LARISSA M. BOMÍLCAR DO AMARAL

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DO VÍRUS PARAINFLUENZA HUMANO 1, 2 E 3 EM
CRIANÇAS MENORES DE 5 ANOS DE IDADE
ATENDIDAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM 2007,
SÃO PAULO- BRASIL**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Microbiologia).**

São Paulo

2009

LARISSA M. BOMÍLCAR DO AMARAL

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DO VÍRUS PARAINFLUENZA HUMANO 1, 2 E 3 EM
CRIANÇAS MENORES DE 5 ANOS DE IDADE
ATENDIDAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM 2007,
SÃO PAULO -BRASIL**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Klaus E. Stewien

São Paulo

2009

RESUMO

AMARAL, L. M.B. Epidemiologia e caracterização molecular do vírus Parainfluenza Humano 1, 2 e 3 em crianças atendidas no Hospital Universitário, no ano de 2007, São Paulo, Brasil.

O objetivo do presente trabalho é descrever o perfil epidemiológico e molecular dos vírus parainfluenza em crianças menores de 5 anos de idade, com infecção das vias respiratórias. Portanto, aspirados de nasofaringe de 742 crianças foram examinadas para os vírus parainfluenza humano (HPIV1, HPIV2 e HPIV3), hRSV, hMPV e IA e IB pela técnica de RT-PCR, durante o ano de 2007. Ao todo foram identificados 52(7%) parainfluenza vírus, sendo 9(17,3%) HPIV1, 8(15,4%) HPIV2 e 35(67,3%) HPIV3. Destas, 12 (23%) foram casos de coinfeções, sendo 3 (25%) de HPIV3 com VRS, 3 (25%) com MPV e 3 (25%) com HPIV1 e 1(8,33%) com HPIV2; além de 1(8,33%) do HPIV1 com hVSR; e 1(8,33%) de HPIV2 com o hMPV. Com relação ao setor de atendimento, dos 52 pacientes com HPIV, 8(5%) dos casos foram atendidos no PA; 38(8,4%) na ENF; 6(18,2%) na UTI. Obtivemos, no estudo, 21(5,3%) crianças do sexo masculino com infecção por HPIV e 31(9%) de sexo feminino. Quanto a idade, as crianças entre 1mês a 23meses foram as mais frequentemente infectadas. Com relação ao diagnóstico clínico tivemos 19(36,5%) casos com bronquiolites, 13(25%) casos com pneumonia, 7(13,4%) com broncopneumonia, 2(3,9%) de casos de dispnéia e 2(3,9%) de IVAS, além de 9(17,3%) sem informação da sintomatologia. A sazonalidade do HPIV foi marcada pela circulação do HPIV3 durante o ano inteiro, com maior incidência em outubro(primavera). O HPIV 1 e 2 se alternaram durante o ano, onde o HPIV1 circulou no primeiro semestre com maior incidência no mês de abril e maio e o HPIV2 circulou no segundo semestre com maior incidência em outubro, coincidindo com o HPIV3. O Estudo filogenético dos HPIV1 demonstrou 9 mutações nucleotídicas, sendo que 4 são características das amostras brasileiras. Entretanto, quando feito a transdução para aminoácido, apenas uma mutação foi não silenciosa, onde observamos a mudança de Glicina, nas amostras do Genbank, para Argenina, nas amostras brasileiras, deixando-as em um clado único na topologia da árvore obtida. O HPIV3 apresentou 4 subgrupos distintos durante o ano e suas mutações tanto nucleotídicas quanto de aminoácidos foram todas silenciosas. Em conclusão o vírus parainfluenza representaram a 3ª maior causa de infecção das vias respiratórias inferiores, precedido pelo vírus respiratório Sincicial e o Metapneumovirus.

Palavra chave: HPIV tipo 1, 2 e 3, Epidemiologia, Variabilidade genética.

_AMARAL, L. M. B. Molecular characterization and epidemiology of Human parainfluenza virus isolated from children below five years old hospitalized at the University Hospital, USP, in 2007, São Paulo-Brasil

The goal of the present work was to characterize the epidemiologic and molecular profile of the parainfluenza virus in children with less than 5 years of age and presenting respiratory tract infection. Human parainfluenza (HPIV1, HPIV2, HPIV3), and hRSV, hMPV e IA e IB were evaluated in nasopharyngeal aspirate from 742 children by RT-PCR during the year of 2007. Human parainfluenza was identified in 52(7%) of the samples, which include 9(17,3%) HPIV1, 8(15,4%) HPIV2 and 35(67,3%) HPIV3 17,3% (n=9). Among the 52 cases with parainfluenza, 12 (23%) presented coinfection with other viruses: 3 (25%) coinfection with HPIV3 and VRS, 3 (25%) MPV , 3 (25%) HPIV1 , 1(8,33%) HPIV2 . In addition, it was observed 1(8,33%) of cases with HPIV1 and hVSR; and 1(8,33%) of cases with HPIV2 and hMPV. With respect to the clinical care of the 52 patients with HPIV, 8(5%) were treated at the ER ; 38(8,4%) at the ENF and 6(18,2%) at the ICU. With respect to gender, a total of 21(5,3%) of the participants with HPIV infections were male and 31(9%) were female. The prevalent age range of participants with infections was 1-23 months of age. The following clinical parameters were observed: bronchiolitis 19(36,5%), pneumonia 13(25%), bronchopneumonia 7(13,4%), dyspnea 2(3,9%) and IVAS 2(3,9%). No clinical information was available for 9(17,3%) cases. HPIV3 infections were detected all year long with an incidence peak in October (Spring). HPIV1 and 2 infections were intercalated during the year. HPIV1 was detected during the first semester with peaks of incidence in April and May whereas HPIV2 was detected during the second semester with peaks of incidence in October, coexisting with HPIV3. HPIV1 phylogenetic studies revealed 9 genetic mutations. 4 out of the 9 mutations are exclusively found in the Brazilian population. However, only one of these 9 mutations is non-silent and causes a Glycine to Arginine substitution. When compared to other Brazilian sequences in the GenBank, this observation revealed um clado único na topologia da árvore obtida. HPIV3 genotyping included 4 distinct groups detected all year long. All mutations observed in HPIV3 were silent. In conclusion, the parainfluenza virus represent the 3rd major cause of infection of the lower respiratory tract, following the sincicial respiratory virus and the Metapneumovirus.

Keywords: HPIV type 1, 2 and 3, Epidemiology, Genetic Variability.

1. INTRODUÇÃO

As infecções do trato respiratório são responsáveis por uma variedade de quadros clínicos que compreendem desde manifestações mais leves, como o resfriado comum até as síndromes respiratórias graves, representadas por bronquiolites e pneumonites (BOIVIN et al., 2003; HALL, 2001). O estudo das doenças respiratórias causadas por vírus é de grande interesse quando se constata que a grande maioria das infecções respiratórias observadas na prática médica de todo o mundo é de etiologia viral (ARRUDA et al., 1991; COLLINS et al., 2001). Estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes regiões geográficas demonstraram que o Vírus Respiratório Sincicial Humano (*Human Respiratory Syncytial Virus* - HRSV), Vírus da Parainfluenza (*Human Parainfluenza Virus* – HPIV), Vírus da Influenza (*Human Influenza Virus* – IV), Adenovírus (*Human adenovirus* – HAdV) e mais recentemente o Metapneumovírus Humano (*human Metapneumovirus* - HMPV) são os principais patógenos associados às infecções do trato respiratório inferior em menores de cinco anos de idade (GARCIA et al., 2001; IWANE et al., 2004);

Muitos trabalhos descrevem o perfil epidemiológico de diversos vírus, mas existem poucas informações publicadas na América do Sul que descrevem o perfil clínico-epidemiológico e molecular do vírus Parainfluenza Humano em crianças.

O objetivo deste trabalho é descrever um perfil epidemiológico e molecular do vírus Parainfluenza Humano em crianças menores de 5 anos de idade atendidas com infecções respiratórias no Hospital Universitário (HU), da Universidade de São Paulo durante o ano de 2007.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O primeiro isolamento do vírus da Parainfluenza Humano ocorreu no ano de 1956 por Chanock e colaboradores na cidade de Cincinnati, EUA, a partir de estudos realizados em crianças com laringotraqueobronquites (crupe) e outras doenças do trato respiratório (CHANOCK et al., 1956; CHANOCK et al., 1958; JOHNSON et al., 1959; CHANOCK et al., 1979).

Técnicas de cultura celular e o isolamento do vírus pelo método de hemadsorção desenvolvido por Vogel e Shelokov (1957), foram utilizadas na identificação de diferentes linhagens de Influenza A, porém, grande parte dos agentes encontrados não pertencia a nenhuma das espécies de Influenza. Estes agentes, outrora classificados como não Influenza, pareciam formar dois novos grupos de Myxovirus, provavelmente responsáveis por doenças respiratórias em crianças (ANDREWES et al., 1955; GLEZEN et al., 1989) nomeou-os de *Croup-Associated virus* (CA).

Posteriormente, em 1958, duas linhagens do vírus da Parainfluenza Humano foram identificadas e designadas Hemadsorção 1 (HA-1) e Hemadsorção 2 (HA-2) as quais apresentavam propriedades biológicas semelhantes aos CA vírus, porém suas características antigênicas eram distintas (JOHNSON et al., 1959).

Desta forma, os vírus foram reclassificados, sendo o vírus HA-2 denominado Parainfluenza 1, os CA vírus, Parainfluenza 2, e o HA-1, Parainfluenza 3 (ANDREWES et al., 1969). O vírus da Parainfluenza 4 foi somente isolado no ano de 1960 (JOHNSON et al., 1959). O termo *parainfluenza* foi originalmente criado devido a mesma natureza das infecções respiratória e das propriedades morfológicas e

fisiológicas da partícula do vírus, incluindo a presença de envelope lipídico e neuraminidase e hemaglutinina (COLLINS et al., 2007).

2.1 Classificação

De acordo com o *Internacional Committee the Taxonomy of Viruses* (ICTV) o vírus Parainfluenza Humano pertence à família *Paramixoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, estando as espécies HPIV1 e HPIV3 no gênero *Paramyxovirus* e as espécies HPIV2 e HPIV4 sub-tipos 4A e 4B no gênero *Rubulavirus*.

Esta segregação do Vírus Parainfluenza Humano entre os Gêneros *Respirovirus* e *Rubulavirus* foi baseada em distintas características: (a) existe uma diferença nas proteínas; enquanto o gênero *Paramixovirus* tem a presença da proteína C o *Rubulavirus* possui um gene adicional que codifica a proteína SH além de ter uma proteína P pequena; (b) regiões intergênicas do *Paramixovirus* possuem trinucleotídeos conservados, enquanto no *Rubulavirus* estes nucleotídeos são variáveis, em comprimento e conservação; (c) os detalhes de edição do RNA diferem entre os dois gênero. O *Rubulavirus* tem uma maior diversidade na organização do genoma e na sequência de nucleotídeos e aminoácidos do que o *Paramixovirus* (COLLINS et al.,2007).

Os vírions são pleomórficos, com diâmetro variando entre 150 e 300 nanômetros (nm), com o formato variando de aproximadamente esférico a filamentoso (figura 1).O envelope é composto por uma camada bi-lipídica e por glicoproteínas de superfície.O nucleocapsídeo helicoidal (com diâmetro de cerca 18 nm) é formado pelo genoma, composto por uma fita simples de ácido ribonucléico (RNA) com polaridade negativa, com $15,4 \times 10^3$ nucleotídeos; pela nucleoprotína NP,

ligada firmemente a molécula de RNA; e por outras proteínas: a fosfoproteína (proteína P) e a proteína “ *Large*” (L), que se apresenta de forma descontínua no vírus. A nucleoproteína (NP) é a proteína mais abundante do vírion, e, juntamente com as proteínas P e L, é tida como responsável pela atividade de RNA polimerase RNA polimerase-dependente (VAINIONPÄÄ, HYYPIÄ, 1994; PIEDRA et al., 1997).

Figura 1. Micrografia eletrônica do HPIV 3. As glicoproteínas de superfície são visualizadas com um aumento de 275.000 vezes (HENRICKSON, 2003).

O envelope viral contém duas glicoproteínas específicas do vírus: a glicoproteína de fusão (F) e a hemaglutinina-neuraminidase (NH) (Figura 2). A proteína F é sintetizada na forma de um precursor inativo, que é clivado por proteases celulares para gerar sua forma ativa. A presença de uma protease na célula, capaz de clivar a proteína precursora é importante na determinação do tropismo celular e da virulência do agente. A proteína F está envolvida na hemólise, fusão celular, penetração do vírus na célula e síntese de anticorpos neutralizantes (HENRICKSON, 2003). Esta proteína é um tetrâmero ligado por pontes dissulfeto, sendo composta por um polipeptídeo distal (F2) e um proximal (F1) ancorados no envelope. (VAINIONPÄÄ; HYYPIÄ, 1994). A glicoproteína NH é a molécula que se

liga aos receptores das células susceptíveis (moléculas contendo ácido siálico), mediando a adsorção do vírus. Esta glicoproteína apresenta atividade de hemaglutinina e neuraminidase (WRIGHT, 2005).

A superfície de glicoproteínas é responsável por diversas atividades biológicas. A atividade de hemaglutinina da glicoproteína NH é mediar a adsorção do vírus na célula hospedeira para que a infecção tenha início. Após a infecção, a atividade de neuraminidase da HN cliva seu receptor de ácido siálico para a liberação dos vírions. A proteína F media a fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula hospedeira.

A proteína M da matriz é altamente conservada e hidrofóbica. Ela liga o envelope ao nucleocapsídeo. A dupla camada lipídica que compõe o envelope apresenta estrutura idêntica à membrana celular do hospedeiro (VAINIONPÄÄ; HYYPIÄ, 1994).

Figura 2. Representação esquemática do vírus Parainfluenza. Podemos observar a bicamada lipídica, Proteínas da Matriz (M), Tetrâmero HN, Proteína F, Peptídeo de Fusão, Fosfoproteína (P), Proteína do Nucleocapsídeo (NP) e Proteína L (Moscona, 2005).

O genoma viral é formado por uma fita de RNA linear, não segmentada, com polaridade negativa (Figura 3). A organização do genoma viral segue a ordem: 3' NP-P/C/V-M-F-SH-HN-L 5'(FIG)'. A ausência e/ou presença do gene SH determina a divisão do vírus Parainfluenza em dois grupos.

O primeiro grupo que não contém o gene SH, inclui o vírus Parainfluenza 3 (HPIV3), o vírus Sendai e o vírus da doença de Newcastle; o segundo grupo que contém o gene SH, inclui os parainfluenzas vírus de animais, HPIV5 e o vírus do sarampo. A nucleoproteína NP é importante para a estabilidade do material genético viral (PIEDRA et al., 1997).

Figura 3. Esquema do mapa genético do HPIV (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Os vírus da Parainfluenza Humano 1, 2 e 3 estão incluídos entre um dos mais importantes patógenos do trato respiratório em recém-nascidos e crianças somente precedido pelo vírus Respiratório Sincicial (RSV), enquanto doenças causadas pelo HPIV4 ocorrem com menor frequência e a doença menos severa (GLEZEN et al., 1989; COLLINS et al., 2007).

A cada ano, nos Estados Unidos, mais de 5 milhões de infecções do trato respiratório inferior, causadas por vírus são documentadas em crianças com menos de 6 meses de idade. Os vírus da Parainfluenza Humano tipos 1, 2 e 3

(HPIV1, HPIV2 e HPIV3) são responsáveis por aproximadamente um terço destas infecções (DENNY et al., 1986; HENRICKSON et al., 1994), provocando considerável diversidade epidêmica e manifestações clínicas que variam desde infecções amenas das vias respiratórias superiores até formas graves e prolongadas de infecções respiratórias das vias inferiores, tais como crupe, bronqueolites e pneumonia (GARCIA et al., 2002).

O HPIV1 é a principal causa de crupe (laringotraqueobronquite) em crianças. É uma inflamação virótica aguda do trato respiratório superior (nariz, faringe e estruturas associadas) e inferior (laringe, traquéia, brônquios e pulmões), caracterizada por estridor inspiratório, edema subglótico e angústia respiratória, mais pronunciada nas inspirações (HENRICKSON, 2003). O HPIV2 tem manifestações clínicas semelhantes ao HPIV1, entretanto enfermidades graves são menos freqüentes. Os dois tipos também afetam idosos e imunocomprometidos (MORRISON-SMITH, 1983; DENNY et al., 1986; WENDT et al., 1992). O HPIV3 é o segundo maior causador de pneumonia e bronqueolite em recém-nascidos com menos de 6 meses de vida (WELLIVER et al., 1982; MONTÓ et al., 1983; GLEZEN et al., 1984; HENDERSON et al., 1987; MOSCONA et al., 1990).

Poucos relatos referentes às infecções envolvendo o HPIV-4 foram descritas provavelmente, devido a sua baixa patogenicidade e manifestações clínicas mais amenas (LAU et al., 2005). O que leva muitos pacientes a não procurarem o serviço médico. O HPIV4 é raramente isolado em laboratório, devido a dificuldade de visualização do efeito citopático em culturas celulares (GARDENER et al., 1996).

Muitos estudos no mundo todo têm mostrado a importância dos vírus nas doenças do trato respiratório. A incidência de amostras positivas para pelo menos um agente viral em crianças com doenças respiratórias varia de 25 a 35% até cerca de 60% dos casos entre as diversas populações estudadas. Essa variação pode ocorrer devido a diferenças nos métodos de diagnósticos utilizados e diferenças dos tipos de agentes etiológicos pesquisados (CRUZ et al., 1987; KIM et al., 2000; TSAI et al., 2001; MONTO, 2002; STRALIOTTO et al., 2002; MOURA et al., 2003; LEGG et al., 2005; KUSEL et al., 2006). No Brasil, estudos têm demonstrado que a frequência de vírus identificados em crianças com sintomas respiratórios variam de 24 a 60% (ARRUDA et al., 1991; NASCIMENTO et al., 2001; STRALIOTTO et al., 2002; MOURA et al., 2003; COSTA et al., 2006). Os vírus respiratórios mais freqüentemente encontrados são semelhantes em diversas regiões do mundo onde as investigações já foram realizadas (DENNY JR, 1995). Entre os agentes virais responsáveis por causarem doenças respiratórias em crianças, os mais comumente identificados em diversos países, inclusive no Brasil, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005 são: vírus sincicial respiratório, influenza, parainfluenza 1, 2 e 3, adenovírus. Em São Paulo, no mesmo período, em relação ao total de atendimentos, mostrou-se um comportamento semelhante com o do Brasil.

Outro estudo realizado em Uberlândia, Triângulo Mineiro (MG), detectou 45% de positividade para vírus respiratórios em crianças menores de 5 anos de idade. O hRSV foi responsável por 27,5% dos casos investigados, seguido pelos vírus Parainfluenza (9,2%), Influenza A (4,2%) e Adenovírus (4,2%) (CARVALHO et al., 2005).

Estudos têm mostrado diferenças na sazonalidade dos, vírus entre regiões de clima tropical e temperado. Em regiões de clima temperado, a incidência das doenças respiratórias ocasionadas por agentes virais, aumenta no inverno (KIM et al., 2000; PORTILLO; CRUZ, 2000; MACEDO et al., 2002; LEGG et al., 2005; KUSSEL et al., 2006). Já nas regiões tropicais essa relação se é menos evidente, havendo maior incidência das infecções nos meses mais chuvosos (MOURA et al., 2003; ARRUDA et al., 1991).

2.2 Replicação

A replicação do vírus ocorre no citoplasma. Como o RNA viral tem polaridade negativa, é necessário que haja uma síntese de uma fita positiva, que terá função de RNAm, para a síntese das proteínas virais. Novas fitas negativas são, então sintetizadas a partir do RNAm, para formação de novos vírions. Os vírions serão liberados por exocitose (VAINIONPÄÄ, HYYPIÄ. 1994; PIEDRA et al, 1997). (Figura 4).

Figura 4 - Esquema de replicação do Parainfluenza vírus. (The Journal of Clinical Investigation <http://www.jci.org>).

2.3 Epidemiologia do vírus Parainfluenza Humano

Os vírus Parainfluenza são causadores de doenças respiratórias em todo mundo (HENRICKSON, 2003). Em estudos prévios, não foram relatadas diferenças na infecção por Parainfluenza em relação ao sexo. Quanto a idade, a maioria das infecções pelo HPIV1 ocorre entre 6 aos 36 meses, com incidência maior no primeiro ano de vida. O HPIV2 tem seu pico de incidência entre 1 a 2 anos de idade, já o HPIV3, acomete crianças mais novas (HENRICKSON, 2003). Reinfecções são freqüentes ao longo da vida, pelos quatro subtipos (PIEDRA et al., 1997; GLEZEN, 1994).

Depois das infecções por HRSV, o Parainfluenza 1, 2 e 3 é o segundo maior causador de doenças respiratórias em crianças.(ECHEVARRIA et al.,1998;

PORTILLO, 2000; KUSEL et al., 2006). No Brasil, vários estudos revelam a identificação do Parainfluenza em casos de doenças respiratórias (ARRUDA et al., 1991; NASCIMENTO et al., 1991; STRALIOTTO et al., 2002; MOURA et al., 2003; COSTA et al., 2006). Dos quatro tipos de vírus Parainfluenza humano, o mais freqüente em crianças menores de 1 ano de idade é o HPIV3 (TSAI et al., 2001; STRALIOTTO et al., 2002; MOURA et al., 2003).

Os vírus Parainfluenza possuem um comportamento sazonal variável em diferentes localizações geográficas. Entretanto, em algumas regiões, as infecções causadas pelo vírus HPIV1, 2 e 3 não apresentam comportamento sazonal definido (TSAI et al., 2001). Estudos americanos, mostraram um comportamento sazonal do HPIV1, com epidemias no outono em anos ímpares (MARX et al., 1997; MONTANO 2004; FRY et al., 2006). Já o HPIV2, com freqüência menor que o HPIV1 e 3, vem sendo detectado nos anos pares (IRMEN, 2002; MONTANO, 2004; FRY et al., 2006) ou de forma esporádica (KNOTT et al., 1994). Algumas infecções com o HPIV2 têm ocorrido bianualmente com o HPIV1 ou em anos alternados (HENRICKSON, 2003).

O HPIV3, é o mais freqüente, podendo ser identificado ao longo de todo ano. Nos Estados Unidos, é mais freqüente em alguns períodos: na primavera, indo até o outono (KNOTT et al., 1994; WEINBERG, 2006) ou final do inverno/início da primavera (GLEZEN, 1994). No Brasil, um estudo, realizado na cidade de Porto Alegre, mostrou que a maior incidência do HPIV3 encontrada foi no final do inverno e começo da primavera (STRALIOTTO, 2002). Já em Salvador (BA), o HPIV3, circulou quase o ano todo, sem sazonalidade marcante (MOURA et al., 2003).

Devido a baixa freqüência do HPIV4, ainda não foi possível estabelecer um padrão sazonal deste vírus (WRIGHT, 2005; FRY, et al., 2006).

2.4 Transmissão

A transmissão dos vírus Parainfluenza ocorre principalmente por meio do contato direto com secreções respiratórias, que podem estar presentes em objetos contaminados ou nas mãos de pessoas infectadas; ou pela via respiratória, por inalação de gotículas de secreções eliminadas durante a fala, tosse ou espirros. O vírus é eliminado nas secreções respiratórias de pacientes infectados durante aproximadamente uma semana, embora este período possa variar de acordo com a idade, número de infecções prévias e gravidade da infecção (AITKENS et al., 2001; PIEDRA et al., 1997). Em um estudo, o HPIV3-3 pôde ser recuperado das secreções respiratórias até 38 dias após o início dos sintomas (FRANK et al., 1981). O vírus pode infectar o hospedeiro ao entrar em contato com as mucosas nasal ou ocular (AITKENS et al., 2001; PIEDRA et al., 1997). Este pode permanecer infectante por até 10 horas em superfícies não porosas, como o aço inoxidável, mas tem sobrevivência menor, de até 4 horas, em superfícies absorptivas, como tecidos (BRADY, 1990). Após a contaminação experimental dos dedos com o HPIV3, demonstrou-se que o vírus perdeu mais de 90% de sua infectividade após 10 minutos, o que sugere uma importância menor das mãos na transmissão do que previamente se supunha (ANSARI et al., 1991). O ressecamento de superfícies em que o vírus foi experimentalmente aplicado, apesar de reduzir os índices de recuperação do agente, não eliminou os vírus viáveis (BRADY, 1990).

2.5 Patogênese

A inoculação primária do vírus Parainfluenza ocorre na superfície da mucosa nasal. Os primeiros sintomas incluem rinorréia e são observados depois de dois a quatro dias de incubação. O curso usual da infecção, após a via respiratória superior ser afetada, apresenta uma lenta recuperação, esta enfermidade pode ocasionalmente ser complicada devido a ocorrência de otites. Em casos mais graves a infecção pode atingir a via respiratória inferior, provavelmente devido a aspiração de secreção, provocando bronquiolite ou pneumonia. A viremia é pouco freqüente, contudo este vírus já foi isolado do sangue de crianças com infecção respiratória aguda (VAINIONPÄÄ, HYYPIÄ.1994) .

Em aproximadamente 25% dos casos ocorre envolvimento das vias respiratórias inferiores, 2 a 3% podem vir a se tornar a forma grave de laringotraqueobronquite (crupe). A infecção persistente com replicação viral ativa pode ser demonstrada *in vitro* e *in vivo* (LENNETTE et al., 1999). Os danos celulares causados pela infecção incluem a destruição direta das células pelo vírus e os efeitos da resposta imune que consistem na formação de complexos de antígeno – anticorpo, resposta alérgica devido a Imunoglobulina E (IgE), ativação de células T, ou hipersensibilidade tardia .(VAINIONPÄÄ, 1994). A IgE específica para o Parainfluenza e a histamina provavelmente contribuem para a severidade da doença em crianças (WELLIVER et al., 1982). Múltiplos sorotipos e a curta duração da imunidade após infecção natural tornam a reinfecção comum, sugerindo imunidade parcial (MURRAY et al., 1992).

2.6 Aspectos clínicos

Os vírus Parainfluenza já foram associados a um amplo espectro de doenças respiratórias, com comprometimento das vias aéreas superiores ou inferiores, porém alguns dos seus subtipos têm relação mais freqüente com síndromes específicas. Além disso, as reinfecções costumam ser menos graves que as infecções primárias, que geralmente ocorrem em idades precoces (GLEZEN et al., 1984; HALL, 2001; HENRICKSON, 2003; MEISSNER, 2005). As IVAS (infecções das vias aéreas superiores) são as manifestações mais freqüentes da infecção por Parainfluenza, principalmente em hospedeiros imunocompetentes (crianças ou adultos). Após um período de incubação que varia entre dois e quatro dias, começam os sintomas, semelhantes aos de um resfriado comum: coriza, obstrução nasal, tosse, faringite, febre, que duram cerca de quatro dias. As IVAS têm geralmente resolução espontânea, embora possam evoluir para a otite média (viral bacteriana), sua complicação mais freqüente. Os quatro tipos virais podem ser identificados em pacientes com IVAS (REED et al., 1997; SUBBARAO, 2003; WRIGHT, 2005).

O crupe é a apresentação clínica mais característica dos vírus Parainfluenza. É uma síndrome associada com a inflamação e obstrução da laringe e da traquéia, e se caracteriza clinicamente pela presença de estridor inspiratório, tosse “canina”, dispnéia e rouquidão; atingindo crianças entre os seis meses aos seis anos de idade, com incidência máxima no segundo ano de vida (MARX et al., 1997; BASANTA, 2003; KNUTSON; ARING, 2004). A faixa etária de maior incidência relaciona-se às idades em que o diâmetro das vias aéreas é menor, particularmente na região subglótica, que se torna mais estreita, devido à inflamação e ao edema, levando ao desconforto respiratório e à rouquidão ou afonia (BASANTA, 2003). Os

vírus Parainfluenza são responsáveis por 56 a 75% dos casos de crupe (REED et al., 1997; BASANTA, 2003; HENRICKSON, 2003; SUBBARAO, 2003; WEINBERG, 2006). O crupe é associado principalmente a infecções pelo HPIV1 (MARX et al., 1997; BASANTA, 2003; KNUTSON; ARING, 2004). O HPIV2 também é causa importante de crupe, embora menos freqüente que o HPIV1. Já o HPIV3 é causa esporádica de crupe (PIEDRA et al., 1997). Outros agentes, como o HRSV, os vírus influenza A e B, adenovírus, rinovírus ou *Mycoplasma pneumoniae*, também já foram identificados em crianças com crupe (PELTOLA et al., 2002; BASANTA, 2003; HENRICKSON, 2003; KNUTSON; ARING, 2004).

A traqueobronquite , caracteriza-se por tosse sem grande comprometimento pulmonar. Os Parainfluenzas foram identificados em mais de 25% dos casos, sendo o HPIV3 mais freqüentemente identificado (HENRICKSON, 2003).

Cerca de 90% das bronquiolites é de origem viral .Todos os quatro tipos de Parainfluenza podem causar bronqueolites entretanto, os HPIV1 e 3 são os mais comumente identificados. , Em crianças hospitalizadas, depois do HRSV, o HPIV3 é o segundo causador de bronquiolites (HENRICKSON, 2003).

2.7 Mortalidade

A mortalidade atribuída ao parainfluenza é muito baixa em países desenvolvidos, ocorrendo principalmente em recém nascido, imunocomprometidos ou idosos (HENRICKSON, 2003). Nos países em desenvolvimento, porém , crianças estão sob risco de morte após infecções por parainfluenza, seja pela infecção viral ou infecções bacterianas, as infecções das vias aéreas inferiores (IVAI) causam de

20 a 30% das mortes pré-escolares, e o vírus parainfluenza causam até 10% das IVAI (BERMAN,1991).

2.8 Diagnóstico Laboratorial

A identificação do vírus é muito mais difícil em adultos do que em crianças, provavelmente devido à menor quantidade de vírus eliminada pelos adultos (HENRICKSON, 2003). Os principais espécimes clínicos utilizados para o diagnóstico são os aspirados ou lavados nasofaríngeos e *swabs* de orofaringe e/ou nasofaringe.

Quanto ao método de identificação viral, o isolamento em cultura de células sensíveis ao crescimento do vírus tem sido tradicionalmente considerado o “padrão-ouro” para os vírus respiratórios em geral (HENRICKSON, 2003). A identificação do subtipo viral pode ser realizada por meio das técnicas de imunofluorescência, inibição da hemadsorção ou inibição da hemaglutinação (PIEDRA et al., 1997; HENRICKSON, 2003). A detecção de antígenos virais em espécimes clínicos segundo o método de imunofluorescência indireta (IFI) é mais rápido e de fácil execução, embora apresente níveis menores de sensibilidade para os vírus Parainfluenza, quando comparado ao isolamento em cultura e técnicas de biologia molecular (AGUILAR et al., 2000; KUYPERS et al., 2006).

Nos últimos anos, tem-se dado grande destaque aos métodos moleculares de diagnóstico, por apresentarem boa sensibilidade, especificidade e rapidez, embora tenham um custo mais elevado. Para os vírus Parainfluenza, é realizada a conversão do RNA viral em DNA complementar (transcrição reversa), seguida da amplificação do DNA, permitindo a identificação viral com pequenas quantidades de

material clínico (KARRON et al., 1994; ECHEVARRÍA et al., 1998; OSIOWY, 1998; AGUILAR et al., 2000; HENRICKSON, 2003; TEMPLETON et al., 2004; KUYPERS et al., 2006).

A utilização de oligonucleotídeos desenvolvidos para amplificação de fragmentos de genes altamente conservados do genoma viral possibilita a identificação de diferentes gêneros destes patógenos (EUGENE-RUELLAN et al, 1998), tanto em reações separadas que compartilhem condições de amplificação semelhantes (VAN ELDEN, 2002; WEST, 1999), como pela combinação de múltiplos oligonucleotídeos em uma única reação de amplificação (AGUILAR, 2000; FAN, 1998; GRONDAHL, 1999; OSIOWY, 1998).

Outra técnica utilizada na detecção de viroses respiratórias é o ensaio de RT-PCR realizado por GeneScan (GS-RT-PCR). O GeneScan (GS) é uma técnica de análise de fragmentos de DNA baseada na detecção automática de fluorescência durante eletroforese em capilar, utilizada em procedimentos que requerem muita precisão no tamanho e quantidade do produto de DNA, incluindo seleção e validação de polimorfismos como os SNPs (polimorfismos de base única – *single nucleotide polymorphisms*) , repetições microssatélites, inserções, deleções.

O GS em aplicações de PCR, baseia-se na utilização de um oligonucleotídeos marcado com fluorescência e outro não marcado usado para amplificar um alvo específico que gerará produtos de tamanhos esperados. O produto amplificado é combinado com um padrão molecular (*sizestandard*) e submetido a uma eletroforese em seqüenciador automático de DNA, no qual o produto fluorescente é medido e quantificado. Erdman et al. (2003), utilizou esta técnica combinada com a RT-PCR para o desenvolvimento de um ensaio sensível e específico, capaz de detectar seis

vírus respiratórios diferentes (HRSV, HPIV 1, 2 e 3, e influenza A e B) em amostras clínicas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo permitem tirar as seguintes conclusões:

7.1 Os vírus parainfluenza(HPIV) representam a terceira maior causa de infecção das vias respiratórias inferiores em crianças menores de 5 anos de idade, com índice de 7%, sendo precedido pelo vírus respiratório sincicial (HRSV) e pelo metapneumovírus (HMPV).

7.2 O HPIV-3 se revelou como o tipo predominante entre os três tipos de vírus parainfluenza , ocorrendo em quase todos os meses do ano.

7.3 Os vírus parainfluenza dos tipos HPIV1, HPIV2 e HPIV3 apresentaram distribuição sazonal bem definida, com picos de incidência O HPIV1 circulou no primeiro semestre, maio e abril ; O HPIV2 circulou no segundo semestre, com pico entre outubro e novembro. E por fim a HPIV3 circulou durante o ano inteiro, com pico no mês de outubro (primavera).

7.4 Análise filogenética do HPIV3 apresentou uma epidemiologia, diferendo na mesma comunidade durante o mesmo ano (2007), chegando a apresentar 4 subgrupos distintos.

7.5 As estirpes do HPIV1, ao contrário apresentaram elevada similaridade, que variou de 98,8% a 100%, formando um único subgrupo, que distingue dos demais até agora observados no mundo.

7.6. A genotipagem das amostras de HPIV isoladas neste estudo mostrou a presença de quatro grupos distintos do HPIV 3 circulando, o genótipo do HPIV 1 que é diferente dos outros HPV1 isolados no mundo, colocando-o em um clado único, como se fosse uma característica de amostra brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, E.; HAYDEN, F.G.; MCAULIFFE, J.F.; DE SOUSA, M.A.; MOTA, S.B.; MCAULIFFE, M.I.; GEIST, F.C.; CARVALHO, E.P.; FERNEES, M.C.; GUERRR.L. Acute respiratory viral infection in ambulatory children of urban northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 252-8, 1991.
- AGUILAR, J. C.; PÉREZ-BREÑA, M. P.; GARCÍA, M. L.; CRUZ, N.; ERDMAN, D. D.; ECHEVARRÍA, J. E. Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3 and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1191-1195, 2000.
- AITKEN, C.; JEFFRIES, D. Nosocomial spread of viral disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 3, p. 528-546, 2001.
- ANDREWES, C. H.; BANG, F. B.; BURNET, F. M. Short description of Myxoviruses group (influenza and related viruses). **Virology**, v 1, p. 176-184, 1955.
- ANDREWES, C. H.; BANG, M. B.; CHANOCH, R. M.; ZHDANOV, B. M., Parainfluenza1, 2 e 3: Suggested names for recently described myxoviruses, **Virology**, v 8, p. 129-130, 1969.
- ANSARI, S. A.; SPRINGTHORPE, V. S.; SATTAR, S. A.; RIVARD, S.; RAHAMAN, M. Potencial role of randas in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza 3 and rhinovirus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 184, p.87-92, 1991.
- BARTON, T. D.; BLUMBERG, E. A. Viral pneumonias other than cytomegalovirus in transplant recipients. **Clin. Chest. Med.**, v. 26, p. 707-720, 2005.¹
- BASANTA, M. L. A. Laringitis aguda (crup). **An. Esp. Pediatr.**, v. 1, n. 1, p. 55-61, 2003.
- BOIVIN et al., 2003
- BRADY, M. T. Survival and disinfection of parainfluenza viruses on environmental surfaces. **Am. J. Infect. Control.**, v. 18, n. 1, p. 18-23, 1990.
- CARBALLAL, G.; VIDELA, C. M.; ESPINOSA, M. A.; SAVY, V.; UEZ, O.; SEQUEIRA, M. D.; KNEZ, V.; REQUEIJO, P. V.; POSSE, C. R.; MICELI, I. Multicentered study of viral acute lower respiratory infections in children from four cities in Argentina, 1993-1994. **J. Med. Virol.**, v. 64, p. 167-174, 2001.
- CHANOCK, R. M. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. **J. Exp. Med.**, v. 104, p. 555-576, 1956.
- CHANOCK, R. M. Parainfluenza viruses. In: LENNETTE, E. H; SHIMIDT, N. J. (Ed.). **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. Washington, DC: **APHA**, 1979. p 611-632, 1979.
-

CHANOCK, R. M.; PARROT, R. H.; COOK, K., et al. Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. **N Engl. J. Med.**, v. 258, p. 207-213, 1958.

COLLINS, P.L.; MCINTOSH, K.; CHANOCK, R.M. Parainfluenza Viruses. In FIELDS, B.N. (Ed.). **Filds Virology**, Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 2007. p. 1-34.

CORTEZ, K. J.; ERDMAN, D. D.; PERET, T. C. T.; GILL, V. J.; CHILDS, R.; BARRETT, A. J.; BENNETT, J. E. Outbreak of human parainfluenza virus 3 infections in a hemat 2001.

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

DELAGE, G.; BROCHU, P.; PELLETIER, M.; GASMIN, G.; LAPOINTE, N. Giant-cell pneumonia caused by parainfluenza virus. **J. Pediatr.**, v. 94, p. 426-429, 1979.

DENNY JR., F. W. The clinical impact of human respiratory virus infections. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 152, p. S4-S12, 1995.

DENNY, F. W.; CLYDE, W. A. Acute lower respiratory tract infections in nonhospitalized children. **J. Pediatr.**, v. 108, p. 635-646, 1986.

ECHEVARRÍA, J. E.; ERDMAN, D. D.; SWIERKOSZ, E. M.; HOLLOWAY, B; ANDERSON, L. J. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3 by multiplex PCR for clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1388-1391, 1998.

ERDMAN D.D.; WEINBERG, G.A.; EDWARDS K.M.; WALKER F.J.; ANDERSON B.C.; WINTER J.; GONZÁLEZ M.; ANDERSON L.J. GeneScan Reverse Transcription - PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4298-4303, 2003.

EUGENE-RUELLAN, G.; FREYMUTH, F.; BAHLOUL, C.; BADRANE, H; VABRET, A.; TORDO, N. Detection Of respiratory syncytial virus A and B and parainfluenza virus 3 sequence in respiratory tracts of infants by a single PCR with primers targeted to the L-polymerase gene and differential hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 796-8001, 1998.

FAN, J.; HENRICKSON, K. J.; SAVATSKI, L. Rapid simultaneous diagnoses of infections with respiratory syncytial virus A and B, influenza viruses A and B and human parainfluenza virus types 1, 2 and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hydridization assay (Hexaplex). **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 11397-1402, 1998.

FRANK, A. L. Patterns of shedding of myxoviruses and paramyxoviruses in children. **J. Infect. Dis.**, v. 144, n. 5, p. 433-441, 1981.

FRY, A. M.; CURNS, A. T.; HARBOUR, K.; HUTWAGNER, L.; HOLMAN, R. C.; ANDERSON, L. J. Seasonal Trends of Human Parainfluenza Virus Infections: United States, 1990-2004. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 1016-1022, 2006.

GARCÍA, M. L. G.; RUIZ, J. A.; MAYO, J. E. E.; REY, C. C.; FUENTES, I. P.; GARBIN, M. O.; RIECHMANN, E. R.; BREÑA, P. P. Infecciones por el virus parainfluenza tipo 4. **An. Esp. Pediatr.**, v. 57, n. 2, p. 116-120, 2002.

GARDNER, S. D. The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England serological studies of their prevalence. **J. Hyg.**, v. 67, p. 545-550, 1996.

GLEZEN, W. P.; FRANK, A. L.; TARBER, L. H.; KASEL, J. A. Parainfluenza viruses type 3: seasonality and risk of infection and reinfection in young children. **J. Infect. Dis.**, v. 150, p. 851-857, 1984.

GLEZEN, W. P.; LODA, F. A.; DENNY, F. W. Viral Infections of Humans Epidemiology and Control, 1989.

GRÖNDAHL, B.; PUPPE, W.; HOPPE, A.; KÜNE, I.; WEIGL, J. A. I.; SHIMITT, H. J. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infection by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: Feasibility study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37 (1): p. 1-7, 1999.

HALL, C. B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 25, p. 1917-1928, 2001.

HENRICKSON, K. J. Lower respiratory viral infections in immunocompetent children. In: ARONOF, S. C., (Ed.). **Advances in Pediatric Infectious Diseases**. St Louis: Mosby, 1994. p. 59-96.

HENRICKSON, K. J. Parainfluenza Viruses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, n. 2, p. 242-264, 2003.

IÑIGUEZ, F.; VEGA-BRICEÑO, L.E.; PULGAR, D.; DIAZ, P. C.; SANCHEZ, D. I. Laringotraqueobrinquites en niños hospitalizados: Características Clínicas. **Rev. Chil. Pediatr.**, v. 76, p. 357-362, 2005.

IRMEN, K. E.; KELLEHER, J. J. Use of Monoclonal Antibodies for Rapid Diagnosis of Respiratory Viruses in a Community Hospital. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 396-403, 2000.

IWANE, M.K. *et al.* New Vaccine Surveillance Network. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus e parainfluenza viruses among young children. **Pediatrics**, v. 113, p. 1758-1764, 2004.

JOHNSON, K. M.; CHANOCK, R. M.; COOK, H. K.; HUEBNER, R. J. Studies of a new human hemadsorption virus I. Isolation, properties and characterization. **Am. J. Hyg.**, v. , p. 71-81, 1959.

KARRON, R. A.; FROELICH, J. L.; BOBO, L.; BELSHE, R. B.; YOLKEN, R. H. Rapid detection of parainfluenza virus type 3 RNA in respiratory specimens: use of reverse transcription-PCR-enzyme immunoassay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 2, p. 484-488, 1994.

KIM, M. R.; LEE, H. R.; LEE, G. M. Epidemiology of acute viral respiratory tract infections in Korean children. **J. Infect.**, v. 41, p. 152-158, 2000.

KNUTSON, D.; ARING, A. Viral croup. **Am. Fam. Physician.**, v. 69, n. 3, p. 535-540, 2004.

KUSEL, M. M. H.; DE KLERK, N. H.; HOLT, P.; KEBADZE, T.; JOHNSTON, S. L.; SLY, P. D. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: A birth cohort study. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 8, p. 680-686, 2006.

KUYPERS, J.; WRIGHT, N.; FERRENBURG, J.; HUANG, M. L.; CENT, A.; COREY, L.; MORROW, R. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 7, p. 2382- 2388, 2006.

LAU, S.K.; TO, W.K., TSE, P.W.T, CHAN, A.K.H.; WOO, P.C.Y., TSOI, H.; LEUNG, A.F.Y.; LI, K.S.M.; CHAN, P.K.S.; LIM, W.W.L.; YUNG, R.W.H. Human parainfluenza virus 4 outbreak and role of diagnostic tests **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 9, p. 4515-4521, 2005

LEGG, J. P.; WARNER, J. A.; JOHNSTON, S. L.; WARNER, J. O. Frequency of detection of picornaviruses and seven other respiratory pathogens in infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 24, n. 7, p. 611-616, 2005.

LENNETTE, E. H.; SMITH, T. F. **Laboratory Diagnosis of Viral Infections: Human Parainfluenza Viruses**. 3. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1999, p.665-702.

MARX, A.; TÖRÖK, T. J.; HOLMAN, R. C.; CLARKE, M. J.; ANDERSON, L. J. Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): Biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. **J. Infect. Dis.**, v. 176, n. 6, p. 1423-1427, 1997.

MEISSNER, H. C. Reducing the impact of viral respiratory infections in children. **Pediatr. Clin. N. Am.**, v. 52, p. 695 – 710, 2005.

MIYAO, C. R.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S.; HEIN, N.; PAHL, M. M. C.; BETTA, S. L.; DURIGON, E. L.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; BOTOSSO, V. F.; GOMES, M. C. C. S.; LOPES, C. L. B.; EJZENBERG, B. E.; OKAY, Y. Infecções virais em crianças internadas por infecção respiratória aguda no trato respiratório inferior. **J. Pediatr.**, RJ, v. 75 (5): 334-344, 1999.

MONTO, A. S. The study of respiratory illness. V. Patterns of infection with parainfluenza viruses. **Am. J. Epidemiol.**, v. 97, p. 338-348, 1983.

MONTO, A. S. The Tecumseh study of respiratory illness: V. Patterns of infections with the parainfluenza viruses. **Am. J. Epidemiol.**, v. 97, n. 5, p. 338-348, 2002.

MORRISON-SMITH, J. parainfluenza infections in the elderly. **Br. Med. J.**: p.1976-1982. 1983.

MOSCONA, A.; GALINSKI, M. S. Characterization of human parainfluenza type 3 persistent infection in cell culture. **J. Virol.** v. 64, n. 7, p. 3212-3218, 2005.

MOURA, F. E. A.; BORGES, L. C.; SOUZA, L. S. F.; RIBEIRO, D. H.; SIQUEIRA, M. M.; RAMOS, E. A. G. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n. 4, p. 275-282, 2003.

NASCIMENTO, J. P.; SIQUEIRA, M. M.; SUTMOLLER, F.; KRAWCZUK, M. M.; FARIAS, V.; FERREIRA, V.; RODRIGUES, M. J. Longitudinal study of acute respiratory viruses during four consecutive years. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 33, p. 287-296, 1991.

OSIWOKY, C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3149-3154, 1998.

PELTOLA, V.; HEIKKINEN, T.; RUUSKANEN, O. Clinical courses of croup caused by influenza and parainfluenza viruses. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 21, n. 1, p. 76-78, 2002.

PIEDRA, P. A.; ENGLUND, J. A.; GLEZEN, W. P. Respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. In: RICHMAN, D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G. (Ed.). **Clinical Virology**. (Ed.). New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 787-819.

PORTILLO, C. M.; CRUZ, J. Implementación del método rápido de diagnóstico de virus por inmunofluorescencia en niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas. **Rev. Chil. Pediatr.**, v. 71, n. 1, p. 72-77, 2000.

REED, G.; JEWETT, P. H.; THOMPSON, J.; WRIGHT, P. F. Epidemiology and clinical impact of parainfluenza infections in otherwise healthy infants and young children < 5 years old. **J. Infect. Dis.**, v. 175, n. 4, p. 807-813, 1997.

RODRIGUES, O. G.; ROZOV, T.; SILVA, E. M. K.; KOPELMAN, B. I. Infecções virais em crianças portadoras de doença respiratória aguda, atendidas em um Centro de Saúde Escola, em Belém, Pará, Brasil. **Pediatrics**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 13-20, 2004.

STRALIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MULLER, R. L.; FISCHER, G. B.; CUNHA, M. L. T.; NESTOR, S. M. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 4, p. 283-291, 2002.

SUBBARAO, K. Parainfluenza viruses. In: LONG, S. S.; PICKERING, L. K.; PROBER, C. G. (Ed.). **Principles and practice of pediatric infectious diseases**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. p. 1131-1135,

TEMPLETON, K. E.; SCHELTINGA, S. A.; BEERSMA, F. C.; KROES, A. C. M.; CLAAS, E. C. J. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3 and 4. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 4, p. 1564-1569, 2004.

TENÓRIO, A.; ECHEVARRIA, J. E.; CASAS, I.; TABARES, E. Detection and typing of human multiplex polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.**, v. 44, p. 261-269, 1993.

THOMAZELLI, L.M. Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pela técnica de GeneScan-Rt-PCR. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TSAI, H. P.; KUO, P. H.; LIU, C. C.; WANG, J. R. Respiratory Viral Infections among Pediatric Inpatients and Outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 111-118, 2001.

VAINIONPÄÄ, R.; HYYPIÄ, T. Biology of parainfluenza viruses. **Clinical Microbiol. Rev.**, v. 7, n. 2, p. 265-275, 1994.

VOGEL, J.; SHELOKOV. Adsorption-hemagglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue culture. **Science**, v. 126: p. 358, 1957.

WEINBERG, G. A. Parainfluenza viruses – an underappreciated cause of pediatric respiratory morbidity. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, n. 5, p. 447-448, 2006.

WELLIVER, R.; WONG, D. T.; CHOI, T. S.; OGRA, P. L. Natural history of parainfluenza virus infection in childhood. **J. Pediatr.**, v. 111, p. 180-187, 1982.

WENDT, C. H.; WEISDORF, D. J.; JORDAN, C.; BALFOUR, H. H.; HERTZ, M. I. Parainfluenza virus respiratory infection after bone marrow transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 326, p. 921-926, 1992.

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

ZAMBON, M.; BULL, T.; SADLER, C. J.; GOLDMAN, J. M.; WARD, K. N. Molecular epidemiology of two consecutive outbreaks of parainfluenza 3 in a bone marrow transplant unit. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 8, p. 2289-2293, 1998.