



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

FELIPE SERRA CAMPELO

**PADRÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DAS PNEUMONIAS POR HUMAN
BOCAVIRUS EM CRIANÇAS DE ATÉ CINCO ANOS ATENDIDAS EM UM
HOSPITAL DE REFERÊNCIA NA CIDADE DE FORTALEZA-CE**

FORTALEZA

2021

FELIPE SERRA CAMPELO

PADRÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DAS PNEUMONIAS POR HUMAN
BOCAVIRUS EM CRIANÇAS DE ATÉ CINCO ANOS ATENDIDAS EM UM HOSPITAL
DE REFERÊNCIA NA CIDADE DE FORTALEZA-CEARÁ

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C196p Campelo, Felipe.

Padrão clínico-epidemiológico das pneumonias por human bocavirus em crianças de até cinco anos atendidas em um hospital de referência na cidade de Fortaleza-Ceará / Felipe Campelo. – 2021.
74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Rossana de Aguiar Cordeiro..

1. Pneumonia viral. 2. Epidemiologia. 3. Crianças. 4. Bocavírus humano. I. Título.

CDD 610

FELIPE SERRA CAMPELO

PADRÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO DAS PNEUMONIAS POR HUMAN
BOCAVIRUS EM CRIANÇAS DE ATÉ CINCO ANOS ATENDIDAS EM UM HOSPITAL
DE REFERÊNCIA NA CIDADE DE FORTALEZA-CEARÁ

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para Obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.
Orientadora: Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

A Deus.

Aos meus pais.

A minha noiva.

AGRADECIMENTOS

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pela excelente dedicação e orientação para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Prof. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura por todos os ensinamentos e oportunidades na área de Virologia passados e disponibilidade de ceder o laboratório para os experimentos.

Às professoras participantes da banca de avaliação desta dissertação: Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, Prof. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura e Prof. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira, que tiraram parte de seu tempo para ler, avaliar e aplicar suas valiosas considerações acerca do assunto.

À Prof. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes e Dra. Silviane Praciano Bandeira por ter tirado parte de seu tempo para avaliar este estudo e dar suas importantes sugestões para melhorá-lo.

Ao Prof. Dr. Alberto Novais Ramos Junior pelos ensinamentos valiosos ministrados durante a disciplina de desenvolvimento de projetos de pesquisa do programa de pós-graduação em Saúde Pública.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá por coordenar o programa de pós-graduação em Ciência Médicas e contribuir imensamente com a ciência de nosso país.

Aos responsáveis e pelas crianças que fizeram parte deste estudo, que ao participar nos ajudaram a entender melhor o agente estudado.

Aos colegas do mestrado pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

RESUMO

As pneumonias são importantes problemas de saúde pública em países em desenvolvimento, representando uma das principais causas de hospitalizações e óbitos em crianças. O human bocavirus (HBoV) é um agente causador de infecções respiratórias superiores e inferiores, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos. O objetivo deste estudo é descrever a prevalência do HBoV e as características clínico-epidemiológicas das crianças acometidas por este agente na cidade de Fortaleza, Ceará. Para isto, foram coletados aspirados de nasofaringe de 545 crianças de até cinco anos de idade atendidas em um hospital pediátrico de referência em Fortaleza. Foram incluídas crianças diagnosticadas com pneumonia entre janeiro de 2013 a dezembro de 2014. As amostras foram submetidas a PCR para detecção do HBoV e parainfluenza 4 (PIV4) e imunofluorescência indireta para detecção de respiratory syncytial virus (RSV), adenovirus (AdV), influenza A e B (FLU A e FLU B) e parainfluenza virus 1, 2 e 3 (PIV1, PIV2, PIV3). A maioria das crianças foram atendidas nas salas de emergências/observação (279/545; 51,1%), e enfermarias (208/545; 38,1%). Do total de amostras analisadas, 359 (65,8%) foram positivas para pelo menos um vírus pesquisado. Dessas, 70,8% (254/359) das amostras apresentaram um único vírus detectado e 29,2% (105/359) dois vírus ou mais. O HBoV foi detectado em 87 amostras (15,9%), sendo o segundo vírus mais prevalente, atrás do RSV (150 / 27,5%). O PIV3, AdV, PIV4, PIV1, FLU A, FLU B, e PIV2 estiveram atrás do HBoV com 86 (15,7%), 45 (8,2%), 42 (7,7%), 33 (6%), 30 (5,5%), 3 (0,5%) e 3 (0,5%) detecções, respectivamente. Das 87 amostras positivas para HBoV, 44 (50,5%) foram coinfeções com outros agentes virais, ocorrendo 15 (34%) coinfeções com RSV, 12 (27,2%) com PIV3 e cinco (11,30%) com PIV4 como os agentes mais frequentes detectados concomitantemente com o HBoV. A idade média das crianças infectadas por HBoV foi de 12,1 meses e os sintomas mais frequentes foram tosse, dispneia e febre. Além disso, 90,6% das crianças positivas para HBoV receberam antibióticos para o tratamento empírico da pneumonia. O HBoV não apresentou nenhum padrão de circulação, porém foi mais frequente no primeiro semestre do ano, totalizando 68,9% dos casos. O HBoV é um agente frequente de pneumonias na população de estudo.

Palavras-chave: Pneumonia viral; Epidemiologia; Crianças; Bocavírus humano.

ABSTRACT

Pneumonia is an important public health problem in developing countries, representing one of the main causes of hospitalization and death in children. Human Bocavirus (HBoV) is a causative agent of upper and lower respiratory infections, mainly affecting children under five years of age. The aim of this study is to describe the prevalence of HBoV and the clinical and epidemiological characteristics of children affected by this agent in the city of Fortaleza, Ceará. For this purpose, nasopharyngeal aspirates were collected from 545 children up to five years old treated at a reference pediatric hospital in Fortaleza. Children diagnosed with pneumonia between January 2013 and December 2014 were included. The samples were submitted to PCR for detection of HBoV and parainfluenza 4 (PIV4) and indirect immunofluorescence for detection of respiratory syncytial virus (RSV), adenovirus (AdV), influenza A and B (FLU A and FLU B) and parainfluenza virus 1, 2 and 3 (PIV1, PIV2, PIV3). Most of the children were seen in the emergency/observation rooms (279/545; 51.1%), and in the wards (208/545; 38.1%). Of the total samples analyzed, 359 (65.8%) were positive for at least one virus investigated. Of these, 70.8% (254/359) of the samples had a single virus detected and 29.2% (105/359) had two viruses or more. HBoV was detected in 87 samples (15.9%), being the second most prevalent virus, behind RSV (150 / 27.5%). PIV3, AdV, PIV4, PIV1, FLU A, FLU B, and PIV2 were behind HBoV with 86 (15.7%), 45 (8.2%), 42 (7.7%), 33 (6%), 30 (5.5%), 3 (0.5%) and 3 (0.5%) detections, respectively. Of the 87 samples positive for HBoV, 44 (50.5%) were coinfections with other viral agents, with 15 (34%) coinfections occurring with RSV, 12 (27.2%) with PIV3 and five (11.30%) with PIV4 as the most frequent agents detected concomitantly with HBoV. The mean age of children infected with HBoV was 12.1 months and the most frequent symptoms were cough, dyspnea, and fever. In addition, 90.6% of HBoV-positive children received antibiotics for the empirical treatment of pneumonia. HBoV did not present any pattern of circulation, but it was more frequent in the first half of the year, totaling 68.9% of cases. HBoV is a frequent agent of pneumonia in the study population.

Keywords: Viral pneumonia; Epidemiology; Children; Human bocavirus.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – A família <i>Parvoviridae</i> , os gêneros de suas duas subfamílias e as espécies de importância clínica para o homem.....	16
FIGURA 2 – Proteínas codificadas pelo HBoV.....	19
FIGURA 3 – Esquema replicativo de B19V.....	21
FIGURA 4 – Patogênese do HBoV.....	23
FIGURA 5 – Fluxograma: Etapas da pesquisa viral na população de estudo.....	31
FIGURA 6 – Fluxograma de extração de ácidos nucleicos seguindo o protocolo de mini colunas com filtros.....	33
FIGURA 7 – Gel de agarose a 1.5% em TBE Buffer.....	40

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Detecção dos vírus pesquisados nas amostras respiratórias da população de estudo.....	41
GRÁFICO 2 – Proporção em número dos vírus detectados nos casos de infecções únicas e coinfeccões.....	43
GRÁFICO 3 – Distribuição mensal dos casos de PAC durante o período de estudo e a circulação dos vírus pesquisados.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características gerais da população de estudo.....	38
TABELA 2 – Sinais e sintomas apresentados pela população de estudo.....	39
TABELA 3 – Espécies virais detectadas em casos de coinfeções.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdV	Adenovirus
ANF	Aspirado de nasofaringe
B19V	Parvovirus B19
FLU A	Influenza A
FLU B	Influenza B.
FUNCEME	Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos
HBoV	Human bocavirus
HIAS	Hospital Infantil Albert Sabin
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
OMS	Organização Mundial da Saúde.
ORF	Open Reading Frames
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIV1	Parainfluenza virus 1
PIV2	Parainfluenza virus 2
PIV3	Parainfluenza virus 3
PIV4	Parainfluenza virus 4
RSV	Respiratory syncytial virus.
UTI	Unidade de tratamento intensivo.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Descoberta do human bocavirus (HBoV)	15
2.2	Taxonomia	15
2.3	Aspectos gerais e estrutura do HBoV	17
2.4	Replicação	19
2.5	Patogênese	22
2.6	Resposta Imune	24
2.7	Epidemiologia	25
2.8	Diagnóstico	26
2.8.1	Isolamento viral	26
2.8.2	Técnicas moleculares	27
2.8.3	Sorologia	27
3.	HIPOTESES	28
4.	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivo geral	28
4.2	Objetivos específicos	28
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	Tipo de estudo	28
5.2	Local de estudo	28
5.3	População de estudo	29
5.4	Questões éticas	29
5.5	Amostras respiratórias	30
5.6	Pesquisa viral	30
5.6.1	Detecção viral por método molecular	32
5.6.2	Extração de ácidos nucleicos	32
5.6.3	Detecção de HBoV por PCR	33
5.6.4	Eletroforese em gel de agarose	34
5.7	Análise estatística	34
6.	RESULTADOS	34
6.1	Características gerais da população estudada	34
6.2	Características das crianças com pneumonias virais	39
6.3	Detecção viral	39
6.4	Circulação mensal dos vírus pesquisados	43
	DISCUSSÃO	45

CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES	67
APÊNDICE A – ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	67
APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO	68
ANEXOS	69
ANEXO A – FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA	69
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	71
ANEXO C – CEP HIAS	73

1. INTRODUÇÃO

A pneumonia é definida como uma infecção aguda do parênquima pulmonar por um ou mais agentes infecciosos. As pneumonias adquiridas na comunidade (PAC) são aquelas que acometem os indivíduos fora do ambiente hospitalar ou nas primeiras 48 horas após internação hospitalar (MACKENZIE, 2016).

As PAC são importantes causas de morbidade e mortalidade infantil tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (RUDAN *et al.*, 2013). As pneumonias representam uma das principais causas de hospitalizações e mortes em crianças menores de cinco anos. Em 2013, 3,2 milhões de crianças morreram por doenças infecciosas, aproximadamente 15% (0,9 milhões) desses óbitos ocorreram devido as pneumonias (WALKER *et al.*, 2013). Esta proporção se repete em 2017, com 800.694 mortes nesta população (WHO, 2019). A incidência média das pneumonias, no mundo, é estimada em 0,22/criança variando de 0,11 a 0,51 (LIU *et al.*, 2015). No Brasil, a incidência estimada de pneumonias em crianças menores de cinco anos foi de aproximadamente 150/1000 habitantes, em 2015. A incidência da doença no país é a maior na América Latina (MCALLISTER *et al.*, 2019).

Em 2015, Índia, Nigéria, Indonésia, Paquistão e China foram responsáveis por 54% dos casos de pneumonias no mundo (LIU *et al.*, 2015). Dentre os países da América Latina, o Brasil possui a maior incidência, destacando 598.668 hospitalizações com mais de 52 mil óbitos devido à pneumonia em 2017 no país, reforçando o problema de saúde pública (GOMES, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em resposta a grande importância mundial das pneumonias, iniciou em 2013, o Integrated Global Action Plan for the Prevention and Control of Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD), com o objetivo de reduzir os óbitos por pneumonias para 3 crianças por 1000 nascidos vivos até 2025 (WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.*, 2013).

Diversos microrganismos podem causar pneumonias, incluindo bactérias, vírus e fungos. Dentre os agentes bacterianos nos casos de PAC na população infantil, destacam-se *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram negativos. Os vírus são os principais agentes etiológicos das pneumonias, com taxas de detecções de 30% a 66% (ZHOU *et al.*, 2018; GADSBY *et al.*, 2016; CANTAIS *et al.*, 2014; JAIN *et al.*, 2015; NING *et al.*, 2017). O respiratory syncytial virus (VSR), influenza A virus (FLU A) e B (FLU B), parainfluenza 1 (PIV 1), 2 (PIV2), 3 (PIV3) e 4 (PIV4), adenovirus (AdV), coronavírus, metapneumovirus, rhinovirus e, mais recentemente descoberto, o human bocavirus (HBoV) são agentes virais comumente detectados em casos de pneumonias.

Observações trazidas dos poucos estudos realizados até o momento atestam que a

prevalência do HBoV nos casos de pneumonias varia de 9,9% a 23,1% em crianças (NING *et al.*, 2017; NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2018). As crianças mais jovens, principalmente as menores de 24 meses de idade, são mais acometidas pela doença e há maior gravidade nesta faixa etária (ZHOU *et al.*, 2018).

Dado a importância das pneumonias e o desconhecimento da prevalência, características e circulação do HBoV nas pneumonias na população infantil do estado do Ceará, torna-se necessário, para nosso entendimento, o estudo deste agente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descoberta do human bocavirus (HBoV)

O HBoV foi primeiramente descrito, em 2005, por um grupo de pesquisadores suecos em aspirados de nasofaringe (ANF) de crianças com sintomas de infecções respiratórias do trato superior e inferior. As crianças, apesar da sintomatologia, não possuíam nenhum agente viral ou bacteriano detectável no trato respiratório. Desta forma, os pesquisadores decidiram realizar um ensaio metagenômico para detecção de material genético presente na amostra. Para detectar um possível novo agente, os pesquisadores realizaram a purificação de ácidos nucleicos nas amostras respiratórias das crianças. O material extraído foi amplificado por Random PCR, na qual, cada amostra passou por reações de PCR com oligonucleotídeos randômicos para agentes com genoma de DNA e outra reação de RT-PCR para detecção de agentes com genoma de RNA. O produto da PCR foi purificado e ligado a um vetor e inseridos em *Escherichia coli*. Os clones foram sequenciados e comparados com sequências conhecidas. A maioria dos clones foram reconhecidos como sendo de sequências humanas ou de patógenos já conhecidos. No entanto, as amostras de algumas crianças apresentavam sequências semelhantes à de parvovírus com alta similaridade com o bovino e canino bocavirus, colaborando para que o novo agente, fosse classificado como human bocavirus (HBoV) (ALLANDER *et al.*, 2005).

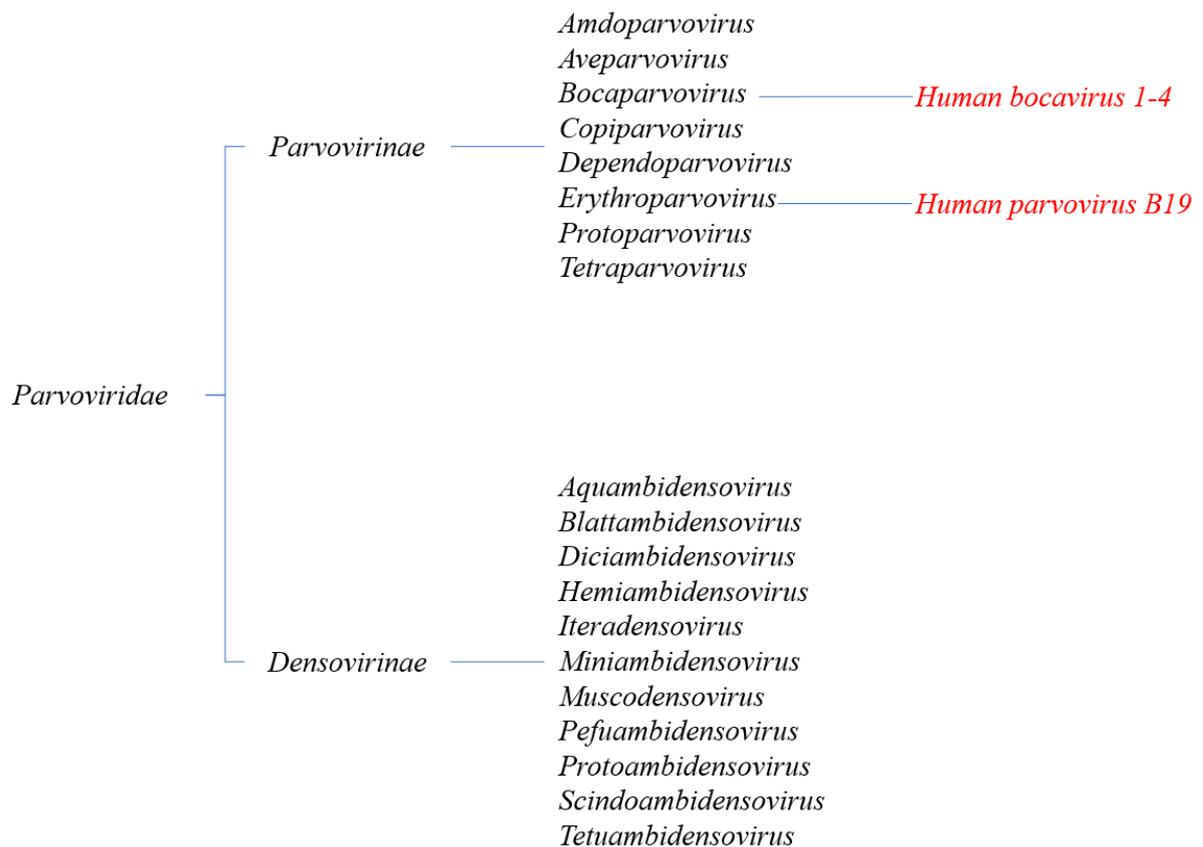
Posteriormente, em 2007, na Espanha, o HBoV foi detectado em fezes de crianças com infecções respiratórias. As crianças concomitantes ao quadro respiratório, também manifestaram gastroenterites aguda. Os pesquisadores submeteram as fezes das crianças à pesquisa de HBoV, onde o agente também foi detectado (VICENTE *et al.*, 2007).

2.2 Taxonomia

O HBoV pertence à família *Parvoviridae*, esta família é subdividida em duas

subfamílias, *Densovirinae* e *Parvovirinae*, de acordo com o hospedeiro que infecta. A *Densovirinae* é composta por vírus que infectam invertebrados, incluindo insetos, equinodermos e crustáceos. A subfamília *Parvovirinae* é dividida em oito gêneros que infectam hospedeiros vertebrados: *Protoparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Tetraparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Copiparvovirus*, e *Bocaparvovirus* sendo, este último, o gênero em que o HBoV está inserido. Esses vírus infectam mamíferos, aves e répteis. Os vírus que pertencem à família *Parvoviridae* são classificados de acordo com análises filogenéticas da sequência da proteína NS1 (COTMORE *et al.*, 2019). A FIGURA 1 mostra a divisão das subfamílias e espécies de importância para o homem da família *Parvoviridae*.

FIGURA 1 - A família *Parvoviridae*, os gêneros de suas duas subfamílias e as espécies de importância clínica para o homem.



Fonte: COTMORE *et al.*, 2019.

O gênero *Aveparvovirus* é composto por vírus que infectam aves, causando enterites nestes animais (KOO *et al.*, 2015). O gênero *Protoparvovirus* possui espécies de vírus que infectam cães, gatos, guaxinins e roedores sendo responsáveis por gastroenterites nesses animais e seus representantes mais conhecidos são os vírus da pancolecopenia felina e o canino parvovirus. O human bufavirus, vírus que pertencente a esse gênero, já foi detectado em

amostras fecais de crianças, porém não há associação com doença no homem até o momento. O gênero *Amdoparvovirus* é composto por Carnivore amdoparvovirus 1-4 e causa “*Aleutian disease*”, doença que acomete visons e furões. O gênero *Tetraparvovirus* é composto por espécies de vírus que infectam primatas e o homem. Apesar de o human parvovirus 4 (PARV4) já ter sido detectado no homem, pouco se sabe sobre sua capacidade patogênica. O gênero *Dependoparvovirus* compreende espécies que não possuem a capacidade de replicação autônoma, necessitando de uma coinfeção com outros vírus. Os *Copiparvovirus* causam infecções gastrointestinais e respiratórias em diversos animais, incluindo bovinos e suínos (COTMORE *et al.*, 2019). O gênero *Erythroparvovirus* é composto pelo parvovirus B19 (B19V) e vírus a ele associados. As espécies classificadas nesse gênero possuem em seu genoma apenas duas regiões promotoras e uma região de poliadenilação. O B19V foi descoberto por Cossart e colaboradores em 1974 durante uma triagem de amostras de doadores de sangue. A amostra quando testado por radioimunoensaio e imunodifusão apresentou resultado anormal e quando submetida à microscopia eletrônica revelou partículas virais semelhantes aos parvovírus. O nome deste vírus é derivado da identificação da amostra onde este agente foi encontrado. (COSSART *et al.*, 1974; COTMORE *et al.*, 2019). O B19V causa, mais comumente, eritema infeccioso em crianças, hidropsia fetal, artropatias e anemia aplástica transitória em pacientes imunocomprometidos (QIU, SÖDERLUND-VENERMO, YOUNG, 2017). Por muito tempo o B19V foi o único membro da família *Parvoviridae* a causar doença no homem.

O gênero *Bocaparvovirus* é composto por 21 espécies que infectam diversos animais, incluindo o homem. A origem do nome do gênero é decorrente dos hospedeiros das primeiras duas espécies classificadas, “bovine” e “canine”. Os *Bocaparvovirus* têm genomas que variam de 5,000-5,500 nt. O capsídeo empacota DNA de polaridade negativa em 90% a 95% das montagens virais após a replicação e codificam uma proteína de peso de 25kDa, a NP1 que é exclusiva do gênero. A maioria das espécies deste gênero foram descobertas por métodos moleculares modernos e ainda não isoladas (COTMORE *et al.*, 2019).

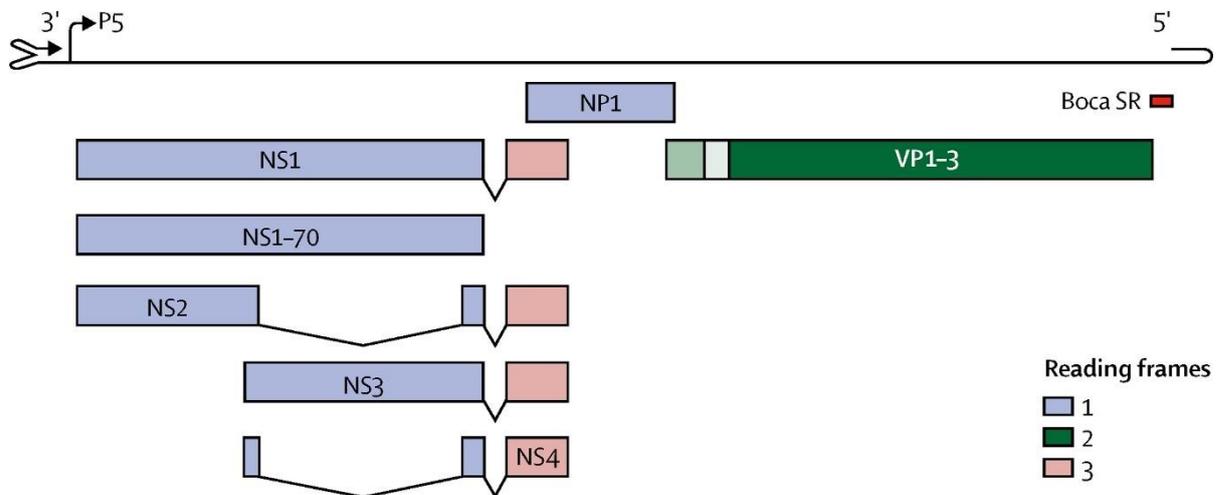
2.3 Aspectos gerais e estrutura do HBoV

A palavra “*parvo*” do latim significa pequeno, e junto com os picornavírus, os parvovírus, são os menores agentes infecciosos a causar doença no homem. Os parvovírus são vírus não envelopados, possui genoma de DNA fita simples linear e simetria icosaédrica de 18 a 26nm de diâmetro. Os virions são compostos de 75% proteína e 25% DNA, sendo resistentes a solventes lipídicos e estáveis a grandes variações de temperatura e pH. A inativação destes

agentes pode ser alcançada com a utilização de agentes oxidantes, formalina e luz ultravioleta (QIU, SÖDERLUND-VENERMO, YOUNG, 2017; ZOU *et al.*, 2016).

O genoma do HBoV contém aproximadamente 5400 nucleotídeos e possui três “*Open Reading Frames*” (ORFs). Duas dessas ORFs codificam cinco proteínas não estruturais, as proteínas NS1-4 e NP-1. A terceira e última ORF localizada na extremidade direita do genoma viral codifica três proteínas estruturais chamadas de VP1, VP2 e VP3 de 671, 581 e 542 aminoácidos, respectivamente (FIGURA 2). A expressão das proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3 ocorre na proporção de 1:1:10, respectivamente (MIETZSCH *et al.*, 2017). A proteína NS1 é fundamental na replicação destes agentes uma vez que atua na ligação e hidrólise de nucleotídeos. Possui dois sítios de ligação de DNA, um responsável pelo reconhecimento da origem de replicação do genoma viral e outro o domínio ativo da endonuclease. A proteína NS2 possui ambos os sítios da NS1 enquanto a NS3 apenas o domínio responsável da função de endonuclease. Ainda não se sabe a função da proteína NS4. A proteína NP-1 é exclusiva do gênero *Bocaparvovirus*, atua na replicação e montagem dos novos virions e é a única proteína dos parvovírus a atuar no processamento do RNAm e expressão das proteínas do capsídeo viral. (QIU, SÖDERLUND-VENERMO, YOUNG; ZOU *et al.*, 2016). Além disso a NP-1 parece ser indutora de apoptose regulando a replicação viral (SUN *et al.*, 2013). As proteínas VP1, VP2 e VP3 compõe o capsídeo viral. A região codificadora de VP1 está contida no mesmo frame de leitura que as proteínas VP2 e VP3, fazendo com que estas proteínas sejam semelhantes, porém a proteína VP1 possui um número maior de nucleotídeos. A proteína VP1 possui atividade enzimática de fosfolipase, a qual é necessária para a evasão da inativação viral via endossomo e lisossomo. Esta atividade enzimática já se mostrou prejudicial para células em estudos *in vitro*. A VP3 é a principal proteína do capsídeo e é responsável pela resposta imunológica do hospedeiro. O HBoV não codifica uma DNA polimerase, precisando, então, infectar células que possuam alta capacidade replicativa. As regiões codificadoras de NS1 e NP-1 são utilizadas para detecção do HBoV por métodos moleculares. (QIU, SÖDERLUND-VENERMO, YOUNG; ZOU *et al.*, 2016; GUIDO *et al.*, 2016)

FIGURA 2 - Proteínas codificadas pelo HBoV.



Fonte: CRISTENSEN *et al.*, 2019.

As extremidades do genoma de DNA fita simples do HBoV apresentam *hairpins* composto de sequências terminais repetitivas com alta concentração de timina e citosina.

No geral, o genoma dos parvovírus possui em suas extremidades sequências terminais repetitivas palindrômicas que se dobras e adquirem estrutura de “*hairpins*”. Essas estruturas são essenciais para a replicação deste vírus uma vez que funcionam como *primers* para a DNA polimerase da célula hospedeira sintetizar uma nova fita de DNA viral, tornando o genoma do vírus em DNA fita dupla durante uma etapa da replicação (QIU, SÖDERLUND-VENERMO, YOUNG, 2017; ZOU *et al.*, 2016).

O capsídeo do HBoV possui características comuns com os outros membros da família *Parvoviridae*. As depressões, saliências elevadas e projeções em seus eixos são ocasionadas pela distribuição e organização das proteínas estruturais que se juntam em montantes de 60 capsômeros e empacotam o genoma viral. As projeções observadas na superfície do capsídeo viral designam o sítio de ligação com receptores das células hospedeiras em outros membros da família *Parvoviridae* (GURDA *et al.*, 2010).

2.4 Replicação

Os mecanismos pelos quais os HBoV se replicam ainda não estão totalmente claros. No entanto, a replicação de outros parvovírus é bem descrita na literatura. Acredita-se que o HBoV se ligue a um ou mais receptores nas membranas das células epiteliais aéreas e células da mucosa gastrointestinal, fixando-se através das proteínas estruturais VP1 a VP3. Em seguida,

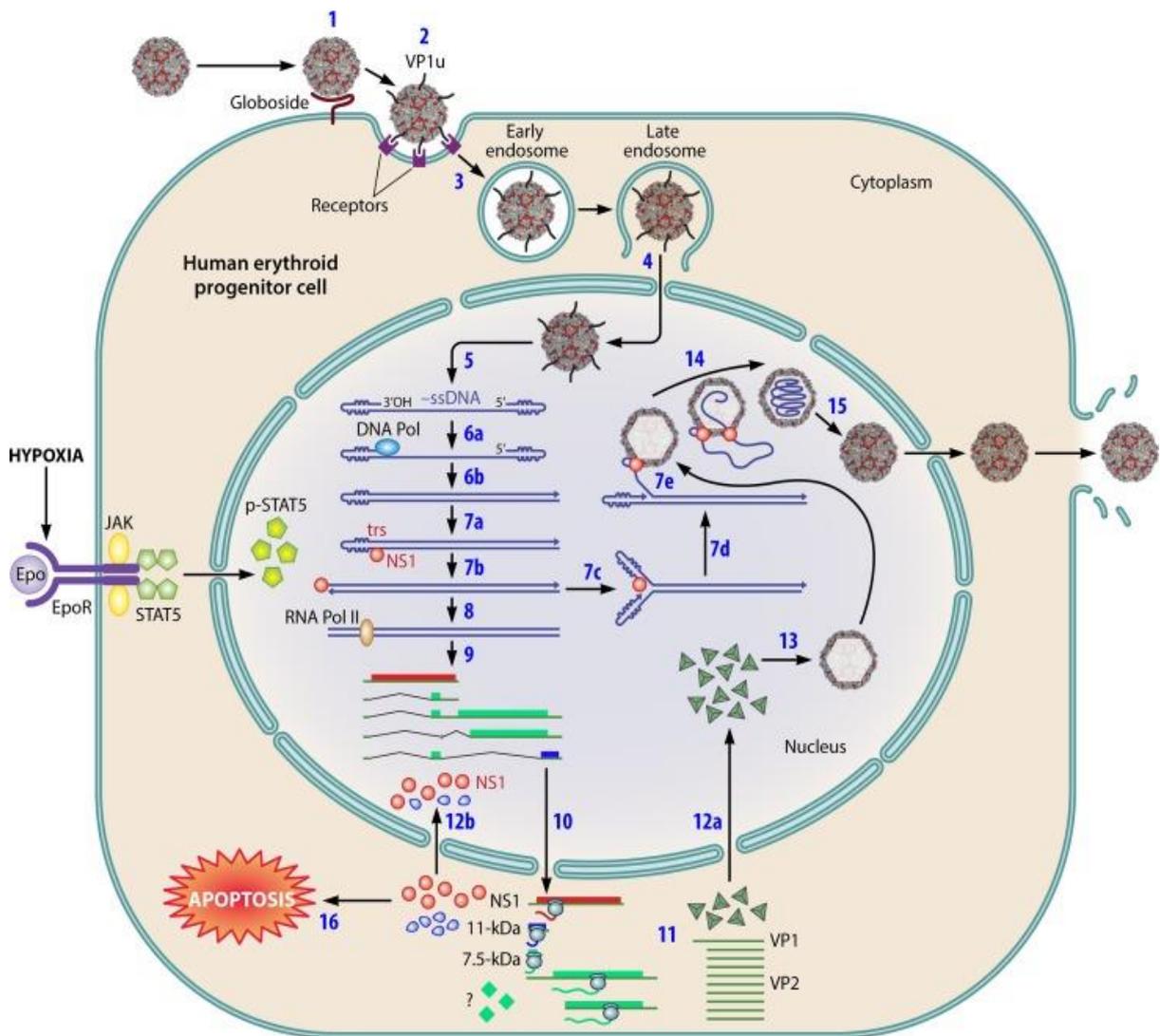
os agentes penetram na célula hospedeira por endocitose e permanecem dentro dos endossomos, evadindo-se da inativação endossomal por ação da VP1, até chegar próximo da região nuclear onde são liberados da vesícula por um processo ainda desconhecido. Uma vez liberados no citoplasma, por um processo dependente do citoesqueleto, os vírus são transportados e chegam ao núcleo da célula hospedeira através dos poros da carioteca. No núcleo, ocorre o desnudamento do genoma viral. Por não possuir nenhuma polimerase viral, a replicação ocorre totalmente por uma DNA polimerase da célula hospedeira utilizando as estruturas repetitivas nas extremidades do genoma que adquirem formação de *hairpins* que fornece a extremidade 3' OH livre para a polimerase celular sintetizar um intermediário do genoma viral de DNA fita dupla que funciona como um molde para a transcrição e replicação (LUO, QIU 2015; COTMORE *et al.*, 2019).

A proteína NS1 tem papel importante na replicação do genoma viral, uma vez que possui domínio com ação de endonuclease que combina as duas fitas de DNA e promove um corte na região específica das sequências palindrômicas. Além disso, esta proteína possui atividade de DNA helicase. A NP1 é codificada exclusivamente por espécies do gênero *Bocaparvovirus* e promove o processamento de RNA mensageiro e poliadenilação (SHEN *et al.*, 2015). A NP1 também regula a expressão das proteínas estruturais. Em mutantes *knockout* para NP1, há baixa expressão das proteínas que compõem o capsídeo viral (ZOU *et al.*, 2016). Após a transcrição, os RNA mensageiros são maturados com o CAP 5' por ação de guaniltransferases e metiltransferases celulares e adquirem cauda poli A através da polimerase poli A do hospedeiro. O HBoV, codifica um *non-coding* RNA de 140 nucleotídeos chamado de Boca SR que regula a expressão de proteínas não estruturais, fundamentais para a replicação do genoma viral. (WANG *et al.*, 2017).

O ciclo replicativo do HBoV ainda não está completamente estabelecido. Ainda não se sabe que proteína celular funciona como receptor para a infecção. Entretanto o B19V possui seus mecanismos replicativos bem explicados, e por ser da mesma classificação de Baltimore e da mesma família viral, o ciclo replicativo do B19V pode ser utilizado para explicar o ciclo de vida dos demais parvovírus (FIGURA 3). O B19V transcreve apenas um único RNA mensageiro que é regulado por fatores transcricionais, como CREBP, GATA e Oct1, além de peptídeos virais. Após a transcrição do RNAm, este sofre *splicing* dando origem a 12 RNA mensageiros maduros que codificam as proteínas estruturais (VP1 e VP2) e três que codificam as proteínas não estruturais (NS1 e proteínas de 7kDa e 11-kDa). Em seguida o RNAm viral é metilado na extremidade 5' e poliadenilado em sítios específicos do genoma. As proteínas estruturais, produzidas na fase tardia da replicação, se agrupam em montantes de 60 capsômeros

e são transportadas para o núcleo e empacotam o DNA viral recém replicado. Unicamente fitas simples de DNA são empacotadas nos capsídeos. Tanto fitas de polaridade positiva quanto negativa são empacotadas isoladamente. Acredita-se que o processo de replicação do B19V seja semelhante a outros parvovírus, incluindo o gênero *Bocaparvovirus* (GANAIE, QIU, 2018).

FIGURA 3 - Esquema replicativo de B19V.



Fonte: QIU, SÖDERLUND-VENERMO, YOUNG, 2017.

O B19V infecta células progenitoras da medula óssea se ligando ao antígeno P através da VP1 (1). A ligação ao receptor promove uma mudança conformacional na proteína VP1 (2). A VP1u interage com co-receptores e promovendo a endocitose da partícula viral (3). O vírus é liberado no citoplasma (4) e transportado para o núcleo através do citoesqueleto onde passam pelos poros da carioteca e ocorre o desnudamento viral (5). Tão logo é exposto ao núcleo, o genoma viral é convertido em DNAdf por ação de polimerases celulares (6). Moléculas do hospedeiro STAT5 fosforilada, regulada por eritropoetina, funciona como fator de polimerização de DNA que é essencial para a conversão do genoma viral em DNAdf, após a conversão em DNAdf,

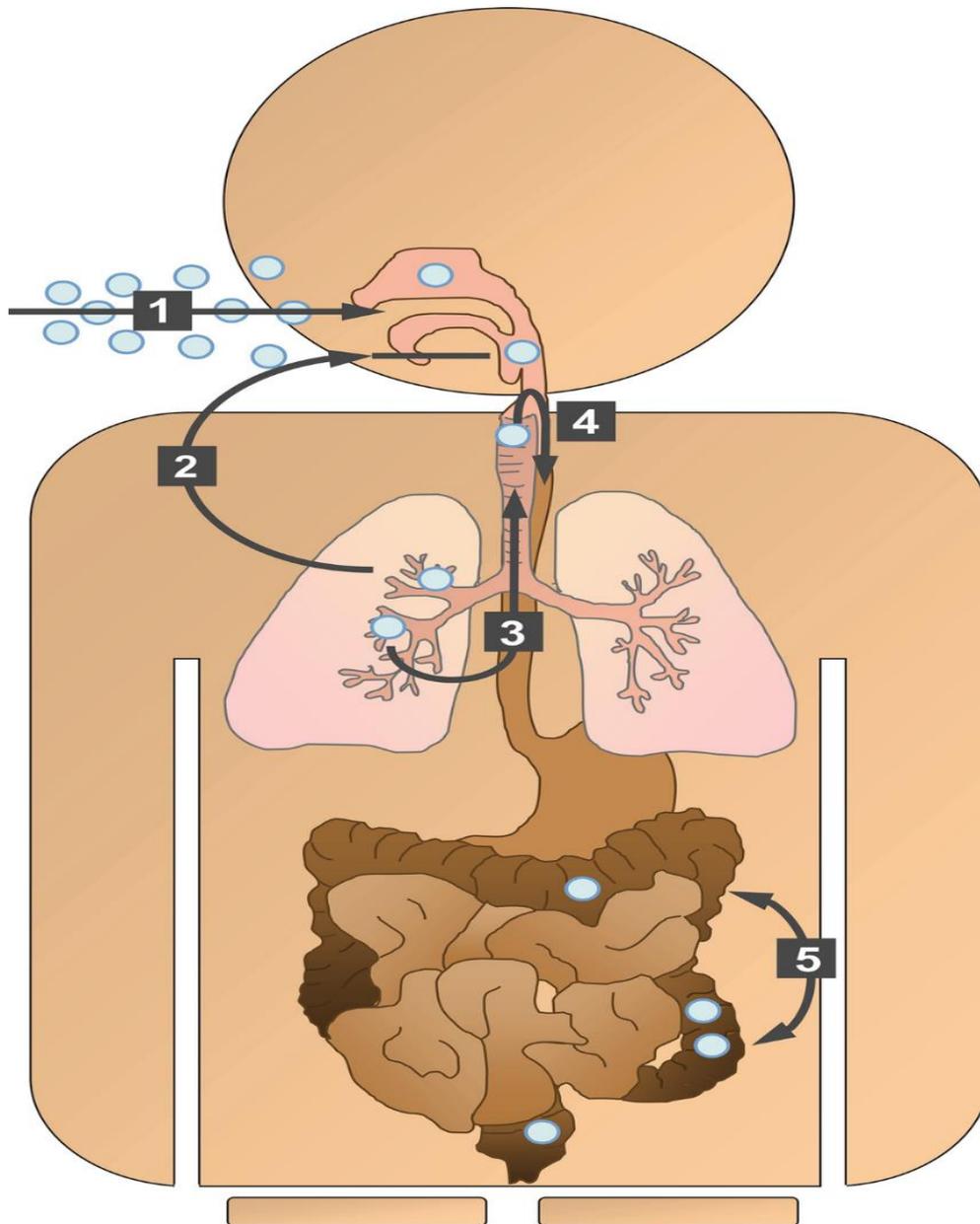
a proteína NS1 se liga a elementos de ligação de NS1 e corta uma das fitas na extremidade esquerda. Este evento cria uma nova extremidade 3' OH livre para a replicação do genoma viral (7a-7d). Quando a molécula de DNA está em fita dupla a RNA polimerase II celular transcreve o RNAm viral e traduzido nos ribossomos (8-10). As proteínas do capsídeo, VP1 e VP2, formam os capsômeros (11-12a) e se complexam em capsídeo vazio (13). A proteína NS1 corta as duplas fitas de DNA (7e) e o genoma DNAs viral é empacotado no capsídeo (14). Após traduzidas a NS1 retorna para o núcleo e potencializa a replicação viral (12b) e é capaz de induzir apoptose (16) liberando a partícula viral madura (15).

2.5 Patogênese

Apesar de ser detectado em amostras respiratórias, fezes e sangue, os mecanismos pelos quais o HBoV causa doença ainda não estão bem estabelecidos. Estudos com cultivo de células primárias de epitélio aéreo (HAE-ALI) demonstram que o HBoV pode se replicar em células sem alta atividade replicativa causando perda da integridade celular, perda dos cílios, ruptura das junções celulares e hipertrofia de células epiteliais e infecção persistente. Apesar da dificuldade de cultivar o vírus em modelos *in vitro* e animais estes achados sugerem que a patogênese do HBoV seja ocasionada por este tipo de dano às células do epitélio aéreo (DENG *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2012). A FIGURA 4 mostra detalhes de como o HBoV infecta as células do trato respiratório e gastrointestinais.

O HBoV pode causar infecções assintomáticas (BYINGTON *et al.*, 2015; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 2008), infecções não complicadas do trato respiratório superior (NOKSO-KOIVISTO *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2010) e infecções do trato respiratório inferior graves (MOESKER *et al.*, 2015; ESKOLA, XU, SÖDERLUND-VENERMO, 2017). O HBoV também pode causar gastroenterites agudas, porém seu papel na doença é questionado devido sua alta taxa de coinfeção com outros agentes virais, principalmente rotavirus e norovirus (SIQUEIRA *et al.*, 2017; DE *et al.*, 2017). O HBoV infecta as vias aéreas superiores e inferiores podendo causar resfriado, doença semelhante a gripe, bronquiolite, asma e pneumonia cursando com manifestações clínicas semelhantes as infecções respiratórias causadas por outros vírus respiratórios como tosse, febre e dispneia (LEE *et al.*, 2019; KARALAR *et al.*, 2010) e diarreia, como a principal manifestação das gastroenterites, que também representa uma das principais causas de mortalidade em crianças menores de cinco anos (LIU *et al.*, 2015).

FIGURA 4 - Patogênese do HBoV.



Fonte: SCHILDGEN O; SCHILDGEN V, 2018.

O HBoV infecta as células do hospedeiro através de gotículas e aerossóis que podem ser levadas até o trato respiratório através das mãos ou aspiradas durante a respiração (1). Na nasofaringe o HBoV infecta o sítio, causando infecção respiratória alta (2) que pode se disseminar até os pulmões (3). A infecção do trato gastrointestinal é transmitida por deglutição das partículas virais presente no ambiente e alimentos, ou deglutição das secreções respiratórias expectorada (4-5).

O HBoV é transmitido principalmente por secreções respiratórias, como gotículas e aerossóis contaminados com o agente e transmissão fecal-oral. Outra forma de transmissão é através de fômites contendo o vírus, uma vez que estes agentes podem permanecer intactos fora

do hospedeiro por várias horas (QIU, SÖDERLUND-VENERMO, YOUNG, 2017). Além disso, o HBoV foi detectado em esgotos, lagos e crustáceos, sugerindo o possível risco de contaminação por alimentos frescos (SALVO *et al.*, 2018; LA ROSA *et al.*, 2018). A transmissão nosocomial já foi relatada em unidades de terapia intensiva, tanto em adultos quanto em crianças. A transmissão dentro do ambiente hospitalar é ocasionada durante o manejo dos pacientes por parte da equipe médica que pode adquirir a infecção e/ou transmitir entre os pacientes do setor de atendimento (HONG *et al.*, 2014; DURIGON *et al.*, 2010).

O HBoV possui alto nível de coinfeção com outros patógenos virais. Este fato dificulta o entendimento da patogênese deste agente, uma vez que nestas situações não se sabe se o HBoV é de fato o agente etiológico da doença. Entretanto, como demonstra JIANG *et al.* (2016), as infecções em que apenas o HBoV é detectado apresenta maior carga viral quando comparado com coinfeções. Ainda neste estudo, as infecções com alta carga viral de HBoV apresentaram maior gravidade da doença, demonstrando que o vírus pode ser o agente etiológico dessas infecções (JIANG *et al.*, 2016). Outro estudo mostra que as crianças com infecções respiratórias por HBoV com elevada carga viral possuem maior período de hospitalização (PRINCIPI *et al.*, 2015). Estudos semelhantes comprovam estes achados (ZHAO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2014; GHIETTO *et al.*, 2015).

2.6 Resposta Imune

Um componente muito importante do sistema imune é o papel dos interferons nas infecções por vírus durante o primeiro estágio da infecção viral. Durante esta fase, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) reconhecem os componentes virais, como o genoma viral e proteínas virais através de receptores que reconhecem patógenos (PRRs) para iniciar a sinalização que iniciam a transcrição e síntese de IFN α/β . O fator regulatório de interferon 3 (IRF-3) é um importante elemento nesse processo (LORENZI AND COELHO-CASTELO, 2011). Os vírus evoluíram o suficiente para adquirir mecanismos de evasão do sistema imune e assim continuam infectando seus hospedeiros e gerando sua progênie. Em um estudo realizado com o objetivo de demonstrar a capacidade de proteínas do HBoV de inibir a síntese de IFN β , os pesquisadores mostraram que as proteínas não estruturais NP1 e NS1 inibem significativamente a produção de IFN β através da ligação ao domínio de ligação de DNA do IRF-3, levando à interrupção da produção de IFN β (ZHANG *et al.*, 2012)

A resposta imune celular contra o HBoV é pouco descrita na literatura. A resposta inflamatória ocasionada pela infecção do HBoV induz a alta concentração de fator de crescimento endotelial, TNF- α , TNF- β e inibidores teciduais de metaloproteínas (TIMP-1)

(QIU, SÖDERLUND-VENERMO, YOUNG, 2017). A concentração de INF- γ e IL-2 é detectada em níveis elevados quando comparada com a infecção por outros vírus respiratórios (CHUNG *et al.*, 2008). Além disso, crianças com bronquiolites por HBoV apresentam concentrações de IFN- γ , IL-2, e IL-4 elevadas (CHUNG *et al.*, 2008) O aumento dessas citocinas parece contribuir para exacerbação da asma (CHRISTENSEN *et al.*, 2019).

Anticorpos IgG e IgM específicos à VP1 e VP2 são detectados comumente em pacientes com infecção e em fase de convalescença. (LINDNER *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2008) A molécula de IgG pode permanecer sendo detectada por vários anos após a infecção e é utilizada em estudos soropidemiológicos (HUSTEDT *et al.*, 2012; GUIDO *et al.*, 2012).

2.7 Epidemiologia

O HBoV circula em todos os continentes causando infecções respiratórias e gastroenterites em crianças e adultos (REMOLINA *et al.*, 2015). Nas infecções respiratórias, considerando as vias aéreas superiores e inferiores, o HBoV possui prevalência de 2,6% a 28,6% (AKTURK *et al.*, 2015; DELUCA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016; LJUBIN-STERNAK *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2018) e prevalência de 1,2% a 41% em infecções gastrointestinais (CAMPOS *et al.*, 2016; LA ROSA *et al.*, 2016; TYMENTSEV *et al.*, 2016; ALAM *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2017).

O HBoV possui quatro genótipos (HBoV1-4), sendo diferenciado na quantidade de nucleotídeos nas proteínas virais. Apesar de ser pequenas alterações, o HBoV1 está associado as infecções do trato respiratório enquanto o HBoV2-4 é mais comumente detectado nos quadros de gastroenterites (GUIDO *et al.*, 2016; KUMTHIP *et al.*, 2021; NANTACHIT *et al.*, 2021).

A detecção do HBoV, em muitos casos, ocorre com a co-deteção com outro patógeno tanto nas infecções respiratórias quanto gastrointestinais. A taxa de co-deteção do HBoV com outros patógenos virais varia de 49% a 75% em infecções respiratórias (JIANG *et al.*, 2016; MOESKER *et al.*, 2015; KENMOE *et al.*, 2016) e em infecções gastrointestinais o número de co-deteção pode chegar até a 98% (ALAM *et al.*, 2015). Não se sabe a real explicação deste evento, porém há sugestões de que este agente consiga causar infecção persistente mesmo após o término das manifestações clínicas, sendo assim detectado (DENG *et al.*, 2016).

Quanto à circulação, este vírus não apresenta nenhum padrão característico, diferente de outros vírus respiratórios, como o RSV e FLU A que circula durante o período de inverno ou chuvoso da região (MOURA *et al.*, 2013).

Há poucos artigos no Brasil sobre o HBoV em infecções respiratórias, dentre os

encontrados durante a produção deste trabalho, há estudos em Salvador, Recife, Porto Alegre, São Paulo e Rio de Janeiro apresentando prevalência de 20,9%, 19%, 13,2%, 10,7% e 2,4%, respectivamente (NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2018; PILGER *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; DURIGON *et al.*, 2010). Estes estudos foram realizados em curtos períodos, assim, dificultando a análise de uma possível circulação sazonal no Brasil. Em outros países da América do Sul, tais como Colômbia e Peru, mostraram prevalência do HBoV de 28,6% e 25,1%, respectivamente (REMOLINA *et al.*, 2015; SALMÓN-MULANOVICH *et al.*, 2011). Um estudo retrospectivo realizado no Chile detectou o HBoV em amostras de fezes de crianças com gastroenterites coletadas em 1985, confirmando que este agente possui uma longa circulação (LEVICAN *et al.*, 2013). Na Argentina, a prevalência é mais baixa, variando de 6,8% a 10,8% (DELUCA *et al.*, 2016; SALMÓN-MULANOVICH *et al.*, 2011).

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico de infecções respiratórias geralmente inclui a detecção do agente por imunofluorescência, cultura viral em células ou tecidos, sorologia e detecção de ácidos nucleicos por técnicas moleculares (HEMATIAN *et al.*, 2016; GADSBY *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2020). Esta última, desenvolvida em 1985 possibilitou o diagnóstico de infecções virais por meio da detecção sensível do material genético de agentes em amostras biológicas e sua aplicação está cada vez mais frequente. Pela metodologia, qualquer vírus é potencialmente detectável (TORRES *et al.*, 2016).

2.8.1 Isolamento viral

O padrão ouro da microbiologia consiste no cultivo do microrganismo e, no caso dos vírus, o isolamento do agente em cultura de células/tecidos. O HBoV pode ser cultivado no modelo de cultura de epitélio pseudoestratificado primário das vias aéreas humanas (do inglês: human airway epithelium (HAE) culture model). Este modelo tem sido usado para o estudo de diversos vírus respiratórios (DENG *et al.*, 2013; ZOU *et al.*, 2019). O HBoV também pode ser cultivado em linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2). Apesar de ser dificilmente utilizado no diagnóstico de infecção por HBoV devido à dificuldade de isolamento do agente, essas culturas são importantes para compreender a fisiopatologia deste vírus (GHETTO *et al.*, 2017).

2.8.2 Técnicas moleculares

As técnicas de biologia molecular possuem elevada sensibilidade e especificidade e com a sua aprimoração foi possível descrever e detectar diversos microrganismos até então desconhecidos, incluindo o HBoV (ALLANDER *et al.*, 2005). A reação em cadeia da polimerase, suas variantes e o sequenciamento gênico permitiram melhor entender a biologia do agente (QIU, SÖDERLUND-VENERMO, YOUNG, 2017).

Atualmente há painéis de kits comerciais para detecção de diversos vírus causadores de doenças respiratórias e o HBoV já está incluído em muitos deles (SAILS *et al.*, 2017; RASHID *et al.*, 2018). Para a detecção do HBoV por estas técnicas, as sequências de NS-1 e NP1 são geralmente utilizadas como alvo de amplificação devido sua elevada conservação na espécie (MORENO *et al.*, 2016; LIGOZZI *et al.*, 2017). Por estas metodologias é possível diferenciar os quatro genótipos deste agente. Além disso, é possível identificar a carga viral presente na amostra biológica, o nível de expressão genica de determinada proteína durante uma infecção aguda e associá-los com a gravidade da doença (XU *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2016).

2.8.3 Sorologia

O diagnóstico de infecções virais por detecção de anticorpos antivirais específicos é uma técnica tradicional muito utilizada na clínica médica do Brasil. Além de ser uma técnica rápida, e de fácil reprodução apresenta também custo reduzido quando comparado à outras técnicas para diagnóstico viral (NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2018). O método possui utilidade clínica, porém é limitado pela necessidade de comparação de anticorpos de fase aguda e anticorpos convalescentes (STORCH, 2000). Outra limitação é o período ideal para a coleta de sangue, que pode variar de acordo com a suspeita clínica. Para o diagnóstico de B19V por exemplo, o período ideal para a coleta da amostra é 8 a 10 dias após o início da infecção, período necessário para a soroconversão (MAKHLOUF, ELWAKIL, IBRAHIM, 2017).

Há disponíveis no mercado kits baseados em partículas semelhantes aos antígenos virais de HBoV para detecção de anticorpos da classe IgG e IgM. Trata-se de um teste de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando proteínas recombinantes do capsídeo viral, comumente VP2 e VP3. Embora seja uma técnica clássica, a sorologia para diagnóstico de infecção por HBoV deve ser combinada com outra técnica mais sensível, uma vez que não faz a detecção do agente propriamente dito (XU *et al.*, 2017).

3. HIPOTESES

- Os HBoV são agentes etiológicos frequentes de pneumonias na população infantil do estado do Ceará.
- Não é possível diferenciar clinicamente as pneumonias causadas por HBoV dos demais vírus respiratórios.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar os padrões clínico-epidemiológicos das pneumonias por human bocavirus em crianças de até cinco anos atendidas em um hospital de referência na cidade de Fortaleza-Ceará, de 2013-2014.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência de pneumonias por human bocavirus na população de estudo e comparar com outros vírus respiratórios já estudados em Fortaleza.
- Descrever os aspectos clínico-epidemiológicos das pneumonias onde foram detectados os human bocavirus.
- Comparar a circulação do human bocavirus com a de outros vírus respiratórios estudados em Fortaleza.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo

Este estudo é do tipo transversal, retrospectivo, observacional e descritivo.

5.2 Local de estudo

O estudo foi conduzido na cidade de Fortaleza-CE (3° 43' S -38° 32' W) que possui 314,353 km² de medida territorial e 2.686.612 habitantes. A cidade possui clima Tropical Quente Sub-úmido com temperatura média de 26°C a 28°C, com dois períodos bem definidos: o chuvoso, que predomina de março a junho e o seco, que se estabelece durante o restante do ano. Os dados de território e população foram descritos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e

Estatística em 2020 (IBGE) e os dados climáticos pela Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME). As crianças incluídas no estudo foram atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS). O HIAS é uma instituição de referência para pacientes infanto-juvenis no Estado do Ceará e oferece atendimento público de urgência, com cerca de 17 mil atendimentos por mês, unidade de terapia intensiva pediátrica, enfermarias, e aproximadamente 830 internações por mês. O HIAS é o único hospital público infantil terciário do Estado do Ceará referência no atendimento a crianças e adolescentes com doenças graves e de alta complexidade e reconhecido como instituição de ensino e pesquisa.

5.3 População de estudo

Foram incluídos neste estudo crianças de 0 a 60 meses, de ambos os sexos, diagnósticas clinicamente com pneumonias no HIAS durante o período de janeiro de 2013 a dezembro de 2014. Sinais e sintomas como tosse, febre, taquipneia, retrações do torácicas, crepitações, dor no tórax e hipoxemia são algumas das apresentações de pneumonias, além disso achados radiológicos do pulmão como condensação, infiltrado intersticial e derrame pleural foram usados para o diagnóstico de pneumonia, de acordo com a Sociedade Brasileira de Pediatria (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2018).

Os dados clínico-epidemiológicos foram coletados nos prontuários por meio de questionário estruturado com perguntas fechadas. As principais variáveis estudadas foram sexo, idade de admissão, enfermaria, fatores de risco (casos de IRA na família, tabagismo passivo, frequência em creche ou escola, amamentação, prematuridade, imunossupressão) e comorbidades (doenças cardíacas, pneumopatias, neuropatias, asma, refluxo gastresofágico). O ANEXO A mostra a ficha clínico-epidemiológica. Crianças hospitalizadas nos últimos 14 dias, com história de pneumonia aspirativa ou diagnóstico de pneumonia nosocomial foram excluídas do estudo. Consideramos o atendimento das crianças em UTIs e Reanimação como PAC grave.

5.4 Questões éticas

O termo de consentimento livre e esclarecido foram assinados pelos pais ou responsáveis das crianças participantes (ANEXO B). E o protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HIAS (070/09), que pode ser acessado no ANEXO C.

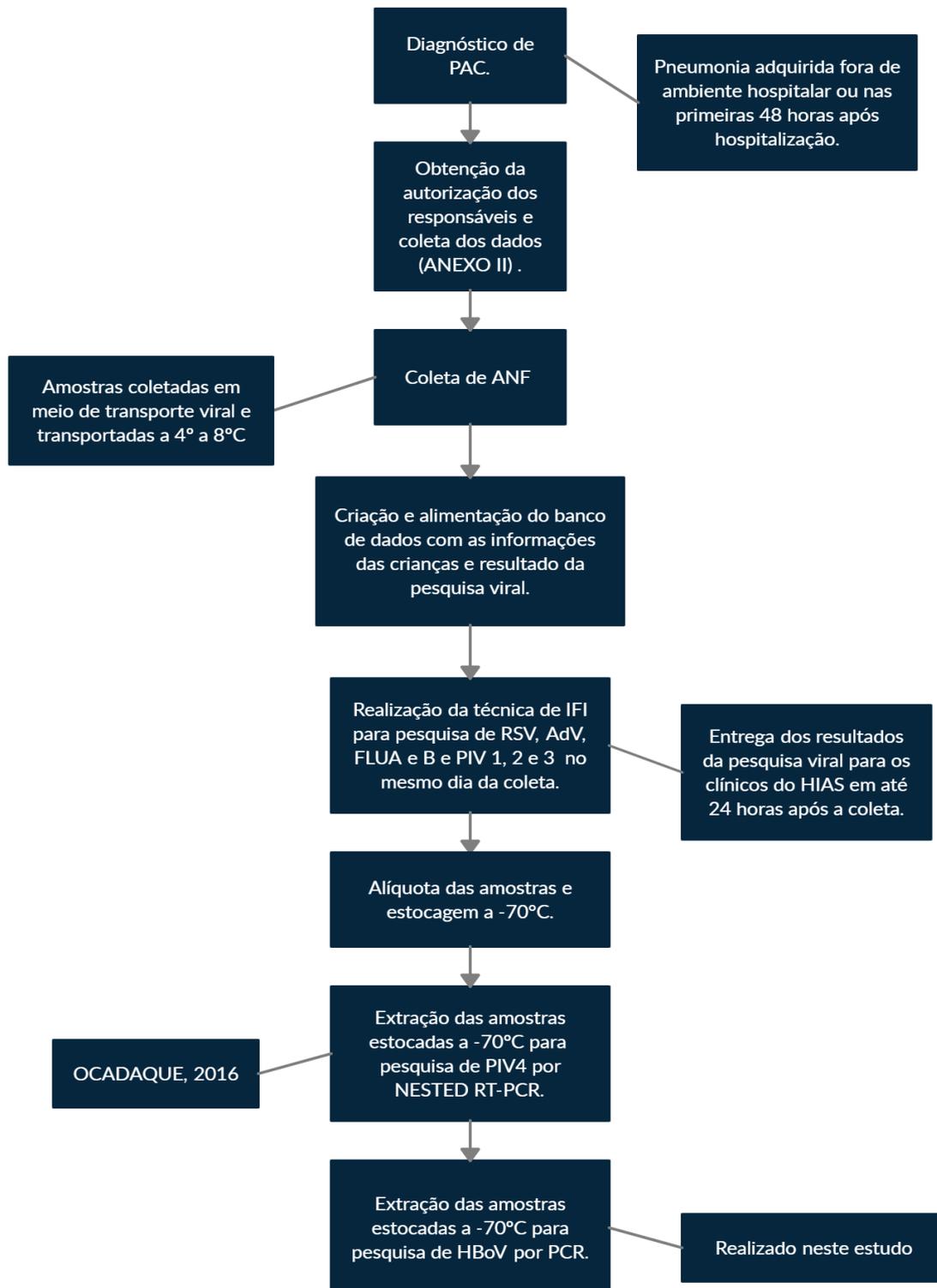
5.5 Amostras respiratórias

Após a obtenção do consentimento de participação da pesquisa pelos responsáveis pelas crianças, uma amostra de aspirado de nasofaringe (ANF) foi coletado logo após o diagnóstico médico de pneumonia. Um único ANF foi coletado de cada criança incluída no estudo. O ANF foi coletado utilizando uma sonda inserida na narina com 4 a 6cm de profundidade, até a nasofaringe e a secreção foi aspirada com o auxílio de uma seringa (SUNG *et al.*, 2018). A sonda utilizada foi a sonda uretral nº 6, que possui calibre de 6 Fr. Todas as amostras foram coletadas em tubo Falcon contendo 3 mL de meio de transporte viral: composto por meio essencial mínimo com L-glutamina, penicilina, estreptomicina e anfotericina B, e transportadas a 4°C a 8°C ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Ceará (LVUFC), onde foram processadas. Tão logo que as amostras chegassem no laboratório todas foram processadas e submetidas à imunofluorescência indireta (IFI). Além disso, 1 mL dessas amostras foram armazenadas à -70°C para posterior processamento por PCR.

5.6 Pesquisa viral

Todas as amostras de ANF coletadas foram submetidas anteriormente a IFI para pesquisa de RSV, AdV, FLU A, FLU B e PIV 1, 2 e 3. A técnica foi realizada no mesmo dia em que as amostras foram coletadas e o resultado foi entregue para os clínicos do HIAS em até 24 horas após a coleta. É possível ver com detalhes o procedimento da técnica de IFI no APENDICE A. Além disso, estas amostras foram submetidas a pesquisa de PIV 4 por Nested RT-PCR em outro projeto realizado no LVUFC (OCADAQUE, 2016). Os resultados dessas pesquisas foram armazenados em um banco de dados para posterior análise de resultados. Neste estudo, as amostras foram submetidas a PCR para detecção de HBoV. A técnica de PCR para detecção de HBoV citada neste parágrafo será detalhada a seguir. A FIGURA 5 mostra as etapas da pesquisa viral.

FIGURA 5 - Fluxograma: Etapas da pesquisa viral na população de estudo.



PAC = pneumonia adquirida na comunidade; ANF = aspirado de nasofaringe; IFI = imunofluorescência indireta; RSV = Respiratory syncytial virus; AdV = Adenovirus; FLUA = Influenza A; FLUB = Influenza B; PIV1 = Parainfluenza virus 1; PIV2 = Parainfluenza virus 2; Parainfluenza virus 3; PIV4 = Parainfluenza virus 4; HBoV = Human bocavirus.

5.6.1 Detecção viral por método molecular

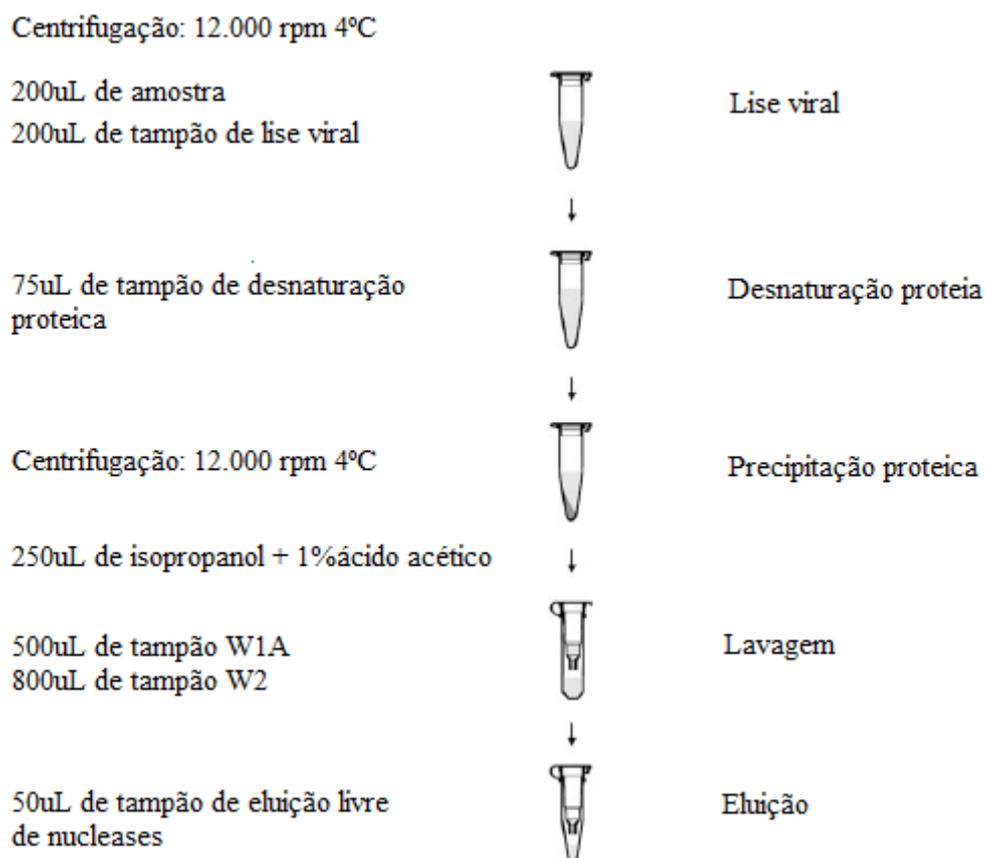
A técnica de PCR foi empregada para detecção de HBoV nas amostras de ANF coletadas das crianças submetidas no estudo.

5.6.2 Extração de ácidos nucleicos

A primeira etapa para detecção viral por técnicas moleculares é a extração do ácido nucleico viral. O DNA/RNA viral foi extraído utilizando o AxyPrep™ BodyFluid Viral DNA / RNA Miniprep Kit (Axigen Biotechnology, California, USA), seguindo orientações do fabricante.

A extração do material genético foi realizada de acordo com os seguintes passos: (1) 200uL da amostra foram centrifugadas à 12000rpm em micro centrífuga refrigerada; (2) o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Eppendorff® e adicionado 200uL do tampão de lise viral e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos; (3) em seguida foi adicionado 75uL do tampão de precipitação proteica e centrifugação por 5 minutos 12000rpm em micro centrífuga refrigerada; (4) o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 250uL de isopropanol+1% de ácido acético e homogeneizado; (5) a mistura anterior passou por filtração em mini colunas com filtros fornecidas pelo kit e centrifugado por 1 minutos a 6000 rpm em micro centrífuga refrigerada; (6) seguido de lavagem com 500uL de tampão e incubado a temperatura ambiente por 1 minuto. (7) após centrifugação por 1 minutos a 12000 rpm em micro centrífuga refrigerada, o material filtrado foi descartado e adicionado 800uL de tampão de lavagem 2 sobre o filtro da mini coluna e nova centrifugação por 1 minutos a 12000 rpm em micro centrífuga refrigerada. (8) por fim, a mini coluna foi inserida em um novo tubo Eppendorff® e 50uL de tampão de eluição foi adicionado sobre o filtro da mini coluna e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugado por 1 minutos a 12000 rpm em micro centrífuga refrigerada. A FIGURA 6 detalha o fluxograma da técnica de extração utilizando mini colunas. O produto extraído foi armazenado no freezer -70°C até o momento de seu uso.

FIGURA 6 - Fluxograma de extração de ácidos nucleicos seguindo o protocolo de mini colunas com filtros.



Fonte: Modificado de Protocols Axygen® AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit.

5.6.3 Detecção de HBOV por PCR

Para a detecção de HBOV os seguintes *primers* foram utilizados primers F-5'-TATGGCCAAGGCAATCGTCCAAG-3', R-5'-GCCGCCTGAACATGAGAAACAGA-3'. Estes *primers* amplificam a região NS1 do HBOV. O fragmento amplificado possui 291pb. A reação foi realizada utilizando o Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase, seguindo as recomendações do fabricante. Por tanto, o mix da reação foi preparado da seguinte forma: 32,1 µL de água ultra-pura livre de nuclease; 5 µL de buffer com MgCl₂; 0,5 µL de dNTP a 0,2 mM; 1 µL de primer forward e reverse; 0,2 µL de Taq polimerase a 1U/µL e 10uL do ácido nucleico extraído. A reação de amplificação seguiu as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 54 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos (ZHANG *et al.*, 2008). A reação foi realizada no termociclador MultiGene™ (Labnet, New Jersey, USA).

5.6.4 Eletroforese em gel de agarose

Para visualização dos amplicon resultantes das PCR para detecção de HBoV e PIV4, a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Pronadisa®, Conda™) em TBE buffer (Invitrogen™) foi executada. Para isso 10uL do amplicon foi corado com 1uL Loading Buffer Gel Red + Xilenocianol (Quatro G). As amostras foram submetidas a 110 volts por 40 minutos em cuba horizontal. As bandas obtidas por PCR foram visualizadas através de transluminador de luz ultravioleta e imagens do gel foram capturadas por fotodocumentador. Toda corrida eletroforética foi percorrida utilizando marcador de peso molecular de 100pb e controle positivo para HBoV, no primeiro e segundo poço do gel, respectivamente e controle negativo no último poço.

5.7 Análise estatística

Os resultados da pesquisa de HBoV foram incluídos no banco de dados contendo as características clínico-epidemiológica das crianças e os resultados de IFI e PIV4, realizados anteriormente. A análise estatística foi realizada etapas; (1) pacientes positivos, independente do vírus, e negativos para vírus e (2) grupos de pacientes positivos para cada um dos nove vírus pesquisados foram usados. Estes dados foram analisados por Teste Exato de Fisher, correlação de Spearman e Odds ratio. Para todos os casos, o nível de significância foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Características gerais da população estudada

Foram incluídas neste estudo um total de 545 amostras coletadas de crianças diagnosticadas com pneumonias atendidas no HIAS. Do total de amostras coletadas, 261 (47.9%) foram coletadas em 2013 e 284 (52.1%) coletadas em 2014. A maioria das crianças incluídas neste trabalho possuíam de 0 a 12 meses de vida (357/65.5%) e 58.1% (317) são do sexo masculino. A média de idade em meses da população estudada foi de 13,3. A TABELA 1 mostra todas as características clínicas da população estudada e comparação entre as crianças que foram positivas e negativas para vírus.

No presente estudo, 279 (51,2%) crianças foram atendidas no setor de emergência/observação, 208 (38,2%) crianças atendidas na enfermaria, 49 (8,9%) na reanimação e nove (1,7%) nas UTIs. A maioria das pneumonias foram consideradas leves, enquanto 10,6% (58/545) das crianças, foram atendidas na UTI ou setor de reanimação.

Embora a faixa etária mais frequente nos casos de PAC tenha sido crianças em seu primeiro ano de vida e o sexo mais acometido tenha sido o masculino, não observamos nenhuma associação com significado estatístico entre o grupo positivo e negativo para vírus nessas variáveis. Além disso, também não observamos associação estatística entre os grupos positivo e negativo para vírus em relação ao local de atendimento das crianças.

A maior parte das crianças possuíam pelo menos um fator de risco (384/70,4%). Dessas 384 crianças com fatores de risco, 137 (35,6%) estavam expostas a mais de um fator de risco. Os fatores de risco mais comumente observados foram presença de infecção respiratória nos familiares e fumo passivo, visto em 42,2% e 25% casos, respectivamente. Apesar de comum as crianças apresentarem mais de um fator de risco, não encontramos nenhuma associação estatística quanto a deles ou a combinação deles à PAC por vírus.

Quanto às comorbidades, a população estudada, em sua maioria, estava previamente hígida (402/545; 73,4%), ou seja, não apresentava nenhuma doença de base. Um total de 143 crianças tinha pelo menos uma comorbidade. As doenças de base mais comumente observadas neste estudo foram as cardiopatias seguidas de neuropatia, observada em 11,9% (76/545) e 8% (44/545) das crianças. Detalhes podem ser acessados na TABELA 1.

A presença de diversos sinais e sintomas respiratórios e a combinação deles são comuns nas infecções respiratórias agudas. Dentre eles, destacam-se a tosse, dispneia, febre e coriza que foram apresentados por 80,1% (437/545), 77,2% (421/545), 58,5% (319/545) e 53,3% (291/545) crianças com PAC, respectivamente. Manifestações gastrointestinais, como anorexia, vômitos e diarreia também foram observadas nas crianças com pneumonias.

Comparando apenas a população positiva para vírus e a negativa, não encontramos associação estatística entre os sinais e sintomas nesses dois grupos, porém a seguir serão apresentadas as associações estatísticas para cada vírus pesquisados. Apesar de não possuir valor estatístico, a presença de cianose foi mais frequente na população positiva para vírus quando comparada com a população negativa, das 23 crianças que apresentaram a manifestação, 17 (73,9%) foram positivas para pelo menos um dos agentes estudados, e três delas estiveram positivas para o HBoV como único agente detectado na amostra respiratória. Ver detalhes na TABELA 2.

TABELA 1 - Características gerais da população de estudo.

Variáveis	População geral (N=545)*	População Positiva (N=359)*	População Negativa (N=186)*	HBoV (N=43)*	RSV (N=87)*	AdV (N=22)*	PIV (N=89)*	FLU (N=13)*	Coinfecções (N=105)*
Sexo									
Masculino	317	206	111	24	52	11	49	9	61
Feminino	228	153	75	19	35	11	40	4	44
Idade (média em meses)	13,3	11,5	16,8	12,1	8,9	13,3	13,1	13,8	11,2
Variação de meses	(1 - 60m)	(1 - 58m)	(1 - 60m)	(1 - 58m)	(1 - 56m)	(2 - 34m)	(1-55m)	(2 - 41m)	(1 - 55m)
Grupo de idade									
0 a 12	357	248	109	28	68	13	59	9	71
13 a 24	95	66	29	11	11	6	15	1	22
25 a 36	38	24	14	2	3	3	7	1	8
37 a 48	36	16	20	1	3	0	7	2	3
49 a 60	19	5	14	1	2	0	1	0	1
Local de atendimento hospitalar									
Emergência/Observação	279	170	109	26	39	14	49	1	41
Enfermaria	208	150	58	16	37	8	28	11	50
Reanimação	49	33	16	1	9	0	9	1	13
UTI	9	6	3	0	2	0	3	0	1
Fatores de risco da população de estudo									
Não observado	161	110	51	8	27	7	32	5	31
Casos de IRA na família	233	148	85	21	36	9	31	5	46
Fumo passivo	138	87	51	16	17	5	21	4	24
Frequência em creche ou escola	31	15	16	2	2	2	5	0	4
Imunossupressão	4	4	0	1	0	0	1	0	1
Não amamentado	96	70	26	9	19	3	15	2	22
Prematuridade	49	38	11	5	10	1	11	1	10

Comorbidades da população de estudo

Não observado	402	263	139	33	64	13	66	5	82
Cardiopatía	76	51	25	5	12	6	10	6	12
Pneumopatía	7	5	2	1	0	1	1	0	2
Neuropatía	44	31	13	2	8	4	5	1	9
Asma	15	6	9	1	2	0	3	0	0
Refluxo gastroesofágico	13	9	4	0	2	0	5	0	2

Tratamento

Antitérmico	253	171	82	20	30	12	49	5	55
Aerossol	369	250	119	37	52	12	62	6	81
Broncodilatador	11	5	6	0	2	1	1	0	1
Corticoide	221	152	69	23	36	6	39	4	44
Antibiótico	400	277	123	39	58	13	70	8	89

HBoV = Human bocavirus; RSV = Respiratory syncytial virus;; AdV = Adenovirus; PIV = Parainfluenza virus; FLU = Influenza virus;

*Números em parênteses refere-se à quantidade de indivíduos em cada grupo. O número no grupo para cada um dos vírus refere-se à quantidade de detecções únicas do agente.

TABELA 2 – Sinais e sintomas apresentados pela população de estudo.

Sinais e Sintomas	População geral (N=545)*	População Positiva (N=359)*	População Negativa (N=186)*	HBoV (N=43)*	RSV (N=87)*	ADV (N=22)*	PIV (N=89)*	FLU (N=13)*	Coinfecções (N=105)*
Tosse	437	306	131	42	63	16	86	7	92
Dispneia	421	286	135	41	59	15	76	8	87
Febre	319	211	108	30	41	12	56	5	67
Coriza	291	179	112	26	36	11	59	5	42
Obstrução nasal	255	171	84	20	38	9	41	4	59
Espirros	201	140	61	21	36	5	28	3	47
Anorexia	125	84	41	11	18	7	23	1	24
Vômitos	109	62	47	8	12	5	15	1	21
Diarreia	57	41	16	7	12	2	6	1	13
Cianose	23	17	6	3	3	0	3	1	7
Sibilância	18	15	3	2	6	0	2	1	4
Convulsões	17	11	6	0	4	0	1	0	6
Exantema	4	4	0	0	0	0	3	1	0
Conjuntivite	2	1	1	0	0	0	0	0	1
Estridor	1	1	0	0	0	0	1	0	0

HBoV = Human bocavirus; RSV = Respiratory syncytial virus;; AdV = Adenovirus; PIV = Parainfluenza virus; FLU = Influenza virus;

*Números em parênteses refere-se à quantidade de indivíduos em cada grupo. O número no grupo para cada um dos vírus refere-se à quantidade de detecções únicas do agente.

6.2 Características das crianças com pneumonias virais

Nenhum vírus foi correlacionado estatisticamente com o sexo, faixa etária ou setor de atendimento hospitalar. Quanto as manifestações clínicas, nenhum sinal ou sintoma esteve associado estatisticamente à infecção por HBoV, no entanto, sibilância esteve associado a crianças com infecção por RSV ($p < 0.03$ [95% CI: 1.22-4.72]).

Assim como as manifestações clínicas, o HBoV não esteve relacionado estatisticamente à fatores de risco e comorbidades apresentados pelas crianças com PAC. O único vírus que esteve associado estatisticamente com comorbidades foi o FLU A, que esteve associado com cardiopatia ($p < 0.003$ [95% CI: 1.58 – 16.1]), porém houve poucas detecções do agente na população estudada.

Quanto ao tratamento, os antibióticos foram usados em 90,6% (39/43) das crianças que tiveram apenas o HBoV detectado em seu ANF. Observamos que 400 (73%) crianças incluídas no estudo tinham antibióticos como uma das formas de tratamento, enquanto 227 (77,1%) crianças positivas para algum vírus pesquisado e 123 (66,1%) nas crianças que não foram detectados vírus em seu ANF fizeram terapia com antibióticos. Além disso, dos 105 casos de coinfeções, 89 (84,7%) crianças receberam antibióticos como tratamento. Aerossol (37/43; 86%) e corticoide (23/43; 53,4%) também foram tratamentos frequentes utilizados em crianças positivas para HBoV. A TABELA 1 mostra detalhes do tratamento recebido pelas crianças.

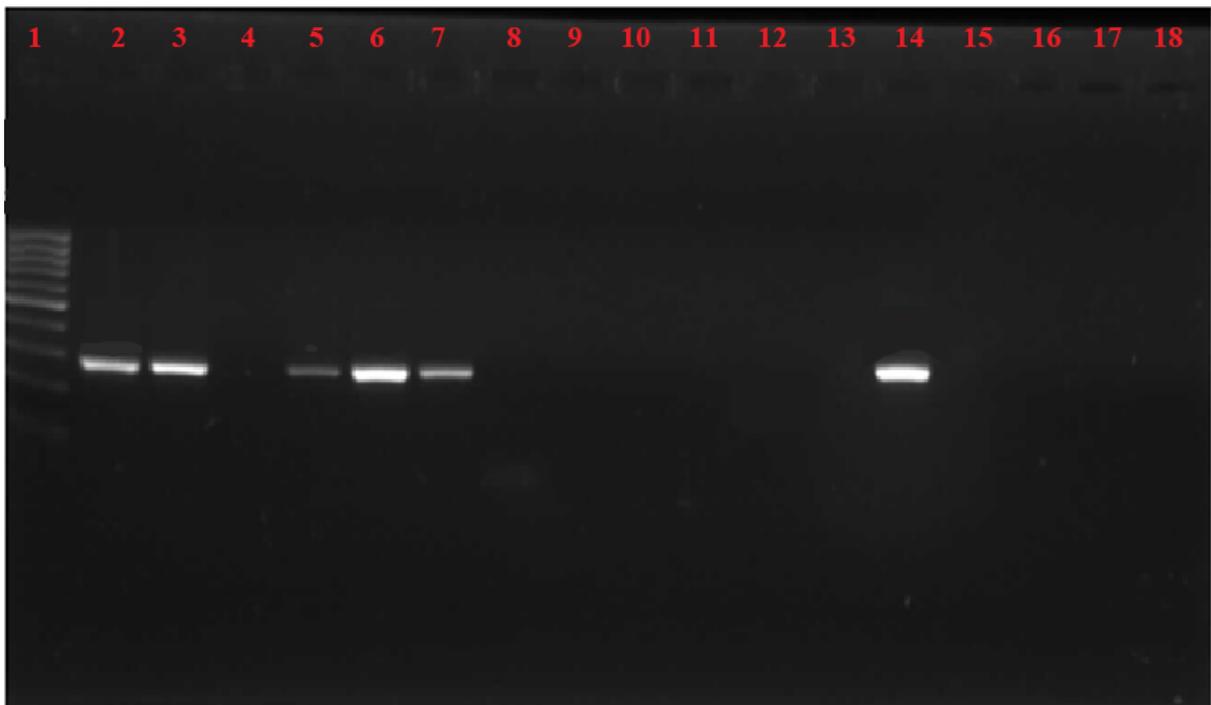
6.3 Detecção viral

Das 545 crianças estudadas, 359 (65,8%) foram positivas para pelo menos um vírus respiratório pesquisado. Dessas, 479 vírus foram detectados, havendo, portanto, 105 (19,2%) casos de coinfeções com dois (86,7%; 91/105) ou mais vírus (13,3%; 14/105). Um total de 87 amostras foram positivas para HBoV (15,9%), sendo 43 (49,5%) detecções únicas. A FIGURA 7 mostra amostra positivas para HBoV em gel de agarose. O PIV4 foi detectado em 42 (7,7%) amostras, sendo 17 (40,4%) em detecções únicas. Utilizando a técnica de IFI, um total de 294 amostras foram positivas para pelo menos um vírus. Com esta técnica foi possível detectar os seguintes vírus respiratórios: RSV ($n = 150/ 27,4\%$); PIV3 ($n = 86/ 15,7\%$); AdV ($n = 45/ 8,2\%$); PIV1 ($n = 33/ 6\%$); FLU A ($n = 30/ 5,4\%$); FLU B ($n = 3/ 0,5\%$); e PIV2 ($n = 3/ 0,5\%$). Uma imagem geral da detecção viral é mostrada no GRÁFICO 1.

Das 87 amostras positivas para HBoV, 44 (50,5%) foram coinfeções com outros agentes virais, ocorrendo 15 (34%) coinfeções com RSV, 12 (27,2%) com PIV3 e cinco (11,30%) com PIV4 como os agentes mais frequentes detectados concomitantemente com o

HBoV. O RSV foi o vírus mais frequente detectados em coinfeções, correspondendo a 63 (42%) das 150 amostras positivas. Os agentes mais detectados em coinfeções com RSV foram HBoV (n = 15, 23,8%), AdV (n = 12, 19%) e PIV4 (n = 12, 19%). Além disso, houve um caso em que RSV, FLUA, PIV 1 e HBoV foram detectados em uma única amostra. A TABELA 3 mostra a frequência dos vírus detectados em coinfeções e o GRÁFICO 2 mostra a proporção de infecção isolada e co-deteção por cada vírus.

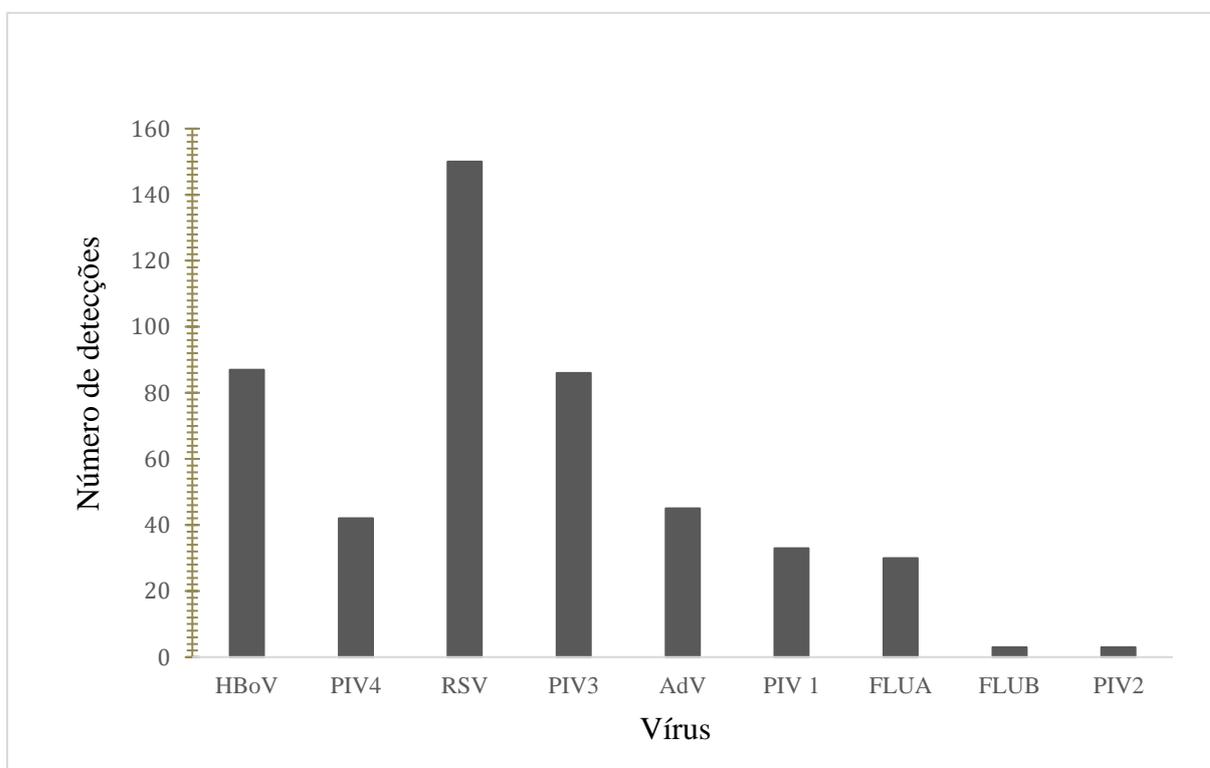
FIGURA 7 - Gel de agarose a 1.5% em TBE Buffer.



Fonte: Elaboração própria.

A imagem mostra 18 poços preenchidos. O poço 1 mostra o marcador de peso molecular de 100pb, o poço 2 o controle positivo do human bocavirus (HBoV) e os poços 3, 5, 6, 7 e 14 amostras positivas para HBoV e o poço 18 o controle negativo.

GRÁFICO 1 - Detecção dos vírus pesquisados nas amostras respiratórias da população de estudo.



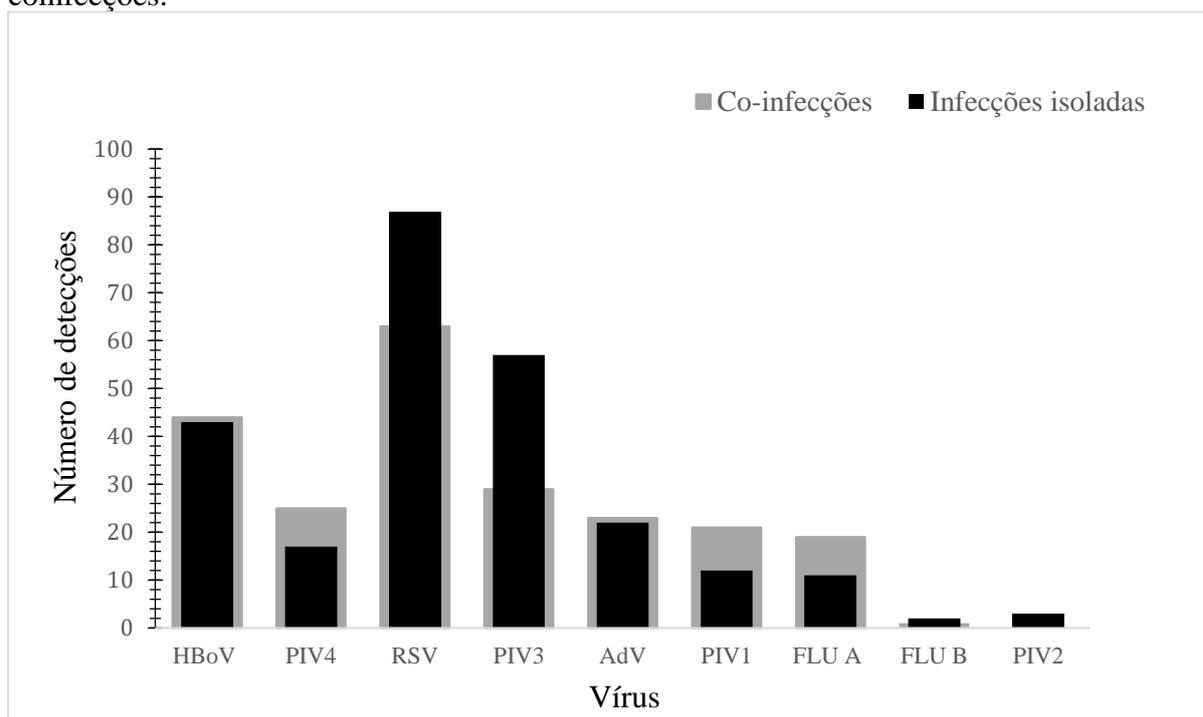
HBov = Human bocavirus; PIV4 = Parainfluenza virus 4; RSV = Respiratory syncytial virus; PIV3 = Parainfluenza virus 3; AdV = Adenovirus; PIV1 = Parainfluenza virus 1; FLUA = Influenza A; FLUB = Influenza B e PIV2 = Parainfluenza virus 2.

TABELA 3 - Espécies virais detectadas em casos de coinfeccões.

Detecções	Vírus em coinfeccões
15	RSV + HBoV
12	RSV + AdV
12	RSV + PIV 4
12	PIV 3 + HBoV
6	RSV + PIV 1
6	PIV 1 + PIV 3
5	RSV + FLU A
5	PIV 4 + HBoV
4	RSV + PIV 3
3	PIV 1 + HBoV
3	RSV + AdV + FLU A
2	PIV 1 + PIV 4
2	FLU A + PIV 3
2	RSV + FLU A + HBoV
1	RSV + FLU B
1	AdV + FLU A
1	AdV + PIV 4
1	AdV + HBoV
1	FLU A + PIV 1
1	FLU A + PIV 4
1	FLU A + HBoV
1	RSV + AdV + HBoV
1	RSV + PIV 3 + HBoV
1	AdV + FLU A + PIV 1
1	AdV + FLU A + PIV 4
1	AdV + PIV 3 + PIV 4
1	AdV + PIV 3 + HBoV
1	PIV 1 + PIV 3 + PIV 4
1	PIV 3 + PIV 4 + HBoV
1	RSV + FLU A + PIV 1 + HBoV

HBoV = Human bocavirus; PIV4 = Parainfluenza virus 4; RSV = Respiratory syncytial virus; PIV3 = Parainfluenza virus 3; AdV = Adenovirus; PIV1 = Parainfluenza virus 1; FLUA = Influenza A; FLUB = Influenza B e PIV2 = Parainfluenza virus 2.

GRÁFICO 2 - Proporção em número dos vírus detectados nos casos de infecções únicas e coinfeccões.



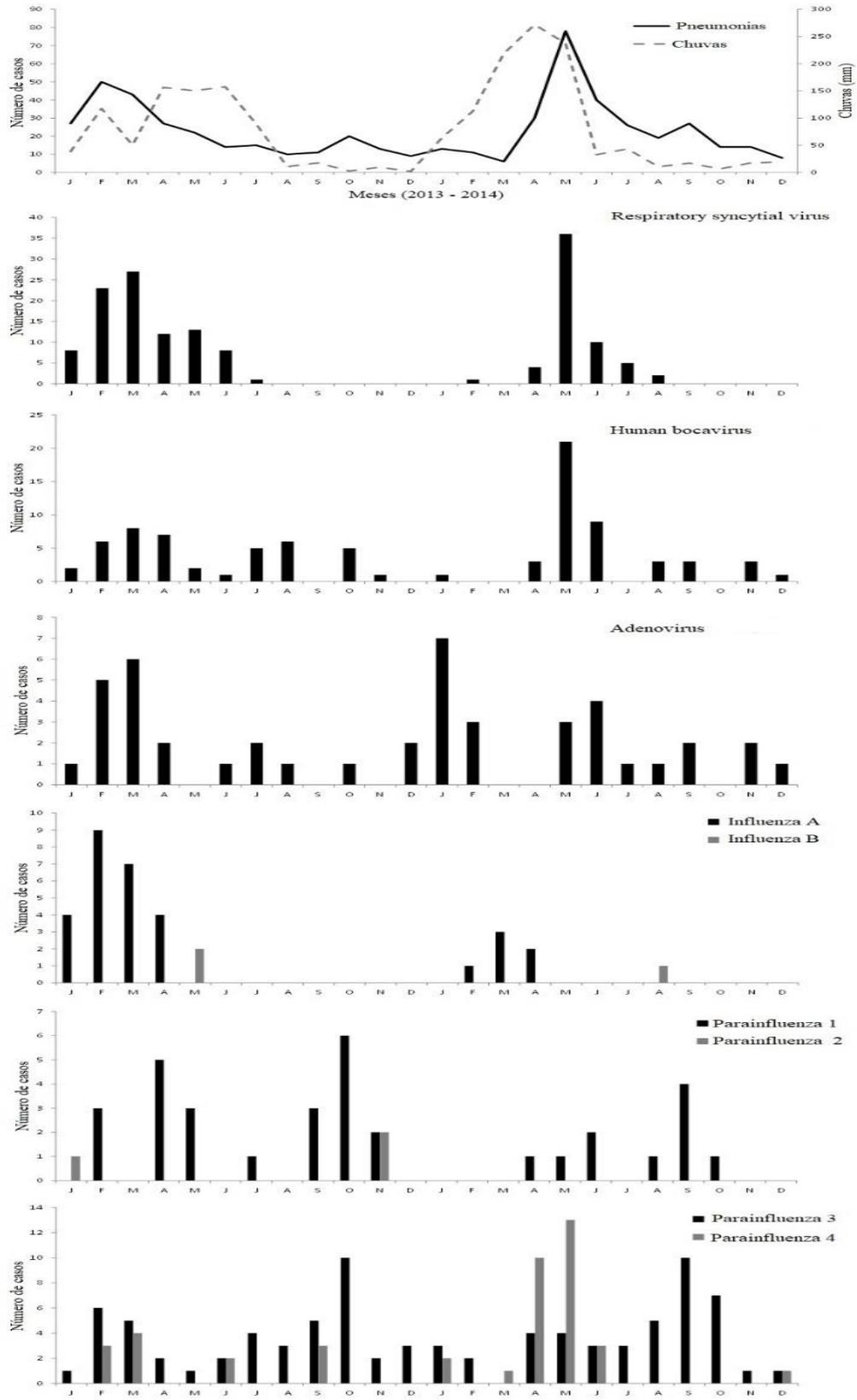
HBoV = Human bocavirus; PIV4 = Parainfluenza virus 4; RSV = Respiratory syncytial virus; PIV3 = Parainfluenza virus 3; AdV = Adenovirus; PIV1 = Parainfluenza virus 1; FLUA = Influenza A; FLUB = Influenza B e PIV2 = Parainfluenza virus 2.

6.4 Circulação mensal dos vírus pesquisados

Entre os meses de fevereiro e março de 2013 observou-se um pico dos casos de pneumonias, associado com o aumento do índice pluviométrico, com 93 ocorrências (35,6%). Em 2014, o maior pico da doença foi observado de abril a junho, com 148 (52,1%) casos. O pico, neste ano, foi observado no final do período chuvoso da cidade, que teve início em janeiro.

O HBoV foi detectado em todos os meses do ano, sendo mais detectado em maio de 2014, onde ocorreram 21 detecções, totalizando 24,1% das ocorrências do agente durante os 24 meses de estudo. O RSV circulou apenas no primeiro semestre do ano, atingindo o pico de circulação em fevereiro e maio de 2013 e maio a junho de 2014, sendo detectado juntamente com o aumento das chuvas. O FLUA, assim como o RSV, também foi detectado apenas durante o primeiro semestre do ano, mas com menos frequência. O AdV também circulou ao longo do ano, com perfil semelhante ao HBoV. O VP4, apesar de ser detectado em setembro e dezembro, obteve maior detecção no primeiro semestre. Já o PIV3 circulou ao longo do ano, mas com maior detecção na segunda metade do ano. O GRÁFICO 3 mostra a distribuição da circulação mensal dos vírus pesquisados durante os 24 meses do estudo, bem como o índice pluviométrico da cidade.

GRÁFICO 3 - Distribuição mensal dos casos de PAC durante o período de estudo e a circulação dos vírus pesquisados.



DISCUSSÃO

O presente estudo destaca a ocorrência de infecção pelo HBoV em crianças menores de cinco anos com PAC em uma região tropical semiárida. A prevalência dos vírus (65.8%) nos casos de pneumonias infantis observadas neste estudo é uma das maiores presente na literatura. Aspectos como a população, região, período de estudo e técnica empregada para detecção de microrganismos, podem influenciar em altas taxas de detecções virais. Além disso, a queda das taxas de pneumonias por *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* após a vacina pneumocócica e contra *Haemophilus influenzae* tipo B resultou em grande redução de pneumonias bacterianas, prevalecendo então, os vírus (BERG *et al.*, 2016).

As pneumonias são responsáveis por altas taxas de hospitalizações no mundo, essa proporção varia de 5,9% a 16,8%, resultando em aproximadamente 15 milhões de hospitalizações por ano (SGAMBATTI *et al.*, 2015). Na América Latina as pneumonias de etiologia bacteriana possuem prevalência de 20 a 40% em crianças menores de cinco anos, sendo o *Streptococcus pneumoniae* o agente bacteriano mais frequente (ANDRADE *et al.*, 2012). Antes da vacina pneumocócica no calendário vacinal de Quebec, as pneumonias por *Streptococcus pneumoniae* representavam 32% das hospitalizações. Após a introdução da vacina em 2004, houve redução de 13% dos casos de pneumonias bacterianas e as pneumonias não especificadas prevaleceram (DE WALS., 2008). A redução dos casos de pneumonia por *Streptococcus pneumoniae* é observada no mundo, incluindo no Brasil onde após a introdução da vacina pneumocócica conjugada 10-valente em 2010 houve 10% de redução na mortalidade infantil (SCHUCK-PAIM *et al.*, 2019). Além disso, as taxas de internação diminuíram mais de 23% nas crianças menores de um ano (VIEIRA, KUPEK., 2018).

Além da vacina pneumocócica, a vacina conjugada contra o *Haemophilus influenzae* tipo B também teve papel importante na redução das taxas de morbi-mortalidade das pneumonias. Em um estudo realizado na Gambia, a vacina foi responsável pela queda de 20% dos casos de pneumonias graves em crianças. No Reino Unido, a incidência da doença causada por o *Haemophilus influenzae* em crianças menores de cinco anos caiu de 35,5/100.000 em 1990 para 0,06/100.000 em 2012 (SLACK, 2015). No Brasil, a redução de 31% dos casos de pneumonias foi observada após a introdução da vacina no calendário vacinal (DE ANDRADE *et al.*, 2004).

Além das vacinas com seu papel importante na redução da prevalência das pneumonias bacterianas, outro aspecto deve ser mencionado para entender melhor a alta prevalência dos vírus nas pneumonias atualmente: a pesquisa do agente. As técnicas moleculares disponíveis

atualmente permitiram que vírus, antes difíceis de cultivar em células, fossem detectados com alta sensibilidade em amostras respiratórias (LIN *et al.*, 2020; RELLER *et al.*, 2003). Classicamente as pneumonias virais eram diagnosticadas laboratorialmente por isolamento viral, e a aplicação da PCR para detecção desses agentes pode aumentar a taxa de detecção em até 42% quando comparada com o isolamento viral (VAN KRAAIJ *et al.*, 2005; FREYMUTH *et al.*, 2006). Pelo uso de técnicas moleculares novas espécies de vírus causadores de infecções respiratórias puderam ser descobertas (ALLANDER *et al.*, 2005).

Comparando a taxa de detecção do HBoV observada neste estudo com outras publicações no Brasil, a prevalência do HBoV está dentro da taxa de detecção no país, o agente foi detectado em 15,9% na população de estudo. A prevalência do HBoV em quadros respiratórios utilizando a técnica de PCR no país varia de 2,4% a 23%, sendo quatro estudos conduzidos na região Sudeste (SILVA *et al.*, 2018; CACCIA *et al.*, 2012; PILGER *et al.*, 2010; DURIGON *et al.*, 2010), um no Norte (SILVA *et al.*, 2010), um no Centro-Oeste (CASTRO *et al.*, 2020) e três no Nordeste (NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2018; NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2010;). Um dos estudos conduzidos na região Nordeste, em Salvador, detectou o HBoV em apenas 6% (4/66) das crianças incluídas no estudo. A baixa detecção do agente pode ter ocorrido por influência da baixa quantidade de crianças incluídas, apenas 66, pelo tempo de 12 meses de estudo, e o critério de inclusão de pacientes: crianças menores de sete meses. Uma criança com HBoV havia radiologia compatível com pneumonia (SOUZA *et al.*, 2010). Os outros dois estudos no Nordeste, também realizados em Salvador, o HBoV teve alta prevalência nas crianças com PAC, 20,9% (NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2018) e 23% (NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2012)

O HBoV foi o segundo vírus mais detectado, atrás apenas do RSV que frequentemente é o agente mais prevalente nas infecções respiratórias em crianças no mundo (WANG *et al.*, 2016; DE CONTO *et al.*, 2019; WONG-CHEW *et al.*, 2017; KURSKAYA *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2015), no Brasil (GURGEL *et al.*, 2016; DE MELLO FREITAS *et al.*, 2013; GARDINASSI *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2011) e na cidade de Fortaleza (MOURA *et al.*, 2013; ALONSO *et al.*, 2012; RABONI *et al.*, 2018).

As crianças do sexo masculino foram ligeiramente mais afetadas por PAC do que o sexo feminino. Comumente a prevalência das infecções respiratórias virais é mais observada em crianças do sexo masculino do que feminino que é frequentemente visto na razão de 1,2 :1 a 1,5 :1. Isto pode ser explicado por alguns fatores: (1) diferenças anatômicas entre os sexos de forma que o sexo masculino possui vias aéreas mais estreitas e o pulmão é imaturo no primeiro

ano; (2) o impacto dos hormônios na resposta imunológica Th1 e Th2. Apesar de não esclarecidos, estes fatores foram propostos para explicar a maior susceptibilidade às infecções respiratórias baixas no sexo masculino (IBAMA *et al.*, 2017; MUENCHHOFF, GOULDER., 2014; FALAGAS, MOURTZOUKOU, VARDAKAS., 2007).

Quanto a idade, as crianças mais jovens foram mais frequentemente acometidas por PAC viral neste estudo, 83,3% possuíam de 0 a 24 meses, sendo compatível com outros estudos que mostram que a incidência e hospitalização das pneumonias diminuem com a idade, sendo mais alta entre crianças menores de um ano e mais baixa nas crianças com cinco anos (ZHAO *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2017; MISHRA *et al.*, 2016; ALONSO *et al.*, 2012). Ao comparar a população positiva e a população negativa para vírus, a primeira eram compostas de crianças ligeiramente mais jovens que a população negativa. A média de idade do HBoV (12.1 meses) foi semelhante ao grupo positivo para vírus. O HBoV infecta crianças mais jovens com maior prevalência (SILVA *et al.*, 2018; DELUCA *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2016; AHN *et al.*, 2014; LONGTIN *et al.*, 2008).

A maioria dos casos de pneumonias descritos no presente estudo foram não complicadas uma vez que a maioria das crianças tiveram suas amostras respiratórias coletadas nas emergências e enfermarias, e apenas 10,7% das crianças atendidas em UTIs ou reanimação. Nenhuma criança com HBoV foi admitida na UTI, entretanto mais de um terço (37,2%) das crianças com HBoV (detecção única) necessitaram de hospitalização em enfermarias e uma foi atendida no setor reanimação. Infecções respiratórias por HBoV são mais comuns em crianças e geralmente são não complicadas, entretanto há casos de infecções que requerem cuidados intensivos (WANG *et al.*, 2016; TRAN *et al.*, 2014). Em um estudo de coorte no Reino Unido, conduzido por BAGASI e colaboradores, 31% das crianças com HBoV, detectados isoladamente em seu ANF necessitaram de cuidados intensivos, incluindo ventilação mecânica (BAGASI *et al.*, 2020). Além disso, pacientes com infecções únicas por HBoV apresentam maior carga viral do que em coinfeccões e isto parece estar relacionado com maior gravidade da infecção respiratória (JIANG *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2013). Um estudo conduzido por REMOLINA e colaboradores, na Colômbia, detectou o HBoV em alta prevalência (28,6%), e cinco pacientes adultos positivos para o agente morreram por complicações respiratórias (REMOLINA *et al.*, 2015).

É comum as infecções respiratórias cursar com diversos sinais e sintomas. Não observamos associação estatística com alguma das manifestações clínicas apresentadas pelas crianças estudadas com infecção por HBoV, sendo tão semelhantes às manifestações apresentadas por crianças infectadas por outros vírus, ou que não tinham nenhum dos vírus

pesquisados detectado em seu ANF. No entanto, estudos mostram que o HBoV parece estar associado ao surgimento de sibilância, durante ou após o episódio de infecção respiratória pelo agente (VERBEKE *et al.*, 2019). Em um estudo realizado com crianças admitidas em um hospital na Polônia, o HBoV foi o terceiro vírus mais frequente em casos de bronquiolites e bronquite sibilante e esteve associado com aumento do esforço respiratório (taquipneia) nas crianças (SOBKOWIAK *et al.*, 2020). DEL ROSAL e colaboradores realizaram um estudo avaliando crianças que nos primeiros dois anos de vida se internaram devido a bronquiolite por HBoV ou RSV. Todos os pacientes com bronquiolite por HBoV desenvolveram sibilância recorrente e metade deles desenvolveram asma aos 5 a 7 anos. Aproximadamente 30% se internaram devido a obstrução brônquica. Além disso o desenvolvimento de asma foi mais significativo nas crianças que tiveram bronquiolite prévia por HBoV do que RSV (DEL ROSAL *et al.*, 2016).

Todos os vírus que causam infecções do trato respiratório superior, mesmo aqueles que são comumente responsáveis por resfriado comum, como o rinovírus, podem causar pneumonias e outras infecções do trato respiratório inferior, e o resultado dessa infecção acompanha sintomas comuns entre os vírus, sem associação com a espécie do agente. Além disso, não é possível diagnosticar a etiologia, seja viral ou bacteriana, da pneumonia apenas pelos sinais e sintomas manifestados pelos pacientes. No entanto, BHUIYAN e colaboradores sugerem que crianças com pneumonia viral são mais propensas a ter febre baixa, rinorreia, taquipneia e sibilância do que crianças com pneumonia bacteriana (BHUIYAN *et al.*, 2019). A pneumonia viral costuma estar associada a condições leves, enquanto a pneumonia bacteriana a condições mais graves (TRAMPER-STRANDERS, 2018).

A frequência de fatores de risco para infecções respiratórias foi alta na população de estudo. Não houve diferença estatística de nenhum fator de risco específico, HBoV e outros vírus pesquisados. No entanto, apenas 18,6% (8/43) das crianças com HBoV não possuíam qualquer fator de risco. Dentre os fatores de risco de infecções respiratórias mais observados na literatura: não amamentação, mais de sete pessoas na família, prematuridade e infecção por HIV se destacam (ALEXANDRINO *et al.*, 2016; GEBERETSADIK *et al.*, 2015; JACKSON *et al.*, 2013).

No presente estudo, observamos que a maioria das crianças positivas para pelo menos um agente viral foram tratadas com antibióticos. Mais de 90% das crianças com HBoV detectado em seu ANF fizeram o uso de antibióticos como um dos tratamentos. Um estudo realizado em um hospital nos EUA, avaliando os dados de mais de 55 mil crianças atendidas nas emergências com infecções respiratórias agudas entre os anos de 2000 a 2012, mostrou que

aproximadamente 50% das crianças com infecção respiratória viral tiveram antibióticos como uma das formas de tratamento (EBELL, RADKE., 2015). Mesmo em crianças hospitalizadas, o uso de antibióticos em pneumonias virais é comum, como descreve VAGEDES e colaboradores, que 25% das crianças com pneumonias receberam o tratamento com antibióticos (VAGEDES *et al.*, 2020).

O uso de antibióticos empíricos é comum nos casos de PAC em todo o mundo, principalmente pela dificuldade de obtenção de resultados microbiológicos dificultando o uso de medicamentos específicos. Devido a isso as Diretrizes Brasileiras de Pneumologia e Tisiologia e as diretrizes de saúde da América do Norte, América Latina, Europa e Inglaterra recomendam o uso racional de antibióticos de espectro relativamente estreito como tratamento empírico (CORRÊA *et al.*, 2018; BOYD, 2017). Embora orientado, o uso de antibióticos não direcionado a alvos específicos favorece a resistência antimicrobiana, devendo os hospitais melhorar a identificação dos agentes, a fim de reduzir o uso indiscriminado e excessivo de antibióticos em crianças com PAC (PEYRANI *et al.*, 2019; WUNDERINK, YIN, 2016).

Observamos que mais de 50% dos casos de HBoV detectados na população de estudo foram em coinfeção com outros vírus pesquisados. Esta taxa de coinfeção é semelhante ao que é encontrada na literatura. A prevalência dos casos de coinfeções do HBoV com outros agentes respiratórios varia de 10,7% a 75% (CHOI *et al.*, 2018; CALVO *et al.*, 2016; DELUCA *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2016; TABASI *et al.*, 2016; MOESKER *et al.*, 2015; TRAN *et al.*, 2014; AHN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2013; ESPOSITO *et al.*, 2013). Além de coinfeções, o HBoV é detectado em indivíduos assintomáticos (CASTRO *et al.*, 2020; MARTIN *et al.*, 2009). O vírus mais frequente nos casos de coinfeções foi o RSV. É questionável a importância das coinfeções nas doenças virais do trato respiratório, seja alta ou baixa. Um estudo conduzido com pacientes menores de 18 anos com IRA, observou que os casos de coinfeções com HBoV e RSV apresentaram maior número de pneumonias e hospitalizações quando comparado com infecções únicas pelos dois vírus (SUN *et al.*, 2019). Uma meta-análise comparando a gravidade entre infecção única por RSV e coinfeção outros vírus em crianças menores de cinco anos não observaram associação entre coinfeções e gravidade (LI *et al.*, 2020). Além disso, estudos tem mostrado que infecções únicas por HBoV apresenta maior carga viral do que em coinfeções e isto está associado a gravidade da doença respiratória (JIANG *et al.*, 2016)

Um dos fatos que pode explicar as altas taxas de coinfeções e a detecção casual é o fato de que o HBoV pode continuar infectando tonsilas palatinas e adenoides, permanecendo detectávelmesmo após a doença (XU *et al.*, 2021). Em um estudo realizado em pacientes com doenças adeno-tonsilares crônicas, o HBoV foi detectado em 31,1% das amostras, sugerindo

que esses tecidos linfoides são importantes sítios para a replicação desse agente, podendo servir como reservatório e, portanto, permanecer detectável por métodos moleculares mesmo semanas após o desaparecimento dos sintomas da doença (PROENCA-MODENA *et al.*, 2014). Um estudo realizado na Bélgica, onde crianças com infecções respiratórias por HBoV foram acompanhadas, e amostras coletadas em momentos diferentes, mostrou que o HBoV pode ser detectado 97 dias após a primeira detecção, como aconteceu com uma criança (VERBEKE *et al.*, 2019).

Outro DNA vírus que também causa infecções respiratórias e possui características semelhantes ao HBoV, o AdV também é frequentemente detectado em coinfeções (SONG *et al.*, 2016) e podem persistir nas adenoides e tonsilas palatinas (ALKHALAF, GUIVER, COOPER., 2013). PROENCA-MODENA e colegas detectaram o AdV em 52,8% (95/180) das amostras de fragmentos de tecido, AFN e sangue de crianças com doenças adeno-tonsilares crônicas (PROENCA-MODENA *et al.*, 2019).

O HBoV circulou durante todo o ano, sem associação com o período chuvoso ou seco, embora a maioria dos casos (68,9%) tenha ocorrido no período chuvoso da região. O mesmo perfil de circulação foi observado com o AdV, que também circulou esporadicamente ao longo do ano, porém em menor frequência. Observamos associação entre o período chuvoso e a circulação do RSV, sendo detectado até agosto. O FLUA também circulou apenas durante o primeiro semestre do ano. Estes dois agentes, RSV e FLUA, são associados a maior circulação durante o período chuvoso e apresentam sazonalidade bem definida na região (MOURA *et al.*, 2013; RABONI *et al.*, 2018; SIQUEIRA, MOURA, 2009). O PIV 3 e PIV 1, foram mais prevalentes durante o período seco. Estes achados são compatíveis com o que já foi observado em estudos realizados na região (FÉ, MONTEIRO, MOURA, 2008). Já o VIP 4 apresentou maior circulação durante o primeiro semestre do ano, diferente dos demais parainfluenza vírus.

Comparando a circulação do HBoV com o observado em outros estudos, mesmo em países de clima temperado, a circulação do HBoV é diversa, podendo ser mais frequentemente detectado no inverno (PETRARCA *et al.*, 2020; GHIETTO *et al.*, 2015), primavera (CHOI *et al.*, 2018) e verão (ZHOU *et al.*, 2018). Em um estudo realizado em uma região de clima temperado no Sudeste do Brasil, o agente foi mais prevalente durante o outono e primavera (SILVA *et al.*, 2018). No Nordeste, assim como neste estudo, o HBoV circulou durante todo o ano (NASCIMENTO- CARVALHO *et al.*, 2018).

Alguns vírus, como mencionado acima, possuem relação com o período frio da região em que está circulando, sendo sua circulação diretamente proporcional com o aumento do índice pluviométrico. O RSV e FLU A possui maior atividade em baixas temperatura porque

são mais estáveis nas secreções respiratórias que são transmitidos. Além disso, baixas temperaturas levam os indivíduos a ambientes fechados, facilitando a transmissão desses agentes (MORIYAMA, HUGENTOBLE, IWASAKI., 2020; VALDINI *et al.*, 2013)

O presente estudo mostra evidências moleculares de infecção respiratória por HBoV em crianças com PAC menores de cinco anos em uma área tropical semiárida do Brasil. Apesar de sua relevância, este estudo apresenta algumas limitações: o número reduzido de crianças investigadas não nos permitiu definir as variáveis clínicas, epidemiológicas e demográficas que podem estar estatisticamente relacionadas à infecção pelo HBoV. Além disso, embora a técnica de IFI e os ensaios de PCR tenham sido amplamente realizados para a detecção de vírus respiratórios, kits de qPCR multiplex mais eficientes estão disponíveis atualmente. Embora os ensaios de imunofluorescência direta estejam disponíveis comercialmente para detectar PIV4, sua sensibilidade é baixa e, portanto, optamos por usar PCR para detectar esse agente (OCADAQUE, CAMPELO, MOURA., 2018). Uma das abordagens para determinar o HBoV como um agente etiológico de pneumonia tem sido o uso da sorologia que auxilia no diagnóstico de doença aguda pelo agente. A persistência do agente no trato respiratório limita a utilização do diagnóstico molecular, que pode apresentar alta sensibilidade, mas especificidade questionável. A sorologia, por outro lado, apresenta menor sensibilidade, em um estudo conduzido por NASCIMENTO-CARVALHO e colaboradores, 159 casos de HBoV em PAC foram detectados por PCR, e destes 159 apenas 38 (23,9%) tiveram evidência de doença aguda pelo agente por sorologia (NASCIMENTO-CARVALHO *et al.*, 2018). Estudos tem mostrado que a sorologia quando combinada com a PCR pode fornecer precisão no diagnóstico de HBoV como agente causador de pneumonia (XU *et al.*, 2017).

O presente estudo descreve a ocorrência de HBoV entre crianças com pneumonias em uma cidade do Nordeste do Brasil. Além disso, os antibióticos são frequentemente utilizados na terapia mesmo de pneumonias de etiologia viral. Este estudo reforça a necessidade da detecção dos agentes nas pneumonias e o uso racional de antibióticos.

CONCLUSÕES

- O HBoV é um agente frequente de pneumonias em crianças menores de cinco anos na cidade de Fortaleza.
- Mais de um terço das crianças com pneumonias com HBoV detectado em seu trato respiratório necessitaram de hospitalização em enfermarias.
- Não há manifestações clínicas associadas às pneumonias causadas por HBoV que possa auxiliar na suspeita do agente.
- Os casos de coinfeccões não apresentam relação com as crianças internadas em UTIs.
- Antibioticoterapia empírica é utilizada amplamente nos casos de pneumonias virais.
- O HBoV circula durante todos os meses do ano na cidade de Fortaleza.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, A S. *et al.* Risk factors for respiratory infections among children attending day care centres. *Family Practice*, v. 33, n. 2, p. 161-166, 2016.

AKTURK, H *et al.* Atypical presentation of human bocavirus: severe respiratory tract infection complicated with encephalopathy. *Journal of Medical Virology*, v. 87, n. 11, p. 1831-1838, 2015.

ALAM, M M *et al.* Human bocavirus in Pakistani children with gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*, v. 87, n. 4, p. 656-663, 2015.

AHN, J G. *et al.* Human bocavirus isolated from children with acute respiratory tract infections in Korea, 2010–2011. *Journal of Medical Virology*, v. 86, n. 12, p. 2011-2018, 2014.

ALKHALAF, M A; GUIVER, M; COOPER, R J. Prevalence and quantitation of adenovirus DNA from human tonsil and adenoid tissues. *Journal of Medical Virology*, v. 85, n. 11, p. 1947-1954, 2013.

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. e9, 2012.

ANDRADE, A L. *et al.* Bacteriology of community-acquired invasive disease found in a multicountry prospective, population-based, epidemiological surveillance for *Pneumococcus* in children in Latin America. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 31, n. 12, p. 1312-1314, 2012.

ALBUQUERQUE, M C M.; 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. 54, n. 5, p. 249-255, 2012.

ALLANDER, T. *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 36, p. 12891-12896, 2005.

AGUILAR, J C. *et al.* Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 1191-1195, 2000.

BAGASI, A A. *et al.* Human Bocavirus infection and respiratory tract disease identified in a UK patient cohort. *Journal of Clinical Virology*, v. 129, p. 104453, 2020.

BHUIYAN, M U. *et al.* Combination of clinical symptoms and blood biomarkers can improve discrimination between bacterial or viral community-acquired pneumonia in children. *BMC Pulmonary Medicine*, v. 19, n. 1, p. 71, 2019.

BOYD, K. Back to the basics: community-acquired pneumonia in children. *Pediatric Annals*, v. 46, n. 7, p. e257-e261, 2017.

BERG, A S. *et al.* Etiology of pneumonia in a pediatric population with high pneumococcal vaccine coverage. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 35, n. 3, p. e69-e75, 2016.

BYINGTON, C L. *et al.* Community surveillance of respiratory viruses among families in the Utah Better Identification of Germs-Longitudinal Viral Epidemiology (BIG-LoVE) study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, n. 8, p. 1217-1224, 2015.

BEZERRA, P G M. *et al.* Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PloS One*, v. 6, n. 4, p. e18928, 2011.

CASTRO, I A. *et al.* Circulation profile of respiratory viruses in symptomatic and asymptomatic children from Midwest Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 1729-1735, 2020.

CHRISTENSEN, A. *et al.* Human bocaviruses and paediatric infections. *The Lancet Child & Adolescent Health*, v. 3, n. 6, p. 418-426, 2019.

COTMORE, S. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Parvoviridae*, *Journal of General Virology*, 100: 367-368, 2019.

CORRÊA, R A. *et al.* 2018 recommendations for the management of community acquired pneumonia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 44, n. 5, p. 405-423, 2018.

CHOI, E. *et al.* Clinical and laboratory profiles of hospitalized children with acute respiratory virus infection. *Korean Journal of Pediatrics*, v. 61, n. 6, p. 180, 2018.

CAMPOS, G S. *et al.* Human bocavirus in acute gastroenteritis in children in Brazil. *Journal of Medical Virology*, v. 88, n. 1, p. 166-170, 2016.

CALVO, C. *et al.* Infections and coinfections by respiratory human bocavirus during eight seasons in hospitalized children. *Journal of Medical Virology*, v. 88, n. 12, p. 2052-2058, 2016.

CANTAIS, A. *et al.* Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. *Journal of Clinical Virology*, v. 60, n. 4, p. 402-407, 2014.

CACCIA, E R B. *et al.* Frequency of human bocavirus respiratory infections among at-risk patients in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54, n. 6, p. 307-310, 2012.

CHUNG, J-Y. *et al.* Th1 and Th2 cytokine levels in nasopharyngeal aspirates from children with human bocavirus bronchiolitis. *Journal of Clinical Virology*, v. 43, n. 2, p. 223-225, 2008.

COSSART, Y E. *et al.* Parvovirus-like particles in human sera. *The Lancet*, v. 305, n. 7898, p. 72-73, 1975.

DE CONTO, F. *et al.* Epidemiology of human respiratory viruses in children with acute respiratory tract infection in a 3-year hospital-based survey in Northern Italy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 94, n. 3, p. 260-267, 2019.

DE, R. *et al.* Risk of acute gastroenteritis associated with human bocavirus infection in children: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, v. 12, n. 9, p. e0184833, 2017.

DELUCA, G D. *et al.* Bocavirus in infants under 5 years with acute respiratory infection. Chaco Province, Argentina, 2014. *Medicina*, v. 76, n. 3, p. 135-138, 2016.

DENG, X. *et al.* Replication of an autonomous human parvovirus in non-dividing human airway epithelium is facilitated through the DNA damage and repair pathways. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 1, p. e1005399, 2016.

DO AMARAL DE LEON, C *et al.* Clinical and epidemiologic profile of lower respiratory tract infections associated with human bocavirus. *Pediatric Pulmonology*, v. 48, n. 11, p. 1112-1118, 2013.

DENG, X.; YAN, Z.; LUO, Y. *et al.* In vitro modeling of human bocavirus 1 infection of polarized primary human airway epithelia. *J. Virol.* 87, 4097–4102, 2013

DE MELLO FREITAS, F T. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000–2010. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 62-68, 2013.

DURIGON, G S. *et al.* Hospital-acquired human bocavirus in infants. *Journal of Hospital Infection*, v. 76, n. 2, p. 171-173, 2010.

DE WALSH, P. *et al.* Pneumonia after implementation of the pneumococcal conjugate vaccine program in the province of Quebec, Canada. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 27, n. 11, p. 963-968, 2008.

DE ANDRADE, A L S S. *et al.* Effectiveness of Haemophilus influenzae b conjugate vaccine on childhood pneumonia: a case-control study in Brazil. *International Journal of Epidemiology*, v. 33, n. 1, p. 173-181, 2004.

ESKOLA, V; XU, M; SÖDERLUND-VENERMO, M. Severe lower respiratory tract infection caused by human bocavirus 1 in an infant. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 36, n. 11, p. 1107-1108, 2017.

EBELL, M H.; RADKE, T. Antibiotic use for viral acute respiratory tract infections remains common. *Am J Manag Care*, v. 21, n. 10, p. e567-e575, 2015.

ESPOSITO, S. *et al.* Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 7, n. 1, p. 18-26, 2013.

FALAGAS, M E.; MOURTZOUKOU, E G.; VARDAKAS, K Z. Sex differences in the incidence and severity of respiratory tract infections. *Respiratory Medicine*, v. 101, n. 9, p. 1845-1863, 2007.

FREYMUTH, F. *et al.* Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *Journal of Medical Virology*, v. 78, n. 11, p. 1498-1504, 2006.

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

GADSBY, N J. *et al.* Comprehensive molecular testing for respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 62, n. 7, p. 817-823, 2016.

GANAIÉ, S S.; QIU, J. Recent advances in replication and infection of human parvovirus B19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, 2018.

GHIETTO, L M. *et al.* Comorbidity and high viral load linked to clinical presentation of respiratory human bocavirus infection. *Archives of virology*, v. 160, n. 1, p. 117-127, 2015.

GHIETTO, L M. *et al.* Human bocavirus 1 infection of CACO-2 cell line cultures. *Virology*, v. 510, p. 273-280, 2017.

GOMES, M. Pneumonia adquirida na comunidade: os desafios da realidade brasileira. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 44, n. 4, p. 254-256, 2018.

GADSBY, N J. *et al.* Comprehensive molecular testing for respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 62, n. 7, p. 817-823, 2016.

GUIDO, M. *et al.* Human bocavirus: current knowledge and future challenges. *World Journal of Gastroenterology*, v. 22, n. 39, p. 8684, 2016.

GURGEL, R Q. *et al.* Relative frequency, possible risk factors, viral codetection rates, and seasonality of respiratory syncytial virus among children with lower respiratory tract infection in Northeastern Brazil. *Medicine*, v. 95, n. 15, 2016.

GEBERETSADIK, A.; WORKU, A.; BERHANE, Y. Factors associated with acute respiratory infection in children under the age of 5 years: evidence from the 2011 Ethiopia demographic and health survey. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics*, v. 6, p. 9, 2015.

GHIETTO, L M. *et al.* Comorbidity and high viral load linked to clinical presentation of respiratory human bocavirus infection. *Archives of Virology*, v. 160, n. 1, p. 117-127, 2015.

IBAMA, A. S. *et al.* The Relationship of Gender in the Pattern and Risk of Acute Respiratory Infection among Infants in Rivers State, Nigeria. *J Community Med Health Educ*, v. 7, n. 569, p. 2161-0711.1000569, 2017.

GUIDO, M. *et al.* Seroepidemiology of human bocavirus in Apulia, Italy. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 4, p. E74-E76, 2012.

GARDINASSI, L G. *et al.* Seasonality of viral respiratory infections in southeast of Brazil: the influence of temperature and air humidity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 98-108, 2012.

GURDA, B L. *et al.* Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the *parvoviridae*. *Journal of Virology*, v. 84, n. 12, p. 5880-5889, 2010.

GARCÍA-GARCÍA, M L. *et al.* Human bocavirus detection in nasopharyngeal aspirates of children without clinical symptoms of respiratory infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 27, n. 4, p. 358-360, 2008.

HEMATIAN, A *et al.* Traditional and modern cell culture in virus diagnosis. *Osong Public Health and Research Perspectives*, v. 7, n. 2, p. 77-82, 2016.

HONG, H-L. *et al.* Viral infection is not uncommon in adult patients with severe hospital-acquired pneumonia. *PloS One*, v. 9, n. 4, p. e95865, 2014.

HUSTEDT, J W. *et al.* Seroepidemiology of human bocavirus infection in Jamaica. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e38206, 2012.

HUANG, Q. *et al.* Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia. *PLoS Pathog*, v. 8, n. 8, p. e1002899, 2012.

JAIN, S. *et al.* Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among US adults. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 5, p. 415-427, 2015.

JIANG, W. *et al.* Clinical significance of different virus load of human bocavirus in patients with lower respiratory tract infection. *Scientific Reports*, v. 6, p. 20246, 2016.

JACKSON, S. *et al.* Risk factors for severe acute lower respiratory infections in children—a systematic review and meta-analysis. *Croatian Medical Journal*, v. 54, n. 2, p. 110-121, 2013.

KUMTHIP, K. *et al.* Predominance of human bocavirus genotypes 1 and 2 in oysters in Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*, p. AEM. 00456-21, 2021.

KURSKAYA, O. *et al.* Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized children in Novosibirsk City, Russia (2013–2017). *PloS One*, v. 13, n. 9, p. e0200117, 2018.

KENMOE, S *et al.* Viral etiology of severe acute respiratory infections in hospitalized children in Cameroon, 2011–2013. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 10, n. 5, p. 386-393, 2016.

KIM, M-A. *et al.* Pneumonia severity index in viral community acquired pneumonia in adults. *PloS One*, v. 14, n. 3, p. e0210102, 2019.

KOO, B-S *et al.* Genetic characterization of three novel chicken parvovirus strains based on analysis of their coding sequences. *Avian Pathology*, v. 44, n. 1, p. 28-34, 2015.

KARALAR, L. *et al.* Prevalence and clinical aspects of human bocavirus infection in children. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, n. 6, p. 633-639, 2010.

LIN, C-Y. *et al.* Increased detection of viruses in children with respiratory tract infection using PCR. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 2, p. 564, 2020.

LI, Y. *et al.* The role of viral co-infections in the severity of acute respiratory infections among children infected with respiratory syncytial virus (RSV): A systematic review and meta-

analysis. *Journal of Global Health*, v. 10, n. 1, 2020.

LJUBIN-STERNAK, S. *et al.* High Detection Rates of Human Bocavirus in Infants and Small Children with Lower Respiratory Tract Infection from Croatia. *Clinical Laboratory*, v. 65, n. 1, 2019.

LEE, H N. *et al.* Human bocavirus infection in adults: clinical features and radiological findings. *Korean Journal of Radiology*, v. 20, n. 7, p. 1226, 2019.

LA ROSA, G. *et al.* Detection of human bocavirus species 2 and 3 in bivalve shellfish in Italy. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 84, n. 7, p. e02754-17, 2018.

LU, Q-B. *et al.* Epidemic and molecular evolution of human bocavirus in hospitalized children with acute respiratory tract infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 34, n. 1, p. 75-81, 2015.

LONGTIN, J. *et al.* Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 2, p. 217, 2008.

LA ROSA, G. *et al.* Human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Albania. *Journal of Medical Virology*, v. 88, n. 5, p. 906-910, 2016.

LEVICAN, J. *et al.* Human bocavirus in children with acute gastroenteritis, Chile, 1985–2010. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 11, p. 1877, 2013.

LIGOZZI, Marco *et al.* Assessment of NS1 gene-specific real time quantitative TaqMan PCR for the detection of Human Bocavirus in respiratory samples. *Molecular and Cellular Probes*, v. 34, p. 53-55, 2017.

LA ROSA, G. *et al.* Human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Albania. *Journal of Medical Virology*, v. 88, n. 5, p. 906-910, 2016.

LEVICAN, J. *et al.* Human bocavirus in children with acute gastroenteritis, Chile, 1985–2010. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 11, p. 1877, 2013.

LIGOZZI, Marco *et al.* Assessment of NS1 gene-specific real time quantitative TaqMan PCR for the detection of Human Bocavirus in respiratory samples. *Molecular and Cellular Probes*, v. 34, p. 53-55, 2017.

LIU, L *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*, v. 385, n. 9966, p. 430-440, 2015.

LJUBIN-STERNAK, S. *et al.* High Detection Rates of Human Bocavirus in Infants and Small Children with Lower Respiratory Tract Infection from Croatia. *Clinical Laboratory*, v. 65, n. 1, 2019.

LUO, Y; QIU, J. Human parvovirus B19: a mechanistic overview of infection and DNA replication. *Future Virology*, v. 10, n. 2, p. 155-167, 2015.

LIN, F. *et al.* ELISAs using human bocavirus VP2 virus-like particles for detection of antibodies against HBoV. *Journal of Virological Methods*, v. 149, n. 1, p. 110-117, 2008.

LINDNER, J. *et al.* Humoral immune response against human bocavirus VP2 virus-like particles. *Viral Immunology*, v. 21, n. 4, p. 443-450, 2008.

MORIYAMA, M.; HUGENTOBLER, W J.; IWASAKI, A. Seasonality of respiratory viral infections. *Annual Review of Virology*, v. 7, p. 83-101, 2020.

MCALLISTER, D A. *et al.* Global, regional, and national estimates of pneumonia morbidity and mortality in children younger than 5 years between 2000 and 2015: a systematic analysis. *The Lancet Global Health*, v. 7, n. 1, p. e47-e57, 2019.

MULLER, D A.; DEPELSENAIRE, A C I.; YOUNG, P R. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 215, n. suppl_2, p. S89-S95, 2017.

MÄNTYLÄ, E.; KANN, M.; VIHINEN-RANTA, M. Protoparvovirus Knocking at the Nuclear Door. *Viruses*, v. 9, n. 10, p. 286, 2017.

MIETZSCH, M. *et al.* Structural insights into human bocaparvoviruses. *Journal of Virology*, v. 91, n. 11, p. e00261-17, 2017.

MAKHLOUF, M M.; ELWAKIL, S G.; IBRAHIM, N. Molecular and serological assessment of parvovirus B-19 infection in Egyptian children with sickle cell disease. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 50, n. 5, p. 565-569, 2017.

MISHRA, P. *et al.* Viral agents causing acute respiratory infections in children under five: a study from Eastern India. *International Journal of Pediatrics*, v. 2016, 2016.

MOESKER, F M. *et al.* Human bocavirus infection as a cause of severe acute respiratory tract infection in children. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 21, n. 10, p. 964. e1-964. e8, 2015.

MORENO, B *et al.* Detection of human bocavirus type 1 infection in Panamanian children with respiratory illness. *Journal of Medical Virology*, v. 88, n. 3, p. 389-394, 2016.

MACKENZIE, G. The definition and classification of pneumonia. *Pneumonia*, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2016.

MUENCHHOFF, M.; GOULDER, P J R. Sex differences in pediatric infectious diseases. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 209, n. suppl_3, p. S120-S126, 2014.

MOURA, F E A. *et al.* Respiratory syncytial virus epidemic periods in an equatorial city of Brazil. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 7, n. 6, p. 1128-1135, 2013.

MARTIN, E T. *et al.* Detection of bocavirus in saliva of children with and without respiratory illness. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 12, p. 4131-4132, 2009.

NOKSO-KOIVISTO, J. *et al.* Role of human bocavirus in upper respiratory tract infections and acute otitis media. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, v. 3, n. 2, p. 98-103, 2014

NANTACHIT, N. *et al.* Human bocavirus genotypes 1, 2, and 3 circulating in pediatric patients with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand, 2012–2018. *Journal of Infection and Public Health*, v. 14, n. 2, p. 179-186, 2021.

NASCIMENTO-CARVALHO, A C. *et al.* Serologically diagnosed acute human bocavirus 1 infection in childhood community-acquired pneumonia. *Pediatric Pulmonology*, v. 53, n. 1, p. 88-94, 2018.

NING, G. *et al.* The etiology of community-acquired pneumonia among children under 5 years of age in mainland China, 2001–2015: A systematic review. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 13, n. 11, p. 2742-2750, 2017.

NASCIMENTO-CARVALHO, C M. *et al.* Human bocavirus infection diagnosed serologically among children admitted to hospital with community-acquired pneumonia in a tropical region. *Journal of Medical Virology*, v. 84, n. 2, p. 253-258, 2012.

OCADAQUE, C J.; CAMPELO, F S.; MOURA, F E A. Respiratory Infections in Children Associated to Parainfluenza Virus Type 4. *Revista Panamericana de Enfermedades Infecciosas*, p. 8-11, 2018.

OCADAQUE, C J. Dissertação: Aspectos clínicos e epidemiológicos de pneumonias infantis associadas aos quatro tipos de vírus parainfluenza. Universidade Federal do Ceará, 2016.

PILGER, D A. *et al.* Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 1, p. 56-60, 2011.

PETRARCA, L. *et al.* Human bocavirus in children hospitalized for acute respiratory tract infection in Rome. *World Journal of Pediatrics*, v. 16, n. 3, p. 293-298, 2020.

PEYRANI, P. *et al.* The burden of community-acquired bacterial pneumonia in the era of antibiotic resistance. *Expert Review of Respiratory Medicine*, v. 13, n. 2, p. 139-152, 2019.

PROENCA-MODENA, J L. *et al.* Human adenovirus replication and persistence in hypertrophic adenoids and palatine tonsils in children. *Journal of Medical Virology*, v. 91, n. 7, p. 1250-1262, 2019.

PRINCIPI, N. *et al.* Bocavirus infection in otherwise healthy children with respiratory disease. *PLoS One*, v. 10, n. 8, p. e0135640, 2015.

PROENCA-MODENA, J L. *et al.* Hypertrophic adenoid is a major infection site of human bocavirus 1. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 8, p. 3030-3037, 2014.

PILGER, D A. *et al.* Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 1, p. 56-60, 2011.

QIU, J.; SÖDERLUND-VENERMO, M.; YOUNG, N S. Human parvoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 1, p. 43-113, jan. 2017.

RABONI, S M. *et al.* Global Influenza Hospital-based Surveillance Network (GIHSN): results of surveillance of influenza and other respiratory viruses in hospitalised patients in Brazil, 2015. *BMJ Open*, v. 8, n. 2, p. e017603, 2018.

REMOLINA, Y A. *et al.* Viral infection in adults with severe acute respiratory infection in Colombia. *PloS One*, v. 10, n. 11, p. e0143152, 2015.

RIBEIRO, R S. *et al.* Etiologia viral das infecções respiratórias agudas em população pediátrica no Instituto Fernandes Figueira/FIOCRUZ/RJ. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 5, p. 519-527, 2011.

RELLER, L B.; WEINSTEIN, M P.; MURDOCH, D R. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 36, n. 9, p. 1162-1170, 2003.

RASHID, Z Z. *et al.* Multiplex Real-Time PCR Detection of Respiratory Viruses in Lower Respiratory Tract Infections in Children. *Sains Malaysiana*, v. 47, n. 11, p. 2821-2829, 2018.

REMOLINA, Y A. *et al.* Viral infection in adults with severe acute respiratory infection in Colombia. *PloS One*, v. 10, n. 11, p. e0143152, 2015.

RUDAN, I. *et al.* Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries. *Journal of Global Health*, v. 3, n. 1, 2013.

SOBKOWIAK, P. *et al.* Human bocavirus and metapneumovirus in acute wheezing in children—Is there a link with atopy?. *The Clinical Respiratory Journal*, v. 14, n. 12, p. 1201-1207, 2020.

SCHUCK-PAIM, C. *et al.* Effect of pneumococcal conjugate vaccine introduction on childhood pneumonia mortality in Brazil: a retrospective observational study. *The Lancet Global Health*, v. 7, n. 2, p. e249-e256, 2019.

SUN, H. *et al.* Impact of RSV coinfection on human bocavirus in children with acute respiratory infections. *Journal of Tropical Pediatrics*, v. 65, n. 4, p. 342-351, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Pneumonia adquirida na Comunidade na Infância. Julho de 2018. Disponível em: <https://www.sbp.com.br/>.

SILVA, P E. *et al.* Human bocavirus in hospitalized children under 5 years with acute respiratory infection, Sao Paulo, Brazil, 2010. *Archives of Virology*, v. 163, n. 5, p. 1325-1330, 2018.

SAILS, A D. *et al.* Comparison of the Luminex NxTAG respiratory pathogen panel and a multiplex in-house real-time PCR panel for the detection of respiratory viruses in symptomatic patients. *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, n. 9, p. 1291-1296, 2017.

SONG, E. *et al.* Diagnosis of pediatric acute adenovirus infections: is a positive PCR sufficient?. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 35, n. 8, p. 827, 2016.

SHEN, W. *et al.* Identification and functional analysis of novel nonstructural proteins of human bocavirus 1. *Journal of Virology*, v. 89, n. 19, p. 10097-10109, 2015.

SGAMBATTI, S. *et al.* Appropriateness of administrative data for vaccine impact evaluation: the case of pneumonia hospitalizations and pneumococcal vaccine in Brazil. *Epidemiology & Infection*, v. 143, n. 2, p. 334-342, 2015.

SHI, T. *et al.* Aetiological role of common respiratory viruses in acute lower respiratory infections in children under five years: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Health*, v. 5, n. 1, 2015.

SALMÓN-MULANOVICH, G. *et al.* Frequency of human bocavirus (HBoV) infection among children with febrile respiratory symptoms in Argentina, Nicaragua and Peru. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2011. 2

SUN, B. *et al.* The nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 induces cell cycle arrest and apoptosis in Hela cells. *Virology*, v. 440, n. 1, p. 75-83, 2013.

SCHILDGEN, O.; SCHILDGEN, V. The role of the human bocavirus (HBoV) in respiratory infections. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Springer, Cham. 281-301, 2018.

SALVO, M. *et al.* Human Bocavirus: detection, quantification and molecular characterization in sewage and surface waters in Uruguay. *Food and Environmental Virology*, v. 10, n. 2, p. 193-200, 2018.

SONEGO, M. *et al.* Risk factors for mortality from acute lower respiratory infections (ALRI) in children under five years of age in low and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PloS One*, v. 10, n. 1, p. e0116380, 2015.

SLACK, M P E. A review of the role of *Haemophilus influenzae* in community-acquired pneumonia. *Pneumonia*, v. 6, p. 26-43, 2015.

SOUZA, E L. *et al.* Human bocavirus in very young infants hospitalized with acute respiratory infection in northeast Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics*, v. 56, n. 2, p. 125-127, 2010.

SILVA, A K. *et al.* Ocorrência de Bocavírus Humano associado às infecções respiratórias agudas em crianças de 0 a 2 anos de idade na Cidade de Belém, Pará, Brasil. 2010.

SIQUEIRA, M M.; MOURA F E. Seasonality of influenza in the tropics: a distinct pattern in northeastern Brazil. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), pp. 180-183, 2009.

SUNG, R Y T. *et al.* Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for diagnosis of acute viral respiratory infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 9, p. 3073-3076, 2008.

STORCH, G A. Diagnostic virology. *Clinical infectious diseases*, v. 31, n. 3, p. 739-751, 2000.

- TRAMPER-STRANDERS, G A. Childhood community-acquired pneumonia: A review of etiology-and antimicrobial treatment studies. *Paediatric Respiratory Reviews*, v. 26, p. 41-48, 2018.
- TORRES, A. *et al.* Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *European Respiratory Journal*, v. 48, n. 6, p. 1764-1778, 2016.
- TABASI, M. *et al.* Human bocavirus infections among children less than two years old in Iran during fall and winter 2012–2013. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 80, 2016.
- TYMENTSEV, A. *et al.* Human bocavirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in Russia from 2010 to 2012. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 37, p. 143-149, 2016.
- TRAN, D N. *et al.* Human bocavirus in children with acute respiratory infections in Vietnam. *Journal of Medical Virology*, v. 86, n. 6, p. 988-994, 2014.
- URŠIČ, T. *et al.* Human bocavirus as the cause of a life-threatening infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 3, p. 1179-1181, 2011.
- VAGEDES, J. *et al.* Restrictive antibiotic use in children hospitalized for pneumonia: A retrospective inpatient study. *European Journal of Integrative Medicine*, v. 34, p. 101068, 2020.
- VERBEKE, V. *et al.* Human bocavirus infection in Belgian children with respiratory tract disease. *Archives of virology*, v. 164, n. 12, p. 2919-2930, 2019.
- VIEIRA, I L V.; KUPEK, E. The impact of pneumococcal vaccine in reducing pneumonia hospitalizations in children under 5 years old, in Santa Catarina, Brazil, 2006 a 2014. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 27, p. e2017378, 2018.
- VANDINI, S. *et al.* Respiratory syncytial virus infection in infants and correlation with meteorological factors and air pollutants. *Italian Journal of Pediatrics*, v. 39, n. 1, p. 1-6, 2013.
- VAZ-DE-LIMA, L R A. *et al.* Performance of indirect immunofluorescence assay, immunochromatography assay and reverse transcription-polymerase chain reaction for detecting human respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirate samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 5, p. 463-467, 2008.
- VICENTE, D. *et al.* Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 4, p. 636, 2007.
- VAN KRAAIJ, M G J. *et al.* Frequent detection of respiratory viruses in adult recipients of stem cell transplants with the use of real-time polymerase chain reaction, compared with viral culture. *Clinical infectious diseases*, v. 40, n. 5, p. 662-669, 2005.
- WONG-CHEW, R M. *et al.* Respiratory viruses detected in Mexican children younger than 5 years old with community-acquired pneumonia: a national multicenter study. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 62, p. 32-38, 2017.
- WANG, H. *et al.* Prevalence of respiratory viruses among children hospitalized from

respiratory infections in Shenzhen, China. *Virology journal*, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2016.

WALKER, C L F. *et al.* Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *The Lancet*, v. 381, n. 9875, p. 1405-1416, 2013.

WANG, Y. *et al.* Genetic characterization of human bocavirus among children with severe acute respiratory infection in China. *Journal of Infection*, v. 73, n. 2, p. 155-163, 2016.

WUNDERINK, R G.; YIN, Y. Antibiotic resistance in community-acquired pneumonia pathogens. In: *Seminars in respiratory and critical care medicine*. Thieme Medical Publishers. p. 829-838, 2016

WANG, Z *et al.* Parvovirus expresses a small noncoding RNA that plays an essential role in virus replication. *Journal of Virology*, v. 91, n. 8, p. e02375-16, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Executive summary: ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhoea by 2025: the integrated global action plan for pneumonia and diarrhoea (GAPPD). World Health Organization, 2013.

XU, M. *et al.* Persistence of human bocavirus 1 in tonsillar germinal centers and antibody-dependent enhancement of infection. *Mbio*, v. 12, n. 1, p. e03132-20, 2021.

XU, M. *et al.* Comparative diagnosis of human bocavirus 1 respiratory infection with messenger RNA reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR), DNA quantitative PCR, and serology. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 215, n. 10, p. 1551-1557, 2017.

ZHANG, N. *et al.* Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *Journal of Medical Virology*, v. 92, n. 4, p. 408-417, 2020.

ZHANG, Z. *et al.* Human bocavirus NP1 inhibits IFN- β production by blocking association of IFN regulatory factor 3 with IFNB promoter. *The Journal of Immunology*, v. 189, n. 3, p. 1144-1153, 2012.

ZHAO, Y. *et al.* Comparison of viral and epidemiological profiles of hospitalized children with severe acute respiratory infection in Beijing and Shanghai, China. *BMC Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

ZHAO, B *et al.* High human bocavirus viral load is associated with disease severity in children under five years of age. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. e62318, 2013.

ZHOU, J-Y. *et al.* Human bocavirus and human metapneumovirus in hospitalized children with lower respiratory tract illness in Changsha, China. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 12, n. 2, p. 279-286, 2018.

ZHOU, L. *et al.* Single detection of human bocavirus 1 with a high viral load in severe respiratory tract infections in previously healthy children. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, p. 424, 2014.

ZHOU, T. *et al.* Prevalence and clinical profile of human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Chengdu, West China, 2012-2013. *Journal of medical virology*, v. 89, n. 10, p. 1743-1748, 2017.

ZOU, W. *et al.* A Comprehensive RNA-seq Analysis of Human Bocavirus 1 Transcripts in Infected Human Airway Epithelium. *Viruses*, v. 11, n. 1, p. 33, 2019.

ZOU, W. *et al.* Nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 plays a critical role in the expression of viral capsid proteins. *Journal of Virology*, v. 90, n. 9, p. 4658-4669, 2016.

ZHENG, L-S. *et al.* Human bocavirus infection in young children with acute respiratory tract infection in Lanzhou, China. *Journal of Medical Virology*, v. 82, n. 2, p. 282-288, 2010.

WANG, Z *et al.* Parvovirus expresses a small noncoding RNA that plays an essential role in virus replication. *Journal of Virology*, v. 91, n. 8, p. e02375-16, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Executive summary: ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhoea by 2025: the integrated global action plan for pneumonia and diarrhoea (GAPD). World Health Organization, 2013.

XU, M. *et al.* Persistence of human bocavirus 1 in tonsillar germinal centers and antibody-dependent enhancement of infection. *Mbio*, v. 12, n. 1, p. e03132-20, 2021.

XU, M. *et al.* Comparative diagnosis of human bocavirus 1 respiratory infection with messenger RNA reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR), DNA quantitative PCR, and serology. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 215, n. 10, p. 1551-1557, 2017.

ZHANG, N. *et al.* Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *Journal of Medical Virology*, v. 92, n. 4, p. 408-417, 2020.

ZHANG, Z. *et al.* Human bocavirus NP1 inhibits IFN- β production by blocking association of IFN regulatory factor 3 with IFNB promoter. *The Journal of Immunology*, v. 189, n. 3, p. 1144-1153, 2012.

ZHAO, Y. *et al.* Comparison of viral and epidemiological profiles of hospitalized children with severe acute respiratory infection in Beijing and Shanghai, China. *BMC Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

ZHAO, B *et al.* High human bocavirus viral load is associated with disease severity in children under five years of age. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. e62318, 2013.

ZHOU, J-Y. *et al.* Human bocavirus and human metapneumovirus in hospitalized children with lower respiratory tract illness in Changsha, China. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 12, n. 2, p. 279-286, 2018.

ZHOU, L. *et al.* Single detection of human bocavirus 1 with a high viral load in severe respiratory tract infections in previously healthy children. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, p. 424, 2014.

ZHOU, T. *et al.* Prevalence and clinical profile of human bocavirus in children with acute gastroenteritis in Chengdu, West China, 2012-2013. *Journal of Medical Virology*, v. 89, n. 10, p. 1743-1748, 2017.

ZOU, W. *et al.* A Comprehensive RNA-seq Analysis of Human Bocavirus 1 Transcripts in Infected Human Airway Epithelium. *Viruses*, v. 11, n. 1, p. 33, 2019.

ZOU, W. *et al.* Nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 plays a critical role in the expression of viral capsid proteins. *Journal of Virology*, v. 90, n. 9, p. 4658-4669, 2016.

ZHENG, L-S. *et al.* Human bocavirus infection in young children with acute respiratory tract infection in Lanzhou, China. *Journal of Medical Virology*, v. 82, n. 2, p. 282-288, 2010.

ZHANG, L-L. *et al.* Human bocavirus in children suffering from acute lower respiratory tract infection in Beijing Children's Hospital. *Chinese Medical Journal*, v. 121, n. 17, p. 1607-1610, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

A técnica de IFI como uma das técnicas para detecção viral foi realizada utilizando o Respiratory Panel I Viral Screening and Identification (Chemicon International, Temecula, USA). Através desta ferramenta foi possível detectar o RSV, AdV, FLU A e FLU B e PIV 1, 2 e 3. A técnica foi realizada seguindo as orientações do fabricante.

Tão logo que chegaram no Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Ceará, a alíquota de 2mL das amostras foram processadas para a detecção viral por IFI. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos para adquirir o sedimento celular. Após isso, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi suspenso utilizando tampão salina-fosfato (PBS). Três lâminas foram preparadas utilizando o conteúdo resuspenso para a técnica de IFI, uma lâmina de triagem e duas para detecção específica do vírus. Após secas em estufas a 37°C, as células foram fixadas nas lâminas utilizando acetona P.A em 4°C.

A princípio, a técnica de IFI foi realizada em apenas uma lâmina de triagem, seguindo os seguintes passos: (1) adição de 16µL de anticorpos não conjugados de triagem e anticorpos do controle negativo na preparação da lâmina; (2) incubação em câmara úmida à 37°C por 30 minutos; (3) lavagem da lâmina utilizando PBS+tween 20 e PBS por imersão; (4) secagem da lâmina; (5) adição de 16µL do anticorpo conjugado no poço de triagem e controle negativo; (6) repetir os passos 2 a 4; (7) após a última secagem, as lâminas foram cobertas com óleo de montagem fornecido pelo kit e cobertas com lamínula e leitura da lâmina em microscópio de imunofluorescência (Olympus BX-40). Amostras foram consideradas positivas quando, pelo menos, 3 células apresentaram fluorescência (VAZ-DE-LIMA *et al.*, 2008).

As amostras positivas na triagem passavam por uma nova IFI, dessa vez, para detecção do agente viral. Para isso, foi utilizada a lâmina específica, com oito demarcações em círculos, e adicionado 16 µL de anticorpos específicos direcionados contra os sete vírus pesquisados, e no último e oitavo círculo, o anticorpo de controle negativo. As amostras foram novamente processadas seguindo os passos 2 a 7 descritos no parágrafo anterior.

APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO

Brazilian Journal of Infectious Diseases
The role of human bocavirus as an agent of community-acquired pneumonia in
children under five years of age in a city in northeastern Brazil
--Manuscript Draft--

Title Page (with Author Details)

The role of human bocavirus as an agent of community-acquired pneumonia in
children under five years of age in a city in northeastern Brazil

Felipe Serra Campelo¹, Rossana de Aguiar Cordeiro^{1,2}, Fernanda Edna Araújo Moura^{2*}

¹ Postgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Ceará, Brazil

² Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Brazil

* Corresponding author: Fernanda Edna Araújo Moura

E-mail: fernandaedna@ufc.br

ANEXOS

ANEXO A – FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

**Pneumonias adquiridas na comunidade de etiologia viral em crianças atendidas por
doença respiratória aguda no Hospital infantil Albert Sabin: prevalência, apresentações
clínicas e complicações**

Responsável pela coleta: _____ Data da coleta: _____

Dados pessoais do paciente	
Nome: _____	Sexo: () Masc () Fem
Data de nascimento: _____	Idade em meses: _____
Bairro: _____	Procedência: () Fortaleza () Outra (citar): _____
Pessoa p/ contato: _____	Telefone: _____
() Emergência () Observação () Ambulatório/Consultório () Enfermaria () UTI	
() Ressuscitação	
Leito _____	Prontuário _____

Histórico do paciente

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

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

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

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

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

() Asma () Doença neurológica () Imunossupressão () Doença do refluxo gastroesofágico

() Fumante em casa () Outras: _____

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

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

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

Doença atual

Queixa principal: _____ Tempo de início de sintomas: _____

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

() Diarreia () Cansaço () Exantema () Conjuntivite () Convulsões () Estridor () Cianose

() Outras _____

Exame físico

Peso: _____ Temp: _____ Freq resp: _____

Estado geral: () Bom () Gemente () Cianótico Orofaringe: () Não examinada () Normal

() Hiperemiada () Hipertrofia de amígdalas () Pontos purulentos () Vesículas () Úlceras

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

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

de tórax: () Não solicitado () Normal () Condensação () Infiltrado intersticial ()

Hiperinsulflação pulmonar () Outros: _____

Hipótese diagnóstica da doença atual: _____**Tratamento instituído pelo médico**

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

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

() Outros: _____

Medicação prescrita para casa: () Não () Sim () Antitérmico () Aerossol () Corticoide ()

Antibiótico () Outra: _____

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

Observações: _____

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PNEUMONIAS ADQUIRIDAS NA COMUNIDADE DE ETIOLOGIA VIRAL EM CRIANÇAS ATENDIDAS POR DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA NO HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN: PREVALÊNCIA, APRESENTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES

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

Eu _____, RG _____, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a) _____ nascido (a) em ___/___/_____, seja voluntário do estudo “**Pneumonias adquiridas na comunidade de etiologia viral em crianças atendidas por doença respiratória aguda no Hospital infantil Albert Sabin: prevalência, apresentações clínicas e complicações**”. Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Estou ciente de que: Este estudo tem como objetivo descrever o perfil epidemiológico e clínico das pneumonias **etiologia viral** na população de estudo.

- 1 - Serão feitas coletas de secreção nasal do (a) meu (minha) filho (a);
- 2- Estas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o tratamento de meu (minha) filho (a); A coleta pode causar um leve desconforto, mas não prejudicará em nada meu (minha) filho (a)
- 3 - Participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- 4 - Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo quando desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- 5 - A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho(a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médicos a que ele(ela) estiver sendo submetido;
- 6 - Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que

sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;

7 - Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;

OBS: Assinalar abaixo com (x):

() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Fortaleza, _____ de _____ de 20_____

() Paciente / () Responsável _____

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Médico Responsável: _____

Prof. Responsável pelo Projeto: _____

Dra Fernanda Edna Araújo Moura

ANEXO C – CEP HIAS



HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Terútiliano Sales 544 – Vila União – Fortaleza – Ceará
Fone/Fax: (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