVh negativos (n/%)
Condensação	17 (58,62)	16 (66,70)	16 (66,70)	2 (25,00)	170 (54,66)
Infiltrado intersticial	5 (17,24)	6 (25,00)	4 (16,66)	4 (50,00)	94 (30,22)
Hiperinsuflação	-	-	-	1 (12,00)	5 (1,60)
Condensação e Infiltrado	3 (10,34)	2 (8,30)	4 (16,66)	-	34 (10,93)
Infiltrado e hiperinsuflação	-	-	-	-	3 (0,96)
Condensação e Atelectasia	-	-	-	-	3 (0,96)
Atelectasia	1 (3,45)	-	-	-	2 (0,64)
Derrame Pleural	3 (10,34)	-	-	1 (12,00)	-
Total	29	24	24	8	311 ^(*)

OBS(*):O número de pacientes que apresentou algum tipo de alteração radiológica é inferior ao total, pois alguns pacientes não tiveram o exame solicitado pelo médico.

7.14 Conduta Terapêutica Medicamentosa

Em relação à conduta terapêutica pelo médico que atendia o paciente, foi analisado o uso de antitérmico, aerossol, agonista B₂, glicocorticóide e antibióticos. Através do teste de OR comparamos os casos positivos para os CoVh e os casos negativos em relação cada um destes tratamentos, onde identificamos que apenas o uso de antibiótico teve uma relação negativa para os casos positivos para os CoVh, ou seja, os pacientes infectados pelos CoVh tinham menos chance de serem tratados com antibiótico do que os pacientes negativos (OR:0,3707; $P=0,0068$).

Utilizando o teste de OR para comparação dos casos positivos para os CoVh específicos em relação ao tratamento instituído, podemos observar que apenas o tipo OC43 mostrou uma correlação positiva com o uso de antibiótico, isto é, este tratamento tem maior chance de ser instituído em pacientes infectado com esse tipo de CoVh (OR: 3,6571; $P=0,0026$)

Tabela 13 - Frequência dos casos positivos e negativos para os CoVh pesquisados em relação ao conduta terapêutica medicamentosa.

Conduta Terapêutica Medicamentosa	229E (n/%)	OC43 (n/%)	NL63 (n/%)	HKU1 (n/%)	CoVh negativo (n/%)	Total
Antitérmicos	10 (34,48)	13 (54,16)	10 (41,66)	5 (62,50)	169 (48,01)	207
Aerossol	18 (62,06)	15 (62,50)	15 (62,50)	4 (16,66)	225 (63,92)	277
Agonista B ₂	2 (6,90)	4 (16,66)	1 (4,16)	2 (8,33)	42 (11,93)	51
Glicocorticóide	10 (34,48)	12 (50,00)	8 (33,33)	5 (62,50)	131 (37,21)	166
Antibióticos	24 (82,75)	23 (95,83)	17 (70,83)	5 (62,50)	256 (72,72)	325
Total	29 (100)	24 (100)	24 (100)	8 (100)	352 (100)	423

7.15 Descrição do Cyclo Threshold (C_T) das amostras positivas para os CoVh em relação idade e as comorbidades apresentadas

Identificamos que 39% das crianças que apresentaram algum tipo de comorbidade estavam com os valores de $C_T < 30$. Já em todos os pacientes com coinfeções, os valores de C_T estavam acima de 30. Observamos que todas as crianças que estavam acometidas pelo tipo HKU1 e apresentaram comorbidades tinham o $C_T < 30$, demonstrando uma alta carga viral. Em relação à idade dos pacientes, verificamos que 24,70% das crianças estavam com os valores de $C_T < 30$, sendo o tipo OC43 com a maior parte dos casos. A maioria das coinfeções apresentou um C_T acima de 30, mostrando uma menor carga viral.

Tabela 14– Descrição dos valores C_T dos CoVh específicos e das coinfeções em relação às comorbidades.

Comorbidades	229E			OC43			NL63			HKU1			229E + OC43		229E + NL63	
	≤30	>30-≤35	<40	≤30	>30-≤35	<40	≤30	>30-≤35	<40	≤30	>30-≤35	<40	≤30	>30-≤40	≤30	>30-≤40
Cardiopatia	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Pneumopatia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asma	-	2	1	1	1	-	1	-	1	3	-	-	-	-	-	1
Refluxo gástrico	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Total	1	2	3	2	1	-	1	-	1	3	-	-	-	2	-	2

Tabela 15 - Descrição dos valores C_T dos CoVh específicos e das coinfeções em relação à idade dos pacientes.

Idade	229E			OC43			NL63			HKU1			229E + OC43		229E + NL63	
	≤30	>30-≤35	<40	≤30	>30-≤35	<40	≤30	>30-≤35	<40	≤30	>30-≤35	<40	≤30	>30-≤40	≤30	>30-≤40
0 a 12	3	2	3	3	4	2	1	3	3	2	-	-	-	2	1	6
13 a 24	1	-	4	4	1	1	-	-	2	1	-	-	-	-	-	1
25 a 36	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	3
37 a 48	-	-	-	1	-	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-
49 a 60	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
> 60	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Total	4	4	7	8	6	4	3	3	6	5	1	-	-	2	1	11

8 DISCUSSÃO

Este estudo representa a primeira análise sobre a ocorrência dos CoVh no estado do Ceará, nordeste do Brasil, embora sendo em um período curto foi possível detectar quatro tipos de CoVh circulantes em nosso estado através de uma técnica molecular bastante sensível e específica. Até o presente momento, existe apenas um estudo em nossa região que envolveu os quatro tipos de CoVh e outros vírus respiratórios, onde foram analisadas, no período de um ano, amostras de crianças com o diagnóstico de IRA (BEZZERA *et al.*, 2011).

A positividade dos CoVh encontrada no estudo aqui apresentado foi de 16,80% de 423 amostras de pacientes com pneumonia, onde todos os tipos de CoVh pesquisados foram detectados nos dois anos estudados (2011 e 2012). A alta taxa de detecção encontrada no presente estudo foi superior à taxa verificada em diversos estudos descritos na literatura mundial que variou de 1% a 14%. Observamos que o estudo com o percentual mais baixo (1%) dentre os analisados foi realizado na China por Renet *et al.*, no ano de 2011, utilizando a técnica de RT-PCR e sequenciamento para pesquisa de quatro tipos de CoVh (OC43, 229E, NL63 e HKU1) em um período de quatro anos de estudo. Já o estudo com a maior taxa de CoVh identificados (14%) foi realizado no Holanda por Dijkiman *et al.*, no ano de 2010, utilizando a técnica de qPCR e ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbent Assay) para detecção dos mesmos quatro tipos de CoVh citados acima.

Estudos que utilizaram metodologias moleculares realizados no Brasil mostram um percentual de positividade dos CoVh que varia de 1,2% a 11,5%. Dessa forma, identificamos que nossos dados superam o índice de positividade dos CoVh em estudos nacionais. O estudo com o menor percentual foi realizado na cidade de São Paulo por Cabeça *et al.*, no ano de 2012, utilizando-se da técnica de RT-PCR para detecção apenas dos tipos NL63 e OC43 em um período de um ano. Observamos que o estudo com o maior percentual foi realizado também por Cabeça *et al.*, em 2012, utilizando a técnica de RT-PCR, mas para detecção de quatro tipos de CoVh em período de nove anos. Vale destacar, que no primeiro estudo realizado no Brasil por Candeias, Carvalho e Antonacio (1972), analisando amostras de crianças e adolescentes com IRA através de uma técnica imunológica (fixação do complemento) para detecção do tipo 229E, foi encontrado um percentual de positividade de 19,80%, superando a taxa encontrada neste presente estudo. Alguns fatores podem

influenciar nas variações das taxas de detecção dos CoVh encontradas em diversos estudos analisados como as diferentes populações que compuseram os estudos, o período de estudo, síndromes clínicas analisadas, amostra clínica, métodos de detecção empregados e os tipos de CoVh pesquisados. Comparação dos percentuais de positividade dos CoVh de diversos estudos mundiais e nacionais, destacando os autores do estudo, local do estudo, população de estudo, CoVh pesquisados e metodologia diagnóstica estão dispostos no Apêndice C.

Os CoVh são geralmente descritos em associações com outros vírus respiratórios, como o vírus influenza, ADVh, VSR, rinovírus, metapneumovírus (MPVh), bocavírus e vírus parainfluenza (ARDEN *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2011; CABEÇA; GRANATO; BELLEI, 2013; GERNA *et al.*, 2006.) No presente estudo não verificamos coinfeções com outros vírus respiratórios, pois não analisamos amostras de pneumonia positivas por IFA. Entretanto, identificamos uma taxa de 19,71% de associações entre os CoVh, dessa forma, podemos observar que o índice encontrado em nosso estudo é superior as taxas encontradas em diversos trabalhos que utilizaram metodologias moleculares descritos na literatura que variou de 0,74% a 5% (DOMINGUEZ; ROBINSON; HOLMES, 2009; DOMINGUEZ *et al.*, 2012; GORSE *et al.*, 2009; KAISER *et al.*, 2005; PRILL *et al.*, 2012; SLOOT *et al.*, 2009; THEAMBOLEARS *et al.*, 2007; VABRET *et al.*, 2005; VABRET *et al.*, 2008). Alguns trabalhos encontraram associações entre os CoVh (OC43 + HKU1 e OC43 + NL63) que não detectamos no estudo aqui apresentado (PRILL *et al.*, 2012; SLOOT *et al.*, 2006; VABRET *et al.*, 2005; VABRET *et al.*, 2008).

A importância das infecções simultâneas por mais de um agente viral se deu após a introdução da técnica de PCR, que permitiu a ampliação do número de vírus e a detecção de mais de um vírus na mesma amostra de secreção respiratória (CANDUCCI *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2011). Contudo, o significado das coinfeções é controverso e ainda não claramente definido, pois alguns estudos apresentam diferentes aspectos relacionados ao tema. Apesar de ainda não estar claro se casos de coinfeções de CoVh com outros vírus respiratórios, ou mesmo entre CoVh, têm influência na maior severidade de sintomas clínicos respiratórios (ABDUL-RASOOL; FIELDING, 2010; ESPOSITO *et al.*, 2006), a coinfeção em um mesmo paciente pode potencializar a geração de novas cepas virais através do evento de recombinação genética entre as linhagens virais (ABDUL-RASSOL *et al.*, 2010). A co-detecção de diferentes vírus respiratórios ou CoVh em uma mesma amostra pode representar uma coinfeção real ou apenas a liberação prolongada de um tipo viral proveniente de uma

infecção anterior, sendo difícil identificar qual dos vírus é responsável pela sintomatologia clínica (ESPOSITO *et al.*, 2007; KAISER *et al.*, 2005).

Vieira *et al.*, no ano 2011, trabalhando com lactentes admitidos no Hospital Universitário da USP, utilizando metodologias de diagnóstico molecular para detecção de vírus respiratórios, relatam não observar diferenças marcantes em indivíduos com infecção simples e com associações virais. Ao contrário, Semple *et al.*, relatam que a coinfeção dos vírus VSR + MPVh conferiu um aumento de 10 vezes no risco relativo para admissão em unidade de terapia intensiva para ventilação mecânica. Gerna *et al.*, demonstra significativamente que a associação dos CoVh pode ser relacionada a síndromes clínicas mais graves, sendo identificada uma taxa de 60% em pacientes com doenças respiratórias no trato inferior em comparação com menos de 10% em pacientes com infecção simples. Em nossos dados aqui apresentados não identificamos diferenças significativas relacionadas aos pacientes coinfectados e não coinfectados. Fatores distintos podem influenciar na divergência desses estudos, como as características não avaliadas das populações estudadas ou mesmo de diferentes subtipos virais e a interação com fatores ambientais (SEMPLE *et al.*, 2005; CILLA *et al.*, 2008).

A pesquisa diagnóstica das infecções respiratórias virais, principalmente aquelas causadas pelos CoVh, são dependentes da qualidade da amostra clínica, do seu manuseio e das metodologias empregadas. Embora o lavado broncoalveolar seja um ótimo espécime de escolha, pois os CoVh se mostraram predominantes neste tipo de amostra em relação a outros vírus respiratórios (GARBINO *et al.*, 2009), por conveniência a amostra clínica analisada em nosso estudo foi o aspirado de nasofaringe, que têm-se mostrado ligeiramente mais sensível que o swab nasofaríngeo (HEIKKINEN *et al.*, 2002).

A técnica de identificação viral utilizada foi o qPCR genótipo-específico, onde foi possível usar um mesmo painel para detecção de 4 tipos de CoVh com as mesmas condições de amplificação. Este método facilita a análise de ocorrência destes vírus, aumentando a sensibilidade e a especificidade, além de aumentar a rapidez no diagnóstico, diferente de metodologias sorológicas que em alguns casos consomem certo tempo e não possuem significância clínica. Vale ressaltar, que anticorpos monoclonais para diferentes CoVh não estão ainda disponíveis para rotina e ainda são necessários estudos sobre a reatividade cruzada desses anticorpos (KAHN; MCINTOSH, 2005; VALLET *et al.*, 2004; VIJGEN *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Myntet *et al.*, no ano de 1994, relata a comparação da sensibilidade de

métodos sorológicos em relação a técnicas de biologia molecular para detecção dos tipos 229E e OC43, onde o Nested PCR se mostrou mais sensível que as técnicas de cultura celular e ELISA, porém a junção destas duas metodologias foi mais eficaz do que o Nested PCR. Há diferenças na sensibilidade até entre as próprias técnicas moleculares, pois Góes no ano de 2012, utilizando técnicas moleculares diferentes, pôde identificar uma maior sensibilidade do teste de qPCR pancoronavírus em relação ao PCR convencional direcionado à polimerase como gene alvo, pois apenas 43,6% das amostras positivas por qPCR pancoronavírus apresentaram-se também positivas pelo PCR convencional.

Não verificamos qualquer associação entre a estação chuvosa ou seca nos dois anos de estudo com a ocorrência de CoVh, ao contrário do já demonstrado para o VSR, influenza e parainfluenza em nossa região (FÉ; MONTEIRO; MOURA, 2008; MOURA *et al.*, 2006; MOURA; PERDIGÃO; SIQUEIRA, 2009). Até o presente momento não encontramos relatos na literatura que relacionam os CoVh com dados sobre pluviosidade.

Os CoVh apresentam uma tendência de circulação no período de inverno e primavera, como já descritos em estudos tanto em países de clima temperado como de clima tropical (CHIU *et al.*, 2005; DOMINGUEZ; ROBINSON; HOLMES, 2009; KUYPERS *et al.*, 2009; LAU *et al.*, 2006; LEUNG *et al.*, 2012; MACKAY; ARDEN; SPEICHER, 2012; PRILL *et al.*, 2012; WOO *et al.*, 2005). Embora a distinção entre as estações do ano não sejam bem definidas no nordeste do Brasil, onde o clima é tropical e ocorre pouca variação de temperatura ao longo do ano, nossos achados foram semelhantes aos de alguns estudos em países de clima temperado como a China, a Austrália e os EUA (JIN *et al.*, 2011; MACKAY; ARDEN; SPEICHER, 2012; PRILL *et al.*, 2012) e de clima subtropical como em Hong Kong (LEUNG *et al.*, 2012).

Pouco ainda se sabe sobre a epidemiologia e os aspectos sazonais dos CoVh em território nacional, pois a baixa quantidade de amostras e o curto período de estudo tornam difícil a comparação do padrão sazonal dos CoVh. Mas alguns estudos como o de Góes (2012), que trabalhou com a detecção dos quatro tipos de CoVh na cidade de São Paulo em um período de estudo de 14 anos, utilizando diferentes técnicas de análise molecular, conseguiu demonstrar uma maior circulação desses vírus nos meses de agosto, setembro e dezembro. Cabeça, Granato e Bellei (2013), trabalhando também com quatro tipos de CoVh na cidade de São Paulo em um período de nove anos, identificou uma frequência dos CoVh

nos meses de inverno. O único estudo na região nordeste, foi realizado por Bezerra *et al.*, no ano de 2011, onde não é informada a frequência mensal dos CoVh.

Durante os dois anos estudados podemos identificar diferenças anuais na circulação dos CoVh, com um tipo viral sendo predominante no primeiro ano e um tipo diferente predominando no ano seguinte. A alternância da prevalência dos CoVh, parece envolver a diversidade de genótipos dentro de um mesmo grupo, o que não foi objeto de análise neste estudo. Tais variações na ocorrência de cada tipo antigênico dos CoVh já foram descritas em estudos anteriores (DARE *et al.*, 2007; GAUNT *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2011; VAN DER HOEK *et al.*, 2010).

Identificamos que em todo período de estudo ocorreu a co-circulação dos quatro tipos de CoVh. Renet *et al.* (2011), analisando a circulação os CoVh, observou uma co-circulação dos quatro tipos de CoVh durante quatro anos em seu estudo. Talbot *et al.* (2009), trabalhando com apenas três tipos de CoVh em um período de 20 anos, também observou a co-circulação destes vírus em três anos de estudo. Em nossos dados também identificamos a co-circulação mensal de três tipos de CoVh, mas apenas no primeiro ano de estudo, já a co-circulação de dois tipos ocorreu apenas no segundo ano. Dados sobre co-circulação mensal dos CoVh não é comum na literatura, porém foram descritos anteriormente (CABEÇA; GRANATO; BELLEI, 2013; GÓES *et al.*, 2011; KUYPERS *et al.*, 2007).

Dentre os tipos de CoVh detectados, o 229E foi o mais frequente, correspondendo a 34,11% e sendo observado em meses do período chuvoso em nosso estado. Estes dados estão em concordância com poucos trabalhos que utilizaram técnicas de biologia molecular, onde foi observada uma variação de 26% a 42% deste CoVh no total de amostras positivas (GERNA *et al.*, 2007; PAPPA *et al.*, 2007). No entanto, a maioria dos estudos encontrados na literatura divergem dos nossos resultados, onde os tipos mais comumente detectados são OC43 e NL63 (CANUCCI *et al.*, 2008; CHUNG *et al.*, 2007; DOMINGUEZ; ROBINSON; HOLMES, 2009; KISTLER *et al.*, 2007; KUYPERS *et al.*, 2007; PIERANGELI *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2011; TALBOT *et al.*, 2009). Do mesmo modo, estudos que trabalharam na detecção de pelo menos dois tipos de CoVh no Brasil também exibiram um nível maior de detecção dos tipos OC43 e NL63. O trabalho mais recente em território nacional foi realizado por Cabeça, Granato e Bellei (2013), que utilizou a técnica de qPCR para identificação de quatro CoVh, onde observaram o tipo NL63 como o vírus mais frequente e o tipo 229E como o menos frequente. Vale destacar que na maior parte dos estudos nacionais como em outros

países o tipo 229E é geralmente o CoVh menos detectado, mostrando uma divergência dos nossos achados. A utilização de uma técnica sensível como a RT-qPCR e inclusão apenas de pacientes pediátricos com o diagnóstico de pneumonia podem ter contribuído para a diferença de detecção observada em relação ao genótipo 299E, sendo importante ressaltar que com o auxílio de uma metodologia sensível, este CoVh pode ser detectado até 3 meses em amostras respiratórias, fato que pode também ter ocorrido no estudo aqui apresentado.

O CoVh-OC43 foi observado em 28,23% das amostras positivas. Surtos do tipo OC43 já foram relatados na literatura, onde este vírus pode chegar a até 40% do total de infecções positivas para os CoVh (VENTER *et al.*, 2011). Identificamos uma maior frequência de detecção desse vírus nos meses de julho e agosto nos dois anos de estudo. Dessa forma, podemos verificar que este CoVh foi principalmente detectado em um período seco em nossa região, porém este tipo de CoVh é em geral observado no período de inverno (ARDEN *et al.*, 2006; CHIU *et al.*, 2005; LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007; LAU *et al.*, 2006; LEUNG *et al.*, 2012; MOES *et al.*, 2005), dado que não podemos comparar, pelo fato de nossa região não possuir um inverno definido.

O tipo NL63 teve o mesmo número de detecções que o OC43, sendo também observado em 28,23% do total de amostras positivas. Alguns relatos na literatura demonstram uma variação desse vírus de 0% a 48% (ABDUL-RASOOL; FIELDING, 2010; ARDEN *et al.*, 2005; ESPER *et al.*, 2005; KISTLER *et al.*, 2007; LIEN Do *et al.*, 2011; VENTER *et al.*, 2011). Estudos no Brasil demonstraram uma variação na detecção desse vírus de 1,5% a 50% das amostras analisadas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; CABEÇA *et al.*, 2012; CABEÇA; GRANATO; BELLEI, 2013; DA SILVA FILHO *et al.*, 2012). O CoVh-NL63 foi frequentemente detectado no segundo ano de estudo em meses do período chuvoso. Contudo Abdul-Rasool *et al.* (2010), através de diversas análises sobre este tipo de CoVh, concluíram que o NL63 não possui uma sazonalidade, dessa maneira, não possui predisposição por estações do ano, clima ou temperatura satisfatória.

Apesar do CoVh-NL63 ter sido descoberto há apenas uma década, este vírus foi isolado em amostras de 1988 por Fouchier *et al.*, no ano de 2004, em amostras de 1981 no estudo Talbot *et al.* (2009) e posteriormente em amostras de 1998 no trabalho de Góes (2012). A partir destes achados, aliados a análises moleculares e evolucionárias entre os CoVh, indicam que o tipo NL63 pode estar circulando há pelo menos 10 séculos na população (ABDUL-RASOOL; FIELDING, 2010).

O tipo HKU1 foi o menos observado em nosso estudo, estando presente em apenas 9,4% das amostras positivas analisadas. Considerando estudos nacionais e internacionais sobre o CoVh-HKU1, identificamos uma variação em sua taxa de detecção de 0% a 24% (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; BOSIS *et al.*, 2008; CANDUCCI *et al.*, 2008; DARE *et al.*, 2007; DOMINGUEZ; ROBINSON; HOLMES, 2009; ESPER *et al.*, 2006; GAUNT *et al.*, 2010; KUYPERS *et al.*, 2007; LEUNG *et al.*, 2012; MACKAY; ARDEN; SPEICHER, 2012).

É sugerido que a característica da infecção por um tipo de CoVh pode estimular parcialmente o sistema imune contra uma infecção posterior por um tipo diferente de CoVh do mesmo grupo antigênico. Dessa maneira, indivíduos que se infectam pelo tipo NL63 produzem anticorpos referentes à proteína Spike, que podem gerar uma imunidade contra o tipo 229E, mas a relação contrária parece não ocorrer. O mesmo pode ocorrer com tipo OC43, onde anticorpos neutralizantes podem proteger contra o tipo HKU1 (DIJKIMAN *et al.*, 2012; DOMINGUEZ *et al.*, 2012). Tal teoria pode explicar a frequência superior dos CoVh-NL63 e OC43 em diversos estudos já citados, porém não explica os nossos achados.

Identificamos um predomínio do sexo masculino na população de estudo, de modo semelhante ao observado em outros trabalhos sobre pacientes pediátricos acometidos por pneumonia no Brasil (MARTINS; TREVISOL *et al.*, 2013; RICCETTO *et al.*, 2003) e em outros países como Nepal, Índia, Itália, Coreias e China (BANSTOLA *et al.*, 2013; ESPOSITO *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2007; HOMAIRA *et al.*, 2012; LAU *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2011; TALBOT *et al.*, 2009). A maior parte dos casos positivos para os CoVh tiveram também o sexo masculino como gênero predominante, havendo uma significância estatística quando comparado aos casos negativos (GUANT *et al.*, 2010; MACKAY; ARDEN; SPEICHER, 2012; TALBOT *et al.*, 2009).

A média de idade encontrada nos pacientes positivos para os CoVh foi de 18,17 meses, sendo maior que a média encontrada para o VSRh (16,58 meses), parainfluenzas (14,52 meses) e ADVh (15,28 meses). Esposito *et al.*, no ano de 2012, identificou uma maior proporção de casos positivos para os CoVh, VSRh, ADVh e VPIh em crianças nos primeiros anos de vida, reforçando nossos achados. Outros trabalhos na literatura demonstram uma maior predisposição dos CoVh em infectar crianças de baixa idade. (ARDEN *et al.*, 2005; CABEÇA; GRANATO; BELLEI, 2013);

A baixa média de idade do VSRh já foi observada, demonstrando ser este vírus o principal agente de infecções no trato respiratório (COSTA *et al.*, 2006; KIM; LEE;

LEE, 2000; PORTILLO *et al.*, 2003; MONTA, 2004; MOURA *et al.*, 2006; STRALLIOTTO *et al.*, 2002). Os dados aqui apresentados sobre a média de idade dos VPIh foi demonstrado em um trabalho de Glezen *et al.*, em 1984, realizado nos EUA, que observou a infecção pelo VPIh-3 já no primeiro ano de vida em dois terços das crianças que participaram do estudo. Por sua vez, a média do vírus influenza A se mostrou superior a dos CoVh (28,58 meses). Dados na literatura demonstram que o vírus influenza A é um dos principais vírus detectados em crianças maiores de dois anos e principalmente com idade superior aos cinco anos (IRMEN; KELLEHER, 2000; KIM; LEE; LEE, 2000; LIN *et al.*, 2004).

O tempo de aleitamento materno para os casos positivos por CoVh não apresentou significância quando comparado aos casos positivos para os outros vírus, como também para os negativos. Já foi relatado que o aleitamento materno é um fator de proteção para as IRA em lactentes (ODDY *et al.*, 2003; TAUSSIG *et al.*, 2003; DORNELLES; PIVA; MAROSTICA, 2007). Em nosso estudo todas as crianças incluídas tinham o diagnóstico de pneumonia, e a maior parte dos casos negativos para os CoVh e para os outros vírus podem ser constituídos de pneumonias causadas por outros agentes, dessa forma, não foi possível pesquisarmos o efeito protetor do aleitamento nos casos de pneumonia como um todo, pois este não era foco do presente estudo.

Os sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes positivos para os CoVh são bastante semelhantes aos apresentados por pacientes infectados por outros vírus respiratórios (PING *et al.*, 2008). Na análise dos sinais e sintomas, observamos uma maior frequência de coriza (91,76%), tosse (98,82%) e dispnéia (77,64%). Em pacientes pediátricos é geralmente observado um predomínio da coriza e da tosse sobre os outros sintomas apresentados, o que em muitos casos ocorre de forma semelhante em pacientes adultos (CABEÇA; GRANATO; BELLEI, 2013). Ping *et al.* (2008), observou que a maior parte dos pacientes infectados pelos CoVh apresentaram estridor, semelhante aos nossos achados, onde 35,21% dos pacientes positivos para os CoVh apresentaram tal sintoma.

A presença de convulsões relatadas em alguns estudos foi exclusiva de um caso associado ao CoVh-NL63 em uma criança de 17 meses, asmática, que frequentava creche e que retornou para tratamento da pneumonia em casa (LAU *et al.*, 2006; LAU *et al.*, 2011). A convulsão febril é um sintoma comumente associado ao tipo HKU1, e não ao tipo NL63. Embora a gravidade clínica da infecção pelo HKU1 em crianças seja relativamente leve, com menor duração da febre do que para as infecções por outros vírus respiratórios, a infecção

CoVh-HKU1 está associada com alta incidência de convulsões febris. Lauet *et al.*(2012), observou que 50% das crianças que tiveram o resultado positivo para este CoVh apresentaram convulsões febris. Contudo o tipo NL63 pode também estar associado a este sintoma, não sendo tão comum, mas alguns estudos clínicos já identificaram esta associação (CHIU *et al.*, 2005; LAU *et al.*, 2012).

Embora não haja nenhuma diferença significativa entre as temperaturas máximas causadas pelo tipo HKU1 e outros vírus respiratórios, há uma tendência mais baixa na temperatura quando comparado ao vírus influenza A e o ADVh (CHIU *et al.*, 2001; LAU *et al.*, 2012). Dessa forma, é pouco provável que a alta incidência de convulsões febris associadas aos tipos HKU1 e NL63 possa ser explicada pelas diferenças na intensidade da febre (LAU *et al.*, 2012). Contudo, Mais estudos são necessários para investigar a relação dos CoVh com pacientes que apresentam convulsões.

Identificamos uma frequência semelhante de dispnéia em pacientes que necessitaram de internamento infectados pelos CoVh quando comparados a pacientes que também necessitaram de internamento e estavam infectados por VSRh. A alta incidência de dispnéia em pacientes internados com VSRh é explicada pela maior propensão deste vírus a causar infecções respiratórias baixas, com maior comprometimento da oxigenação, podendo levar ao desconforto respiratório com maior frequência (COFFIN, 2005; COSTA *et al.*, 2006; MOURA *et al.*, 2006; STRALIOTTO *et al.*, 2004).

No que se refere à população deste estudo e a síndrome analisada, isto é, crianças com pneumonia, chama a atenção o número de detecções de CoVh 229E e OC43, previamente associados mais frequentemente a infecções mais brandas do trato respiratório, como o resfriado comum (MCINTOSH, 1974).No entanto, é cada vez maior o número de estudos em que estes ou outros CoVh são detectados em amostras clínicas de pacientes com pneumonias ou outras infecções do trato respiratório inferior, inclusive aquelas de maior gravidade (TALBOT *et al.*, 2009). Síndromes clínicas mais graves como a de Kawasaki já foram previamente associadas aos CoVh, mas especificamente ao tipo OC43 (ESPER *et al.*, 2005b). A relação desta síndrome com o tipo NL63 foi descrita, porém até agora não foi confirmada (ESPER *et al.*, 2005c).

Um aspecto que merece destaque foi à taxa de hospitalizações encontrada em nosso estudo (32,40%), sendo superada pelo VSR e o vírus influenza A que já são bem conhecidos como causa de IRA em crianças que necessitam de hospitalização (HALL, 2008; POEHLING

et al., 2006). A taxa de hospitalizações observada em nosso estudo é consideravelmente menor do que a de NL63 sozinho em um estudo reportado em Hong Kong (CHIU *et al.*, 2005) porém supera a de alguns estudos descritos na literatura (ARDEN *et al.*, 2005; TALBOT *et al.*, 2009). Uma razão adicional para a discrepância entre as taxas dos dois estudos pode ser a variação regional ano a ano dos CoVh. Curiosamente, a maior frequência dos pacientes hospitalizados infectados pelos CoVh eram menores de dois anos, sendo compatível com a literatura (TALBOT *et al.*, 2009). Isso pode refletir uma maior susceptibilidade devido à imaturidade do sistema imunológico das crianças ou a falta de anticorpos maternos em crianças mais jovens.

Um óbito foi observado entre as crianças hospitalizadas positivas para CoVh, sendo o CoVh-HKU1 identificado neste caso, em uma criança de 1 mês, previamente saudável e cujo único fator de risco identificado para uma infecção respiratória de maior gravidade foi a idade. Como as crianças atendidas na emergência que retornavam para casa não eram acompanhadas quanto à evolução de seus casos, não foi possível saber se ocorreu algum óbito entre elas. Até o presente momento não encontramos dados sobre o tipo HKU1 relacionado a óbito em pacientes pediátricos, porém outros CoVh associados a síndromes mais graves como o MERS-CoV e o SARS-CoV são normalmente relatados em casos de óbitos tanto em crianças como em adultos (GRAHAM; DOBALDSON; BARIC, 2013; STADLER *et al.*, 2003; SMH, 2013).

Na análise das alterações radiológicas pesquisadas (condensação, hiperinsuflação, infiltrado intersticial, atelectasia e derrame pleural), observamos que todos os pacientes positivos apresentaram algum tipo de alteração, sendo mais comum a condensação, identificada em 84,50% dos casos. Este tipo de achado radiológico é esperado em pacientes acometidos por pneumonia, como também infectados por algum tipo de CoVh e apresentando essa síndrome clínica (GUERRY *et al.*, 2013). Não identificamos diferenças estatísticas entre os casos positivos e negativos relacionadas às alterações radiológicas, mas vale ressaltar que tais alterações em pacientes negativos podem estar relacionadas à infecção por outro agente.

Em relação às limitações do nosso estudo, observamos que ao incluirmos apenas crianças com pneumonia atendidas nas enfermarias e na emergência de um hospital terciário na cidade de Fortaleza, limitou bastante o estudo no conhecimento da relevância desses vírus na população como um todo. Da mesma forma, ao excluirmos as amostras positivas por IFA, não utilizando a técnica de qPCR para detecção dos CoVh em tais amostras, reduziu os casos

de pneumonia analisados, como impediu de identificarmos coinfeções entre os CoVh e outros vírus respiratórios. Não utilizamos métodos diagnósticos para detecção bacteriana, dessa maneira não podemos garantir que as alterações nos pacientes decorrentes da síndrome clínica analisada foram na realidade causadas apenas pelos CoVh. Entre os pontos positivos deste estudo está a inclusão de uma técnica de alta sensibilidade na detecção viral além da obtenção de amostras positivas para diversos CoVh que poderão ser utilizadas em futuros estudos para análise de características não analisadas neste.

9 CONCLUSÕES

1. Houve circulação de quatro tipos de CoVh pesquisados nos anos estudados, sendo detectados em 16,80% das amostras analisadas.
2. Não houve associação entre a circulação dos quatro tipos de CoVh em relação aos períodos chuvoso e seco.
3. Os tipos de CoVh circulantes em ordem decrescente de detecção foi: 229E, OC43, NL63 e HKU1.
4. Uma taxa de 32,40% das infecções onde foram detectados os CoVh ocorreram em pacientes hospitalizados.
5. Um percentual de 19,80% de co-deteccões puderam ser observadas entre os CoVh durante o período de estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MONEIM, A.S. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): evidence and speculations. *Archives Virology*, v. 11, 2014.
- ALBUQUERQUE, M.C.*et al.* Novel respiratory virus infections in children, Brazilian. *Emerging Infectious Diseases*. v. 15, n. 5, p. 806-808, 2009.
- ALBUQUERQUE, M.C.; VARELLA, R.B.; SANTOS, N. Acute respiratory viral infections in children in Rio de Janeiro and teresópolis, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 5, n. 54, p. 249-255, 2012.
- ALONSO, W.J. *et al.* 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.
- ALMAZAN, F.*et al.* Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 9, p. 5516-5521, 2000.
- ALMEIDA, J.D.; TYRRELL, D.A. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *The Journal of General Virology*, v. 1, n. 2, p. 175-178, 1967.
- ANDERSON, L.J.; BARIC, R.S. Emerging human coronavirus – disease potential and preparedness. *The New England Journal of Medicine*, v. 19, n. 387, p. 1850-1852, 2012.
- ARDEN, K.E.*et al.* New Human Coronavirus, HCoV-NL63 Associated With Severe Lower Respiratory Tract Disease in Australia. *Journal of Medical Virology*, v. 75, n. 3, p. 455-462, 2005.
- ARDEN, K.E. *et al.* Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *Journal of Medical Virology*, v. 9, n. 78, p. 1232-1240, 2006.
- BALLESTEROS, M.L.; SANCHEZ, C.M.; ENJUANES, I. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronaviruses spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology*, v.227, n. 20, p. 378-388, 1997.
- BAKER, S.C. Coronaviruses: Molecular biology. Desk Encyclopedia of general Virology. Oxford (UK): Elsevier; p. 445-453, 2009.
- BASTIEN, N. *et al.* Human coronavirus NL63 Infection in Canada. *The Journal Infectious Diseases*, v.191, n. 4, p. 503-506, 2005.
- BANSTOLA, A.; BANSTOLA A. The Epidemiology of Hospitalization for Pneumonia in Children under Five in the Rural Western Region of Nepal: A Descriptive Study. *Plos One*, v. 7, n 8, e71311, 2013.

- BEACH, J.R.; SCHALM, O.W. A Filterable Virus, Distinct from that of Laryngotracheitis, the Cause of a Respiratory Disease of Chicks. *Poultry Science*, v. 3, n. 15, p. 199-206, 1936.
- BELLEI, N. *et al.* Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in Brazilian adults. *The Journal Infectious Diseases*, v. 80, n. 10, p. 1824-1827, 2008.
- BEZERRA, P.G. *et al.* Viral and Atypical Bacterial Detection in Acute Respiratory Infection in Children Under Five Years. *Plos One*, v. 4, n. 18, e18928, 2011.
- BOOTH, C.M. *et al.* Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA*, v. 21, n. 289, p. 2801-2809, 2003.
- BRIAN, D.A.; BARIC, R.S. Coronavirus genome structure and replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 287, p. 1-30, 2005.
- CABECA, T.K. *et al.* Infections with human coronaviruses NL63 and OC43 among hospitalised and outpatient individuals in São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 5, p. 693-694, 2012.
- CABEÇA, T.K.; BELLEI, N. Human coronavirus NL-63 infection in a Brazilian patient suspected of H1N1 2009 influenza infection: description of a fatal case. *Journal of Clinical Virology*, v. 1, n. 53, p. 82-84, 2012.
- CABEÇA, T.K.; GRANATO, C.F.; BELLEI, N.C. Epidemiological and clinical features of human coronavirus infections among different subsets of patients. *Influenza Other and Respiratory Viruses*, v. 7, n. 6, p. 1040-1047, 2013.
- CANDEIAS, J.A.N.; CARVALHO, R.P.S.; ANTONACIO, F. Seroepidemiologic study of coronavirus infection in Brazilian children and civilian adults. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 2, n. 14, 1972.
- CANDUCCI, F. *et al.* Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *Journal of Medical Virology*, v. 80, n. 4, p. 716-723, 2008.
- CILLA, G. *et al.* 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. 10, p. 1843-1849, 2008.
- COSTA, L.F. *et al.* 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.
- CHERRY, J. D. The chronology of the 2002–2003 SARS mini pandemic. *Pediatric Respiratory Reviews*, v. 5, n. 4, p. 262–269, 2004.
- CHIU, S.S. *et al.* Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clinical Infectious Diseases*, v. 12, n. 40, p. 1721-1729, 2005.

CHIU, S.S. *et al.* Influenza A infection is an important cause of febrile seizures. *Pediatrics*, v. 4, n. 108, p. E63, 2001.

CHUNG, J.Y. *et al.* Detection of viruses identified recently in children with acute wheezing. *Journal of Medical Virology*, v. 8, n. 79, p 1238-1243, 2007.

DARE, K.R. *et al.* Human Coronavirus Infections in Rural Thailand: A Comprehensive Study Using Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *The Journal Infectious Diseases*, v. 9, n. 196, p. 1321-1328, 2007.

Da SILVA FILHO, L.V. *et al.* The differential clinical impact of human coronavirus species in children with cystic fibrosis. *The Journal Infectious Diseases*, v. 206, n. 3, p. 384-388, 2012.

De GROOT, R. J. *et al.* Evidence for coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *Journal of Molecular Biology*, v. 196, n. 4, p. 963-966, 1989.

DIJKMAN, R. *et al.* The dominance of human coronavirus OC43 and NL63 infections in infants. *Journal of Clinical virology*, v. 53, n. 2, p. 135-139, 2012.

DIRETRIZES brasileiras em pneumonia adquirida na comunidade em pediatria. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 33, supl. 1, p. 31-50, 2007.

DOMINGUEZ, S.R.; ROBINSON, C.C.; HOLMES, K.V. Detection of four human coronaviruses in respiratory infections in children: a one-year study in Colorado. *Journal of Medical Virology*, v. 8, n. 81, p. 1597-604, 2009.

DOMINGUEZ, S.R. *et al.* Genomic Analysis of 16 Colorado Human NL63 Coronaviruses Identifies a New Genotype, High Sequence Diversity in the N-terminal Domain of the Spike Gene, and Evidence of Recombination. *Journal of General Virology*, v. 93, n. 11, p. 2387-2398, 2012.

DORNELLES, C.T.; PIVA, J.P.; MAROSTICA, P.J. Nutritional Status, Breastfeeding, and Evolution of Infants with Acute Viral Bronchiolitis. *Journal of Health, Population and Nutrition*, v. 3, n. 25, p. 336-343, 2007.

DOYLE, L.P.; HUTCHINGS, L.M.A. Transmissible gastroenteritis in pigs. *Journal of American Veterinary Association*, v. 108, n. 2, p. 257-259, 1946.

DROSTEN, C. *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 20, p. 1967-1976, 2003.

EBIHARA, T. *et al.* Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *Journal of Medical Virology*, v. 75, n. 3, p. 463-465, 2005.

ESPER, F. *et al.* Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *The Journal Infectious Disease*, v. 4, n. 191, p. 492-498, 2005a.

- ESPER, F. E. D. *et al.* Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *The Journal Infectious Disease*, v. 4, n. 191, p. 499-502, 2005.
- ESPOSITO, S. *et al.* Impact of human coronavirus infections in otherwise healthy children who attended an emergency department. *Journal of Medical Virology*, v. 12, n. 78, p. 1609-1615, 2006.
- ESPOSITO, S. *et al.* Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza Other Respiratory Viruses*, v. 1, n. 7, 18-26, 2013.
- FÉ, M.M.; MONTEIRO, A.J.; MOURA, F.E. Parainfluenza virus infections in a tropical city: clinical and epidemiological aspects. *The Brazilian Journal Infectious Diseases*, v. 12, n. 3, p. 192-197, 2008.
- FOUCHIER, R.A. *et al.* A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 101, n. 16, p. 6212–6216, 2004.
- FRIEMAN, M. *et al.* Sars coronavírus and innate immunity. *Viruses respiratory*. v. 133, n. 1, p. 101-112. 2008
- GARBINO, J. *et al.* Respiratory viruses in bronchoalveolar lavage: a hospital-based cohort study in adults. *Thorax*, v. 64, n. 5, p. 399-404, 2009.
- GAUNT, E.R. *et al.* Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 8, p. 2940–2947, 2010.
- GERNA, G. *et al.* Genetic variability of human coronavirus OC43-, 229E-, and NL63-like strains and their association with lower respiratory tract infections of hospitalized infants and immunocompromised patients. *Journal of Medical Virology*, v. 7, n. 78, p. 938-949, 2006.
- GERNA, G. *et al.* Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. *Journal of Clinical Virology*, v. 3, n. 38, p. 244-250, 2007.
- GÓES, L.G.B. *et al.* .Coronavirus HKU1 in Children, Brazil, 1995. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 6, p. 1147-1148, 2011.
- GÓES, L.G.B. Caracterização molecular de coronavírus humano – HCOV, circulantes no município de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2012. 159 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São paulo, 2012.
- GORBALENYA, A.E.; SNIJDER, E.J.; SPAAN, W.J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *Journal of Virology*, v. 78, n. 15, p. 7863-7866, 2004.

GORSE, G.J. *et al.* Human coronavirus and acute respiratory illness in older adults with chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal Infectious Diseases*, v. 6, n. 199, p. 847-857, 2009.

GLEZEN, W.P. Parainfluenza virus type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in Young children. *The Journal Infectious Diseases*, v. 150, n. 6, p. 851-857, 1984.

GRAHAM, R.L.; DOBALDSON, E.F.; BARIC, R.S. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *National Review*, v. 11, n. 12, p. 836-848, 2013.

GUAN, Y. *et al.* Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, v. 302, n. 5643, p. 276-278, 2003.

GUERY, B. *et al.* Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: a report of nosocomial transmission. *Lancet*, v. 29, n. 381, p. 2265-2272, 2013.

HAMRE, D.; PROCKNOW, J.J. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 121, n. 1, p. 190-193, 1966.

HAN, T.H. *et al.* Human Coronavirus-NL63 infections in Korean children, 2004–2006. *Journal of Clinical Virology*, v. 38, n. 1, p. 27–31, 2007.

HART, C.A; CUEVAS, L.E. Acute respiratory infections in children. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 1, n. 7, p. 23-29, 2007.

HEIKKINEN, T.; JÄRVINEN, A. The common cold. *Lance Review*, v. 361, n. 9351, p. 51-59, 2003.

HEIKKINEN, T. *et al.* Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 11, n. 40, p. 4337-4339, 2002.

HEMMING, V.G. Viral respiratory diseases in children: classification, etiology, epidemiology, and risk factors. *Journal of Pediatrics*, v. 2, n. 5, p. 13-16, 1994.

HOFMANN, H. *et al.* Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 22, n. 102, p. 7988-7993, 2005.

HOLMES, K.V. Coronaviruses (Coronaviridae). In: GRANOFF, A.; WEBSTER, R. G. (Ed.). *Encyclopedia of virology*. 2.ed.[S.l.]: Academic Press, 1999. p. 291-298.

HOLMES, K.V. Coronaviruses. In: KNIPE, D. M. *et al.* (Ed.). *Fields virology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.p. 1163-1185.

HOLMES, K.V, ENJUANES, L. Virology: the SARS coronavirus, a post genomic era. *Science*, v. 300, n. 5624, p. 1377-1378, 2003.

- HOMAIRA, N. *et al.* Incidence of Respiratory Virus-Associated Pneumonia in Urban Poor Young Children of Dhaka, Bangladesh, 2009–2011. *PLoS One*, v. 2, n. 7, e32056, 2012.
- IRMEN, K.E; KELLEHER, J.J. Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses in a community hospital. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 7, n. 3, p. 396-403, 2000.
- JIN, Y. *et al.* Newly identified respiratory viruses associated with acute lower respiratory tract infections in children in Lanzhou, China, from 2006 to 2009. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 1, n. 18, p. 74-80, 2012.
- JONASSEN, C.M. *et al.* Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of General Virology*, v. 86, n. 6, p. 1597–1607, 2005.
- LAU, S.K.P. *et al.* Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 6, p. 2063–2071, 2006.
- LAU, S.K.P. *et al.* Molecular epidemiology of human coronavirus OC43 reveals evolution of different genotypes over time and recent emergence of a novel genotype due to natural recombination. *Journal Virology*, v. 85, n. 21, p. 1325-1337, 2011.
- LEE, N. *et al.* A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 20, p. 1986-1994, 2003.
- LEUNG, T.F. *et al.* Epidemiology and clinical presentations of human coronavirus NL63 infections in hongkong children. *Journal of Clinical Microbiology*, v.11, n. 47, p. 3486-3492, 2009.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. *Virus taxonomy*. 2012. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=27>. Acesso em: 14 Feb. 2014.
- KAHN, J.S.; MCINTOSH, K. History and recent advances in coronavirus discovery. *Journal Pediatrics Infectious Disease*, v. 24, Suppl., p. 223-227, 2005.
- KAISER, L. *et al.* Human coronavirus NL63 associated with lower respiratory tract symptoms in early life. *Journal Pediatrics Infectious Diseases*, v. 11, n. 24, p. 1015-1017, 2005.
- KOOPMANS, M.; HORZINEK, M.C. Toroviruses of animals and humans: a review. *Advances in Virus Research*, v. 43, p. 233-273, 1994.
- KIM, M.R.; LEE, H.R.; LEE, G.M. Epidemiology of acute viral respiratory tract infections in Korean children. *Journal of Infection*, v. 41, n. 2, p. 152-158, 2000.
- KISTLER, A. *et al.* Pan-viral screening of respiratory tract infections in adults with and without asthma reveals unexpected human coronavirus and human rhinovirus diversity. *Journal of Infectious Diseases*, v. 6, n. 196, p. 817-825, 2005.

- KSIAZEK, T.G. *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 20, p. 1953–1966, 2003.
- KUYPERS, J. *et al.* Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics*, v. 1, n. 119, p. 70-76, 2007.
- LAI, M.M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, v. 48, p. 1-100, 1997.
- LAI, M.M.; PERLMAN, S.; ANDERSON, L.J. Coronaviridae. In: FIELDS, B. N.; KNIP, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1306-1335.
- LAU, S.K.P. *et al.* Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 6, p. 2063–2071, 2006.
- LAU, S.K.P. *et al.* Molecular epidemiology of human coronavirus OC43 reveals evolution of different genotypes over time and recent emergence of a novel genotype due to natural recombination. *Journal of Virology*, v. 85, n. 21, p. 11325-11337, 2011.
- LAUBER, C. *et al.* Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Archives of Virology*, v. 8, n. 157, p. 1623-1628, 2012.
- LEPARC-GOFFART, I. *et al.* Altered pathogenesis of mutant of the murine coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in spike protein. *Virology*, v. 239, n. 1, p. 1-10, 1997.
- LEUNG, T.F. *et al.* Human coronavirus NL63 in children: epidemiology, disease spectrum, and genetic diversity. *Hong Kong Medical Journal*, v.18, n. 2, p. 27-30, 2012.
- LIEN DO, A.H. *et al.* Viral etiologies of acute respiratory infections among hospitalized Vietnamese children in Ho Chi Minh City, 2004-2008. *PLoS One*, v. 3, n. 6, e18176, 2011.
- LISSENBEG, A. *et al.* Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hemagglutinin esterase protein display reduced fitness *in vitro*. *Journal Virology*, v. 79, n. 24, p. 15054-15063, 2005.
- MAHONY, J.B.; RICHARDSON, S. Molecular diagnosis of severe acute respiratory syndrome: the state of the art. *Journal of Molecular Diagnostics*, v. 5, n. 7, p. 551-559, 2005.
- MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; SPEICHER, D.J. Co-circulation of four human coronaviruses (HCoV) in Queensland children with acute respiratory tract illnesses in 2004. *Viruses*, v. 4, n. 4, p. 637-653, 2012.
- MOURA, F.E. *et al.* Short report: respiratory syncytial virus infections in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, n. 1, p. 165-167, 2006.

MOURA, F.E.; PERDIGÃO, A.C.; 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.

MCINTOSH, K. *et al.* Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 57, n. 4, p. 933-940, 1967.

MCINTOSH, K. *et al.* Coronavirus infection in acute lower respiratory tract disease of infants. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 5, n. 130, p. 502-507, 1974.

MIHINDUKULASURIYA, K.A. *et al.* Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a pan viral microarray. *Journal of Virology*, v. 10, n. 82, p. 5084-5088, 2008.

MOES, E. *et al.* A novel pancoronavirus RT-PCR assay frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infectious Diseases*, v. 5, n. 6, p. 6, 2005.

MONTO, A.S. Medical reviews: coronaviruses. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 47, n. 4, p. 234-251, 1974.

MYINT, S.H. Human Coronaviruses: a brief review. *Reviews and Medical Virology*, v.4, n. 1, p. 35-46, 1994.

ODDY, W.H. *et al.* Breast feeding and respiratory morbidity in infancy: a birth cohort study. *Archives of Disease in Childhood*, v. 88, n. 3, p. 224-228, 2003.

PEIRIS, J. S.; GUAN, Y.; YUEN, K. Y. Severe acute respiratory syndrome. *Nature Medicine*, v. 10, n. 12, p. 88-97, 2004.

PIERANGELI, A. *et al.* Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *Journal of Medical Virology*, v. 4, n. 79, p. 463-468, 2007.

PRILL, M.M. *et al.* New Vaccine Surveillance Network. Human coronavirus in young children hospitalized for acute respiratory illness and asymptomatic controls. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 3, n. 31, p. 235-240, 2012.

PRINCIPI, N.; BOSIS, S.; ESPOSITO, S. Effects of coronavirus infections in children. *Emerging Infectious Diseases*, v. 2, n. 16, p. 183-188, 2010.

REN, L. *et al.* Prevalence of human coronaviruses in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, China. *Journal of Medical Virology*, v.2, n. 83, p. 291-297, 2011.

RISCO, C. *et al.* The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core Shell consisting of M and N proteins. *Journal of Virology*, v. 70, n. 7, p. 4773-4777, 1996.

ROBERTS, A. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus infections of golden Syrian hamsters. *Journal of Virology*, v. 79, n. 1, p. 503-511, 2005.

- SEMPLE, M. G. *et al.* Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 191, n. 3, p. 382-386, 2005.
- SAWICKI, S.G.; SAWICKI, D.L.; SIDDELL, S.G.J. A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of Virology*, v.1, n. 81, p. 20-29, 2007.
- SHAO, X. *et al.* Seroepidemiology of group I human coronaviruses in children. *Journal of Clinical Virology*, v. 3, n. 40, p. 207-213, 2007.
- SLOOTS, T.P. *et al.* Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *Journal of Infectious Disease*, v. 35, n. 1, p. 99–102, 2006.
- SMITH, E.C.; DENISON, M.R. Implications of altered replication fidelity on the evolution and pathogenesis of coronaviruses. *Current Opinion in Virology*, v. 2, n. 5, p 519-524, 2012.
- STADLER, K. *et al.* SARS--beginning to understand a new virus. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, n. 1, p. 209-218, 2003.
- STRALIOTTO, S.M. *et al.* vital etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 4, p. 283-291, 2002.
- STEPHENSEN, C.B *et al.* Phylogenetic Analysis of the highly conserved region of the polimerase gene from coronavirus. *Viruses respiratores*. v. 2, n. 60, p 181-189, 1999.
- SUNG, J. Y. *et al.* Role of human coronavirus NL63 in hospitalized children with croup. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 9, n. 29, p. 822-826, 2010.
- TALBOT, H.K. *et al.* Coronavirus infection and hospitalizations for acute respiratory illness in young children. *Journal of Medical Virology*, v. 5, n. 81, p 853-856, 2009.
- TAUSSIG, L.M. *et al.* Tucson children's respiratory estudy: 1980 to present. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 111, n. 4, p. 661-675, 2003.
- THEAMBOONLERS, A. *et al.* Human coronavirus infection among children with acute lower respiratory tract infection in Thailand. *Intervirolgy*, v. 2, n. 50, p. 71-77, 2007.
- TYRREL, D.A.; BYNOE, M.L. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*, v. 1, n. 7428, p.76-77, 1966.
- TYRRELL, D.A. *et al.* Coronaviridae. *Intervirolgy*, v. 5, n. 6, p. 76-82, 1975.
- VABRET, A. *et al.* An outbreak of coronavirus OC43 respiratory infection in Normandy, France. *Clinical Infectious Diseases*, v. 36, n. 8, p. 985-989, 2003.
- VABRET, A. *et al.* Coronavirus humains. *Virologie*, v. 9, n. 4, p. 273-287, 2005.

- VABRET, A. *et al.* Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France. *Journal of Paediatric Child Health*, v. 4, n. 44, p.176-181, 2008.
- VALLET, S. *et al.* Detection of human Coronavirus 229E in nasal specimens in large scale studies using an RT-PCR hybridization assay. *Molecular Cellular Probes*, v. 2, n. 18, p. 75-80, 2004.
- VAN DER HOEK, L. Human coronaviruses: what do they cause? *Antiviral Therapy*, v. 12, n. 4, p. 651–658, 2007.
- VAN DER HOEK, L.*et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*, v. 10, n. 4, p. 368–371, 2004.
- VAN DER HOEK, L.; PYRC, K.; BERKHOUT, R. J. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 30, p. 760-773, 2006.
- VAN DER HOEK, L.*et al.* Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *Plos Medicine*, v. 8, n. 2, p. 340, 2005.
- VAN DER HOEK, L. *et al.* Burden of disease due to human coronavirus NL63 infections and periodicity of infection. *Journal Clinical Virology*, v. 48, n. 2, p.104-108, 2010.
- VAN ELDEN, L. J.*et al.* Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Journal. Infectious Diseases*, v. 189, n. 4, p. 652–657, 2004.
- VENTER, M.*et al.* Contribution of common and recently described respiratory viruses to annual hospitalizations in children in South Africa. *Journal Medical Virology*, v. 8, n. 83, p. 1458-1468, 2011.
- VIEIRA, S. E.*et al.*Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)*, v. 7, n. 4, p. 307-313, 2011.
- VIJGEN, L. *et al.*Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. *Journal Clinical Microbiology*, v. 43, n. 11, p. 5452-5456, 2005.
- WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, n. 4, p. 635-664, 2005.
- WEVERS, B. A.; VAN DER HOEK, L. Recently discovered human coronaviruses. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 29, n. 4, p. 715-724, 2009.
- WOO, P. C.*et al.* Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of Virology*, v. 79, n. 2, p. 884–895, 2005.

WOO, P. C. *et al.* Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine*, v.10, n. 234, p. 1117-1127, 2009a.

WOO, P. C.*et al.* More and More Coronaviruses: Human Coronavirus HKU1. *Viruses*, v. 1, n. 1, p. 57-71, 2009b.

WOO, P.C. *et al.* Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus Deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology*, v. 86, n. 7, p. 3995-4008, 2012.

WOO, P.C. *et al.* Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology*, v. 1, n. 351, p. 180-187, 2006.

WU, P.S. *et al.* Clinical manifestations of human coronavirus NL63 infection in children in Taiwan. *European Journal of Pediatric*, v. 1, n. 167, p. 75-80, 2008.

YOKOMORI, K.; BANNER, L.R.; LAI M.M. Heterogeneity of gene expression of the hemagglutinin-esterase (HE) protein of murine coronaviruses. *Virology*, v. 183, n. 2, p. 647-657, 1991.

YOUNT, B.; ROBERTS, R. S.; SIMS, A.C. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *Journal of Virology*, v. 23, n.79, p. 14909-14022, 2005.

ZAKI, A.M. *et al.* Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *The New England Journal of Medicine*, v. 367, n. 9, p. 1814-1820, 2012.

ZHONG, N. Management and prevention of SARS in China. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science*, v. 359, n. 1447, p. 1115–1116, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Projeto de Pesquisa: detecção dos coronavírus humano em pacientes pediátricos com pneumonia atendidos em um hospital de referência da cidade de Fortaleza-CE nos anos de 2011 e 2012.

Ficha _____

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 Nº de vezes _____
 Absenteísmo escolar: () Não () Sim Nº de dias _____
 Absenteísmo 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 () Não
 Fator 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 _____
 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 Aguda Hospitalar:

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 para a IRA hospitalar

() Aerossol () Salbutamol () Corticoide () Adrenalina

() Antitérmico () Fisioterapia () Cateter de O2 () Máscara Oxi-Hood
 () Ventilação Mecânica () Antibióticos

Outros: _____

Nome do ATB	Data de início	Data de término	Número de dias

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 _____

Hemograma

Data	Ht	Hb	Leuc	Segm	Linf	L. Ati	Basof	Eosin	Monóc	Plaq

Gasometria

Data	pH	PCO2	PO2	Sat O2

Hemocultura: () Sim () Não () Negativa () Positiva

Bactéria Isolada _____

Observações:

Data da alta _____ Permanência hospitalar _____

APÊNDICE B

Termo Consentimento Livre e Esclarecido

Para crianças atendidas no HIAS

Estudo: detecção dos coronavírus humano em pacientes pediátricos com pneumonia atendidos em um hospital de referência da cidade de Fortaleza-CE nos anos de 2011 e 2012.

Seu filho está sendo convidado a participar de uma pesquisa com a finalidade de conhecer o impacto das infecções respiratórias agudas virais em pacientes. Estas infecções causam um aumento na permanência hospitalar e podem complicar o estado de saúde do indivíduo. A participação do seu filho é muito importante para nós. Este documento contém informações sobre como estaremos realizando nosso trabalho, leia-o atentamente e qualquer dúvida teremos o prazer de esclarecê-las.

Eu, _____
portador do RG: _____ e do CPF _____ nascido
em ____/____/____ concordo livre e espontaneamente que meu filho
_____ nascido em ____/____/____
participe do estudo “Infecções Respiratórias Agudas Hospitalares: a importância dos vírus como agentes destas enfermidades”. Declaro que obtive as informações necessárias acerca deste estudo e que as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

- I) Este estudo tem por objetivo avaliar a frequência das infecções respiratórias agudas hospitalares causadas por vírus em pacientes pediátricos que realizaram transplante de medula ou fazem quimioterapia;
- II) Será realizada a coleta de secreção nasal através de uma sonda de aspiração. Esse procedimento é indolor, mas pode causar incômodo fazendo com que a criança chore. Dificilmente um pequeno sangramento na mucosa nasal pode ocorrer, mas é facilmente controlado;
- III) A participação do meu filho (a) neste estudo não é para fins terapêuticos e não terá nenhum custo para mim;
- IV) Tenho a liberdade de desistir a qualquer momento sem a necessidade de dar explicação;
- V) A minha desistência não acarreta nenhum prejuízo ou interferência no atendimento ou no tratamento do meu filho.
- VI) Os resultados serão sigilosos, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas desde que a identidade do meu filho não seja revelada;
- VII) Caso deseje poderei saber os resultados do estudo. Obs: marque com um X;
 sim, desejo conhecer os resultados;
 não desejo conhecer os resultados.

Fortaleza ____ de _____ de 20 ____

Responsável: _____

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Médico Responsável: _____

Prof. Responsável pelo Projeto: _____

Dra Fernanda Edna Araújo Moura

APÊNDICE C – Estudos internacionais sobre a ocorrência dos CoVh

Autor/Ano	País	População de Estudo	Metodologia Diagnóstica	CoVh Pesquisados	Taxa de Detecção
Autor/Ano	País	População de Estudo	Metodologia Diagnóstica	CoVh Pesquisados	Taxa de Detecção
Van elden <i>et al.</i> , 2004	Holanda	Pacientes com IRA	Nested PCR e qPCR	OC43 e 229E	11%
Arden <i>et al.</i> , 2005	Austrália	Pacientes com IRA	Nested PCR	NL63	2%
Lau <i>et al.</i> , 2006	Hong Kong	Pacientes com IRA	RT-PCR e IFA	229E, OC43, NL63 e HKU1	2,10%
Theamboilers <i>et al.</i> , 2006	Tailândia	Crianças com Infecção Respiratória IVAI	RT-PCR	229E e OC43	4,40%
Han <i>et al.</i> , 2007	Coréia do Sul	Crianças menores de 6 anos com IRA	Nested PCR e IFA	NL63	1,50%
Kuypers <i>et al.</i> , 2007	EUA	Crianças e adolescentes com IRA	qPCR, IFA	229E, OC43, NL63 e HKU1	6,30%
Papa <i>et al.</i> , 2007	Grécia	Crianças e adolescentes com IRA	RT-PCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	2,90%
Dare <i>et al.</i> , 2007	Tailândia	Pacientes de todas as idades com pneumonia	qPCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	3,40%
Talbot <i>et al.</i> , 2009	EUA	Crianças menores de 5 anos com IRA	qPCR	NL63, OC43 e 229E	4,90%
Dominguez <i>et al.</i> , 2009	EUA	Crianças com IRA	qPCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	1%
Dominguez <i>et al.</i> , 2012	EUA	Crianças com IRA	qPCR	NL63	5%
Dijkman <i>et al.</i> , 2010	Holanda	Crianças saudáveis e hospitalizadas	qPCR e ELISA	229E, OC43, NL63 e HKU1	14%
Gauntet <i>et al.</i> , 2010	Reino Unido	Pacientes com IRA e imunossuprimidos	Nested PCR, qPCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	2,30%
Ren <i>et al.</i> , 2011	China	Adultos com IRA	RT-PCR e Sequenciamento	229E, OC43, NL63 e HKU1	1%
Dominguez <i>et al.</i> , 2014	EUA e Brasil	Crianças	RT-PCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	4,3%

Candeias <i>et al.</i> , 1972	Brasil	Crianças e Adultos	Fixação do Complemento	229E	20%
Bellei <i>et al.</i> , 2008	Brasil (São Paulo)	Pacientes ambulatoriais com IRA ou Infleunza-like (Adultos)	RT-PCR	OC43 e 229E	4,20%
Albuquerque <i>et al.</i> , 2009	Brasil (Rio de Janeiro)	Pacientes de emergência e hospitalizados com IVAS (Crianças)	qPCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	1,90%
Bezerra <i>et al.</i> , 2011	Brasil (Recife)	Crianças atendidas no hospital com o quadro de IRA	qPCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	3,20%
Góes <i>et al.</i> , 2011	Brasil (São Paulo)	7 dias-15 anos com IRA, doença entérica, outros	Nested PCR e Sequenciamento	HKU1	3,60%
Albuquerque <i>et al.</i> , 2012	Brasil (Rio de Janeiro)	Pacientes de emergência e hospitalizados com IVAS (Crianças)	qPCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	4%
Cabeça <i>et al.</i> , 2012	Brasil (São Paulo)	Trabalhadores de saúde, transplantados renais e células-tronco, Crianças com doenças cardíacas, hospitalizados e ambulatoriais com IRA (Adultos e Crianças)	RT-PCR	Pancoronavírus sem distinção de sorotipos	11,50%
Cabeça <i>et al.</i> , 2012	Brasil (São Paulo)	Pacientes ambulatoriais e hospitalizados (Crianças e Adultos)	RT-PCR	OC43 e NL63	1,20%
da Silva Filho <i>et al.</i> , 2012	Brasil (São Paulo)	Crianças e adolescentes da comunidade e internados com fibrose cística	RT-PCR e Nested PCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	4,60%
Cabeça <i>et al.</i> , 2013	Brasil (São Paulo)	Trabalhadores de saúde, transplantados renais e células-tronco, Crianças com doenças cardíacas, hospitalizados e ambulatoriais com IRA (Adultos e Crianças)	qPCR	229E, OC43, NL63 e HKU1	11,20%

APÊNDICE D

Artigo publicado:

Respiratory syncytial virus epidemic periods in an equatorial city of Brazil

Fernanda E. A. Moura,^a Anne C. B. Perdigão,^a Joyce F. Ribeiro,^a Caroline M. G. D. Florêncio,^a Francisco M. S. Oliveira,^a Samuel A. R. Pereira,^a Viviane F. Botosso,^b Marilda M. Siqueira,^c Luciano M. Thomazelli,^d Raquel N. Caldeira,^d Danielle B. L. Oliveira,^d Edison L. Durigon^d

^aFederal University of Ceara, Fortaleza, Brazil. ^bButantan Institute, São Paulo, Brazil. ^cOswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil. ^dUniversity of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Correspondence: Fernanda E. A. Moura, Rua Monsenhor Furtado 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE, Brasil.

E-mail: fernandaedna@terra.com.br

Accepted 23 January 2013. Published Online 20 March 2013.

Background: Characterization of the human respiratory syncytial virus (HRSV) season at the local level has important implications for appropriate decisions on the time period for administration of specific prophylaxis.

Objectives: (1) To describe five consecutive epidemic periods of HRSV in an equatorial city of Brazil and (2) to show preliminary data on genomic diversity of circulating HRSV.

Patients/Methods: Nasopharyngeal aspirates of 2885 children attending the emergency room and wards of a public hospital were collected and screened by indirect immunofluorescence for HRSV infections during five consecutive years (from January 2004 to December 2008). In addition, the genetic and antigenic variability of the HRSV strains isolated was evaluated by partial nucleotide sequencing of the protein G gene.

Results: HRSV was detected in 158% of the analyzed samples. HRSV seasons occurred in a restricted period of each year. The onset of each HRSV season was variable (February to May), but the end always occurred in July. From the 456 HRSV infections found, 86 cases with bronchiolitis were genotyped. Both HRSV subgroups (A and B) cocirculated during the five epidemic periods. The 58 HRSVA strains grouped into two clades, GA2 and GA5. In respect of the HRSV-B strains, the 28 samples grouped into two clades: GB3 and BA.

Conclusions: HRSV accounts for a substantial proportion of ARI in the study population. As in temperate countries, HRSV infections in this equatorial area of Brazil also cause seasonal yearly epidemics, and this has implications for prophylaxis strategies. The city of Fortaleza follows the same worldwide trend of circulation of genotypes of HRSV.

Keywords: Antigenic groups and genomic diversity, human respiratory syncytial virus.

ANEXO

ANEXO A

**HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Tertuliano Sales 544 – Vila União – Fortaleza – Ceará
FoneFax: (85) 3101.4212 – 3101.4283

Fortaleza, 17 de dezembro de 2009.

Registro no CEP: 070/09

Data da Aprovação: 17/12/2009

Título do Projeto: "Pneumonias adquiridas na comunidade de etiologia viral em crianças atendidas por doença respiratória aguda no Hospital Infantil Albert Sabin: prevalência, apresentações clínicas e complicações"

Pesquisadora Responsável: Fernanda Edna Araújo Moura

Instituição / Serviço: Universidade Federal do Ceará

Levamos ao conhecimento de V. S^a, 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, aprovou o projeto supracitado.

O pesquisador deverá apresentar uma cópia do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Regina Lúcia Ribeiro Moreno
Coord^a. do Comitê de Ética em Pesquisa