GIULIANA STRAVINSKAS DURIGON

**Bocavírus humano: características clínicas e epidemiológicas em
crianças com sintomas respiratórios agudos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO
2015

GIULIANA STRAVINSKAS DURIGON

**Bocavírus humano: características clínicas e epidemiológicas em
crianças com sintomas respiratórios agudos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

Versão original

SÃO PAULO
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Durigon, Giuliana Stravinskias.

Bocavírus humano: características clínicas e epidemiológicas em crianças com sintomas respiratórios agudos / Giuliana Stravinskias Durigon. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia clínica e molecular.

Versão do título para o inglês: Human bocavirus: clinical and epidemiological characteristics in children with acute respiratory symptoms.

1. Vírus 2. Infecções respiratórias 3. Epidemiologia 4. Pediatria 5. Biologia molecular 6. Diagnóstico I. Durigon, Prof. Dr. Edison Luiz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB083/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Giuliana Stravinskas Durigon.

Título da Tese: Bocavírus humano: características clínicas e epidemiológicas em crianças com sintomas respiratórios agudos.

Orientador(a): Prof. Dr. Edison Luiz Durigon.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE S PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Rua Santa Isabel, 305 4º Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo – SP.
Tel.: (11) 2176-7689 E-mail: eticamedbernadete@santacasasp.org.br

São Paulo, 28 de setembro de 2010.

Projeto nº. 064/09
Informe este número para
identificar seu projeto no CEP

Ilmo. (a). Sr. (a).

Dra. Giuliana Stravinskas Durigon

Departamento de Pediatria

O Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP, em **reunião ordinária**, dia **25/03/09** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **“Vírus respiratórios: Características clínicas, epidemiológicas e meloculares em crianças com infecção respiratória aguda”** emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- ☒ **Aprovado (Inclusive TCLE);**
- ☐ **Com pendências** há modificações ou informações relevantes a serem atendida em 60 dias, (enviar as alterações em duas cópias);
- ☐ **Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);
- ☐ **Não aprovado:** e
- ☐ **Aprovado (inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS - CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias.** Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.

Prof. Dr. Nelson Keiske Ono

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa – ISCMSP

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277900 São Paulo –SP

PABX (11) 21767000 Ramais: 5502/5710 – Fax- 2176.7041 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 06 de fevereiro de 2006.

Projeto nº 389/04
Informe este número para
identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).

Dr.(a). Dr. Rogério Pecchini

Departamento de Pediatria

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, reunido no dia **15/12/2004** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **“Estudo dos agentes virais na etiologia das doenças do trato respiratório em crianças menores de cinco anos assistidas num Hospital de Referência da Cidade de São Paulo: Santa Casa de São Paulo”** emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

☒ **Aprovado (inclusive o TCLE versão);**

☐ **Com pendências** (há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 60 dias, enviar as alterações em duas cópias);

☐ **Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);

☐ **Não aprovado: e**

☐ **Aprovado** (inclusive TCLE -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Prof. Dr. Daniel R. Muñoz

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
ISCMSP

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0025.0.019.000-09	
Projeto de Pesquisa Bocavirus Humano: Características clínicas e epidemiológicas em crianças com sintomas respiratórios agudos.			
Área(s) Temática(s) Especial(s) Não se aplica		Grupo	Fase Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF 29058246892	Pesquisador Responsável Giuliana Stravinskas Durigon	Assinatura	
Comitê de Ética			
Data de Entrega 13/05/2009	Recebimento: Assinatura		

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai,
Edison Luiz Durigon,
por ensinar que os sonhos são passíveis de
realização; basta querer.

Ao meu avô,
Ernesto Durigon
(*in memoriam*)
por ter sempre incentivado o estudo e a busca
por soluções inovadoras.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e meu pai, Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, por ter me guiado durante todas as etapas desse projeto, desde elaboração até a revisão final.

Ao Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e todos que o compõe, pelo apoio no diagnóstico laboratorial das amostras desse projeto de pesquisa.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e à Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, por ter possibilitado a execução desse projeto.

Ao Departamento de Pediatria e Puericultura da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e todos que o compõe, por terem incentivado esse projeto e a pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Eitan Naaman Berezin, pelo constante auxílio na elaboração e execução desse projeto.

À Dra. Danielle Bruna Leal de Oliveira pelo inestimável suporte no processamento, diagnóstico laboratorial e interpretação dos resultados obtidos das amostras clínicas.

À Raquel Caldeira Negrão e ao Dr Luciano M. Thomazelli pelo auxílio no processamento e diagnóstico laboratorial.

Às Dras. Maria Carolina Calahani Felício e Cristiane Finelli, pela participação na execução do protocolo de pesquisa.

À M.^a Juliana Gamo Storni e equipe de Fisioterapia Respiratória do Departamento de Pediatria e Puericultura da Santa Casa de São Paulo, pela participação na coleta de todas as amostras clínicas incluídas nesse estudo.

Às Dra. Samantha Bernal Vollet e fisioterapeuta Juliana Piera e todos da equipe da Unidade de Neonatologia do Departamento de Pediatria e Puericultura da Santa Casa de São Paulo, pelo trabalho na seleção e coleta de amostras e dados clínicos e laboratoriais desse setor.

Ao Dr. Caio César de Melo Freire, pós-doutorando do Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo, pela importante participação na análise estatística dos resultados obtidos.

Aos médicos do Departamento de Pediatria e Puericultura da Santa Casa de São Paulo que auxiliaram em algum momento na execução do protocolo de pesquisa, em especial à Dra. Cláudia Maruyama, Dra. Andressa Simões e Dr. Eduardo Ferone.

Aos médicos da equipe de Infectologia Pediátrica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, em especial Dra. Flávia Jaqueline Almeida, pelo constante apoio durante esses anos de pesquisa.

Às minhas queridas amigas e colegas de trabalho, Dra. Maria Fernanda Bádue Pereira e Dra. Nádia Litvinov, por terem me apoiado de todas as formas durante a elaboração dessa tese.

Aos médicos da equipe de Infectologia Pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas-FMUSP, em especial à Dra. Heloisa Helena de Sousa Marques pelo imenso apoio e incentivo na finalização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Larry J Anderson e Dra. Gayle Fisher Langley do Centers for Disease Control and Prevention – CDC, Atlanta – GA, EUA, por terem me acolhido e auxiliado na análise inicial dos resultados obtidos.

Ao Dr. Dean D Erdman do Centers for Disease Control and Prevention – CDC, Atlanta – GA, EUA, por ter aberto seu laboratório para gentilmente nos receber juntamente com nossas amostras clínicas.

Ao meu namorado, André Bighetti Ordon, pela paciência e carinho durante a difícil etapa de finalização dessa tese.

À minha mãe, Hellen Marta da Silveira Stravinskas Durigon (*in memoriam*), pelo modelo e constante incentivo no aprendizado e busca do conhecimento.

À minha família, em especial aos meus queridos irmãos Pedro Luiz Stravinskas Durigon, Thomas Stravinskas Durigon, Edison Luiz Durigon Jr. e Fabyana Desirre Leal Barros por me apoiarem nos momentos difíceis.

*“Student: Dr. Einstein, aren’t these the same questions as
last year’s [physics] final exam?
Dr. Einstein: Yes; But this year the answers are different.”*

Albert Einstein

RESUMO

Durigon GS. Bocavírus humano: características clínicas e epidemiológicas em crianças com sintomas respiratórios agudos. [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

As infecções respiratórias agudas são responsáveis por elevados índices de morbi-mortalidade em todo o mundo. Enquanto o vírus sincicial respiratório (RSV) permanece como a principal causa de infecção do trato respiratório inferior (ITRI) em crianças jovens, especialmente nas menores de 12 meses, outros vírus, como o metapneumovírus humano, vírus influenza, vírus parainfluenza, adenovírus e bocavírus humano (HBoV) estão também associados. Desde sua descoberta em 2005, diversos autores relataram a presença de HBoV em pacientes, na maioria crianças, com doença respiratória aguda, com prevalência variando de 1,5% a 19% nos diferentes estudos ao redor do mundo. Durante o período de estudo (março de 2008 a setembro de 2010) foram detectadas 153 amostras positivas para HBoV (14%) de 1113 amostras coletadas, sendo sete HBoV positivos na unidade neonatal. Dentre as 926 amostras incluídas de crianças da comunidade, o HBoV ocupou a terceira posição em frequência de vírus respiratórios detectados, sendo superado apenas pelo vírus sincicial respiratório e pelo rinovírus. Além de frequente causa de hospitalização, a infecção por HBoV é potencialmente grave. Foi observado que as crianças positivas para HBoV eram significativamente mais velhas (média idade 9,7 meses), utilizaram mais antibióticos, apresentaram o diagnóstico de pneumonia com maior frequência (independente da presença de outros vírus coinfectantes) e o de bronquiolite com menor frequência do que as crianças negativas para HBoV. No total de HBoV positivos, três crianças foram a óbito. O HBoV circulou ao longo de todos os meses estudados, com maior prevalência nos meses de maio a agosto. Houve uma elevada taxa de codeteção com os demais 20 vírus respiratórios pesquisados nas amostras de crianças originadas da comunidade. Apenas 16% dos bocavírus humanos positivos não estavam associados a outros vírus. Rinovírus, adenovírus e RSV, em ordem decrescente, foram os agentes com maior frequência de codeteção. A análise filogenética das amostras positivas para HBoV, demonstrou que foram detectados apenas HBoV1 nas amostras de secreção respiratória de crianças hospitalizadas por ITRI. Esse achado contribuiu para a consolidação do bocavírus humano tipo 1 como causador de doença respiratória aguda na população pediátrica.

Palavras-chave: Vírus. Infecção respiratória. Pediatria. Epidemiologia. Biologia molecular. Diagnóstico.

ABSTRACT

Durigon GS. Human Bocavirus: Clinical and Epidemiological Characteristics in Children with Acute Respiratory Symptoms. [Ph. D. thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

It is well established that respiratory viruses are an important cause of hospitalizations in young children worldwide. While respiratory syncytial virus (RSV) remains as leading cause of lower respiratory tract infection (LRTI) in young children, especially those under 12 months, other respiratory viruses, such as human metapneumovirus, influenza, parainfluenza, adenovirus and human bocavirus (HBoV) are also present. Since its discovery in 2005, many authors have reported detection of HBoV in patients with acute respiratory infection, mostly children, with prevalence varying from 1.5% to 19% throughout the world. During the study period (March 2008 to September 2010) we detected HBoV in 153 samples (14%) from 1113-screened samples; seven were from the neonatal unit. Among 926 samples included from children with community-acquired infection, HBoV was the third most frequently detected, just after RSV and rhinovirus. Not only was HBoV a frequent cause of hospitalizations, but also a potentially severe disease. Children infected with HBoV were significantly older (mean age 9.7 months), used more antibiotics, had pneumonia more frequently diagnosed (irrespective of presence of other virus coinfection), and bronchiolitis less frequently diagnosed than those negative for HBoV. In all, three children infected with HBoV died. Seasonality of HBoV was characterized by year-round circulation with peaks in months of May through August. There was a high rate of co-detection with the other 20 respiratory viruses screened in samples from the community. Only 16% of the HBoV positives were single infections. Rhinovirus, adenovirus and RSV, in this order, were the most frequently co-detected. Phylogenetic analysis of the HBoV positive samples revealed only HBoV1. This finding contributes to consolidate human bocavirus type 1 as cause of acute respiratory infection in pediatric population.

Keywords: Virus. Respiratory infection. Pediatrics. Epidemiology. Molecular biology. Diagnostics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Relação de publicações de HBoV detectados no Brasil entre 2008 a 2014.....	26
Quadro 2 - Relação dos <i>primers</i> utilizados no PCR em tempo real e convencional, <i>Nested</i> e sequenciamento das amostras.....	35
Figura 1 – Figura representativa da “ <i>Sample sheet</i> ” utilizada na reação da PCR em tempo real para a detecção dos 21 vírus respiratórios. Na figura observa-se que para cada 10 amostras, são necessários 2 placas. A ciclagem e as quantidades dos reagentes utilizados são demonstrados.....	36
Figura 2 - Fluxograma representando a distribuição e resultado de amostras de secreção de nasofaringe coletadas de crianças hospitalizadas com infecção respiratória na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, entre março de 2008 a setembro de 2010.....	41
Figura 3 - Distribuição dos valores de “cycle threshold” (Ct), ou número de ciclos, do produto de amplificação do gene humano da RNase P (RNP) das amostras de secreção de nasofaringe coletadas de crianças hospitalizadas com infecção respiratória aguda na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, entre março de 2008 a setembro de 2010. Cada ponto representa uma amostra. N= 926.....	42
Figura 4 - Árvore filogenética representando as sequências genéticas de HBoV identificados em nosso estudo (BR08_SP e BR09_SP) comparada com sequências de outras 27 regiões geográficas disponíveis na base de dados <i>GenBank</i> . Números em parênteses representam o número de sequências idênticas.....	43
Figura 5 - Representação gráfica da comparação do tempo de hospitalização de lactentes positivos para vírus respiratórios (infectados) com lactentes negativos (não infectados) e dentre os positivos aqueles com infecção simples (monoinfectados) versus os com infecção por múltiplos vírus (coinfectados). N=926.....	46
Figura 6 - Distribuição dos diferentes vírus respiratórios detectados em 809 amostras de ANF positivas para pelo menos um dos vírus respiratórios testados durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na Santa Casa de São Paulo. Valores estão representados em números absolutos. Algumas amostras foram positivas para mais de um vírus.....	47
Figura 7 - Distribuição mensal dos principais vírus respiratórios detectados nos lactentes hospitalizados por IRA em 809 amostras de aspirado de nasofaringe durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na cidade de São Paulo. Valores estão representados em número total de amostras.....	48
Figura 8 - Circulação dos bocavírus humanos detectados nos lactentes hospitalizados por infecção respiratória aguda durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na cidade de São Paulo. O gráfico superior representa o HBoV em relação aos demais vírus respiratórios. O gráfico inferior representa a circulação apenas do HBoV. Os valores estão expressos em número absolutos.....	49

Figura 9 - Representação do número de infecções múltiplas em relação às infecções simples nas amostras positivas para bocavírus humano. Valores estão representados em número total de amostras. N=144.....	50
Figura 10 - Distribuição do padrão de coinfeção das amostras positivas para bocavírus humano em relação ao número de outros vírus diferentes encontrados em cada amostra avaliada. Valores estão representados em número total de amostras. N=144.....	50
Figura 11 - Distribuição dos diferentes vírus respiratórios detectados em 121 amostras positivas para bocavírus com presença de coinfeção. Valores estão representados em números absolutos. Algumas amostras foram positivas para mais de um vírus.....	51
Figura 12 - Distribuição mensal de adenovírus, bocavírus humano e vírus sincicial em relação aos casos de pneumonias totais e pneumonia alveolares. Valores estão representados em número total de amostras.....	58
Figura 13 - Distribuição do número de vírus respiratório detectados por amostra de aspirado de nasofaringe coletados de crianças hospitalizadas na Unidade Neonatal da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo entre março de 2008 a junho de 2009 . Valores estão representados em número total de amostras. N=35.....	59
Figura 14 - Distribuição dos diferentes vírus respiratórios detectados em 35 amostras positivas. Valores estão representados em números absolutos. Algumas amostras foram positivas para mais de um vírus.....	59
Figura 15 - Circulação dos vírus respiratório detectados nas crianças hospitalizadas na Unidade Neonatal da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo entre março de 2008 a junho de 2009 . Valores estão representados em número total de amostras. N=35.....	60
Figura 16 - Circulação e distribuição dos vírus respiratório detectados nas crianças hospitalizadas na Unidade Neonatal da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo entre março de 2008 a junho de 2009 .Valores estão representados em número total de amostras. N=35.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação do número de substituições de nucleotídeos e aminoácidos na região alvo do gene NS1 do bocavirus humano com o número de sequências que apresentam a referida mutação.....	44
Tabela 2 - Distribuição dos valores de “ <i>cicle threshold</i> ” (Ct), ou número de ciclos, das amostras positivas para HBoV coletadas de crianças hospitalizadas com infecção respiratória aguda na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, entre março de 2008 a setembro de 2010.....	45
Tabela 3 - Comparação do tempo de hospitalização de lactentes positivos para vírus respiratórios com lactentes negativos e dentre os positivos aqueles com infecção simples versus os com infecção por múltiplos vírus. N=926.....	46
Tabela 4 - Comparação da idade de lactentes positivos para vírus respiratórios com lactentes negativos e dentre os positivos aqueles com infecção simples versus os com infecção por múltiplos vírus. N=926.....	47
Tabela 5 - Comparação de parâmetros demográficos e clínicos em lactentes positivos para HBoV com lactentes negativos para HBoV hospitalizados na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo durante o período de março de 2008 a setembro de 2010.....	52
Tabela 6 - Características demográficas de crianças positivas para HBoV hospitalizadas na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo por infecção respiratória aguda durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na cidade de São Paulo, Brasil. N=144.....	53
Tabela 7 - Sinais e sintomas clínicos de crianças positivas para HBoV hospitalizadas na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo por infecção respiratória aguda durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na cidade de São Paulo, Brasil. N=144.....	54
Tabela 8 - Características clínicas e laboratoriais de crianças positivas para HBoV hospitalizadas na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo por infecção respiratória aguda durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na cidade de São Paulo, Brasil. N=144.....	55
Tabela 9 - Resultado de coletas de secreção nasofaríngea de lactentes internados na Unidade Neonatal que apresentaram positividade para HBoV. N=6.....	61

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADV: adenovírus
ANF: aspirado de nasofaringe
Ct: “*cicle treshold*”
FLU: vírus influenza
FLU A: vírus influenza A
FLU B: vírus influenza B
FLU C: vírus influenza C
FLUA-pH1N1: vírus influenza A H1N1 pandêmico
FR: frequência respiratória
HBoV: bocavírus humano
HCoV: coronavírus humano
HEV: enterovírus humano
HMPV: metapneumovírus humano
HKU1: coronavírus HKU1
HPIV: vírus parainfluenza humano
HPIV1: vírus parainfluenza tipo 1
HPIV2: vírus parainfluenza tipo 2
HPIV3: vírus parainfluenza tipo 3
HPIV4: vírus parainfluenza tipo 4
HRV: rinovírus humano
HRV A: rinovírus tipo A
HRV B: rinovírus tipo B
HRV C: rinovírus tipo C
HRV S/T: rinovírus sem tipagem definida
IRA: infecção respiratória aguda
ITRI: infecção do trato respiratório inferior
ITRS: infecção do trato respiratório superior
NL63: coronavírus NL63
OC43: coronavírus OC43
PCR: reação em cadeia pela polimerase
RSV: vírus sincicial respiratório humano
UNN: unidade neonatal
UTI: unidade de terapia intensiva
229E: coronavírus 229E

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Panorama geral	20
2.2 Diagnóstico laboratorial dos vírus respiratórios	21
2.3 Bocavírus humano	23
2.3.1 <i>Estrutura e propriedades biológicas</i>	23
2.3.2 <i>Manifestações clínicas</i>	24
2.3.3 <i>Epidemiologia</i>	25
2.3.4 <i>Diagnóstico laboratorial</i>	26
2.4 Considerações finais	29
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Casuística da população estudada	31
4.2 Coleta e processamento das amostras clínicas	33
4.3 Diagnóstico molecular	34
4.3.1 <i>Extração do ácido nucleico total</i>	34
4.3.2 <i>Primers</i>	34
4.3.3 <i>Diagnóstico de 21 vírus respiratório por RT-PCR em Tempo Real (qPCR)</i>	36
4.3.4 <i>Genotipagem e variabilidade genética do HBoV</i>	37
4.3.4.1 <u>Reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR)</u>	37
4.3.4.2 <u>Análise e purificação dos produtos amplificados</u>	38
4.3.4.3 <u>Sequenciamento do gene NS1</u>	38
4.3.4.4 <u>Análise filogenética</u>	39
4.4 Análise estatística	38

5 RESULTADOS	40
5.1 Resultados gerais	40
5.2 Resultados do Grupo A	45
5.3 Resultados do Grupo B	58
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	82
A – ANEXO I Protocolo de vírus respiratórios	82
B – ANEXO II Protocolo de vírus respiratórios UNN	83
C – ANEXO III Termo de consentimento livre e esclarecido	86
D – ANEXO IV Conjunto de amostras idênticas obtidas do alinhamento de 409 nucleotídeos das sequências brasileiras, utilizadas na análise de genotipagem	87

1 INTRODUÇÃO

Está bem estabelecido que os vírus respiratórios são causas importantes de morbidade em lactentes de todo o mundo (1). Um grande esforço tem sido feito para melhorar os métodos diagnósticos na tentativa de identificar os agentes etiológicos responsáveis pelas principais síndrome clínicas respiratórias, como a bronquiolite e a pneumonia viral. Enquanto o vírus sincicial respiratório (RSV) permanece como a principal causa de infecção do trato respiratório inferior (ITRI) em crianças jovens, especialmente nas menores de 12 meses (2), outros vírus, como o metapneumovírus humano, vírus influenza, vírus parainfluenza, adenovírus e bocavírus humano (HBoV) estão também associados às ITRI (3).

Desde sua descoberta em 2005, diversos autores relataram a presença de HBoV em pacientes, na maioria crianças, com doença respiratória aguda, com prevalência variando de 1,5% a 19% ao redor do mundo (4).

Entretanto, as síndromes clínicas causadas pelo HBoV em crianças pequenas e a participação desse vírus como agente causador de infecção respiratória aguda grave, resultando em hospitalizações, não está totalmente esclarecida. Tampouco a importância e divergência de comportamento do HBoV em populações com alguma comorbidade, que estão cada vez mais frequentes em nosso meio.

Este estudo tem como objetivo descrever os achados clínicos e epidemiológicos do HBoV em uma vigilância prospectiva de hospitalizações de lactentes menores de dois anos por infecções respiratórias agudas em um hospital terciário na cidade de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama geral

As infecções respiratórias agudas (IRA) são responsáveis por altos índices de morbi-mortalidade em todo o mundo. Crianças, principalmente lactentes, são altamente susceptíveis à ação dos vírus respiratórios. Apesar da grande maioria das doenças causadas pelos vírus respiratórios serem autolimitadas e restritas ao trato respiratório superior (ITRS), complicações e infecções do trato respiratório inferior (ITRI) como bronquiolite, pneumonia e sibilância são causas de internações na infância (1). Ademais, algumas infecções respiratórias agudas adquiridas precocemente podem levar à sibilância recorrente e asma em indivíduos predispostos e com doença pulmonar crônica (5).

Um grande empenho tem sido empregado na tentativa de aprimorar os métodos diagnósticos capazes de identificar os agentes infecciosos causadores das síndromes clínicas de maior relevância, como a bronquiolite e a pneumonia viral. O vírus sincicial respiratório humano (RSV) é o principal causador de ITRI em crianças abaixo de um ano de idade sendo o principal agente relacionado à bronquiolite (2). Aproximadamente metade das crianças são infectadas até o primeiro ano de vida e 100% das crianças até três anos de idade já apresentaram pelo menos uma infecção pelo RSV (6). No entanto, outros vírus, como o metapneumovírus humano, vírus influenza, vírus parainfluenza, adenovírus e bocavírus humano são responsáveis por doença respiratória aguda no lactente, e, medidas profiláticas visando apenas o vírus sincicial respiratório, apesar de proporcionar um impacto na redução das taxas de morbi-mortalidade, não serão suficientes para prevenir a doença (3).

Atualmente, as estratégias disponíveis para prevenção da infecção respiratória viral aguda são limitadas. Vacinas contra os vírus influenza e imunização passiva com anticorpos monoclonais específicos contra o RSV (palivizumabe) são os métodos mais utilizados e disponíveis, porém ainda não ideais. A eficácia das diversas vacinas contra o vírus influenza em crianças, e, em especial nos lactentes jovens, tem se mostrado muito inferior ao desejável (7,8) e o uso do palivizumabe vem sendo descrito como custo-efetivo apenas em populações de alto risco (9).

Neste cenário onde múltiplos vírus podem causar o mesmo espectro de doenças e os métodos de prevenção e tratamento estão pouco disponíveis, a identificação de situações ou populações de maior risco para doença grave, pode auxiliar na redução da morbidade. Fatores relacionados ao agente e ao hospedeiro desempenham, cada qual, um papel determinante neste processo.

Atualmente, são considerados causadores de doença respiratória aguda em crianças os seguintes vírus respiratórios: vírus sincicial respiratório (RSV), vírus parainfluenza tipo 1, 2 e 3 (HPIV1, HPIV2, HPIV3), vírus influenza A e B (FLUA e FLUB), adenovírus (ADV), coronavírus OC43 e 229E, rinovírus humano, alguns subtipos de enterovírus (enterovírus 68), e, mais recentemente, metapneumovírus humano (HMPV), bocavírus humano (HBoV), vírus parainfluenza tipo 4 (HPIV4), vírus influenza C (FLUC), coronavírus NL63 e HKU1 e os poliomavírus WU e KI. Contudo, alguns vírus apresentam elevadas taxas de codeteção, como é o caso dos rinovírus, enterovírus, bocavírus humano, coronavírus e dos poliomavírus, sendo questionada sua importância na etiologia dessas infecções (3,10).

2.2 Diagnóstico laboratorial dos vírus respiratórios

O diagnóstico etiológico das infecções respiratórias agudas nas crianças permite um uso racional de antimicrobianos, uma vez que a maior parte dessas infecções, tanto do trato respiratório superior como inferior, são de origem viral (3). Os métodos diagnósticos disponíveis atualmente buscam a presença dos vírus mais comumente envolvidos nas infecções em amostras de secreção respiratória, em especial no aspirado da nasofaringe.

O isolamento do vírus por cultura de células ainda é considerado o padrão ouro para diagnóstico das infecções respiratórias, uma vez que é altamente específico e confirma a presença de vírus com capacidade de replicação, e portanto, causador de doença aguda. Entretanto, é um método demasiadamente trabalhoso, que requer estrutura e profissionais que muitas vezes não estão disponíveis nos laboratórios de rotina diagnóstica. Ademais, alguns vírus recém descobertos são de difícil cultivo, como é o caso do bocavírus humano, ou são muito seletivos, como os picornavírus, e dessa forma não são habitualmente identificados por esse método (11).

A detecção de antígenos virais na amostra respiratória através de ensaios imunoenzimáticos (EIA) ou por técnicas de imunofluorescência (IFA), tem sido amplamente utilizada, desde a década de 70, no diagnóstico etiológico das infecções respiratórias agudas. A melhora das técnicas empregadas, com desenvolvimento de placas com capacidade para detecção de múltiplos vírus (multiplex), aumentou a sensibilidade do método e permitiu o diagnóstico de coinfeções. Apesar dos avanços, ainda não estão disponíveis para todos os agentes envolvidos nas infecções. Da mesma forma, a sensibilidade para alguns tipos virais, como os adenovírus e o metapneumovírus humano, é baixa, sendo frequentes os casos de falso negativos (12).

Na mesma linha de detecção antigênica, estão os testes rápidos, que são métodos de fácil execução e que não necessitam de um ambiente laboratorial ou hospitalar para sua realização. Fornecem um diagnóstico em 15 a 30 minutos e são de grande importância no auxílio diagnóstico e terapêutico. Suas desvantagens são: o número limitado de agentes que dispõem de teste rápido (atualmente disponível para os vírus influenza, vírus sincicial respiratório humano e adenovírus); a possibilidade de detecção de apenas um tipo de vírus por amostra coletada; a sensibilidade que muitas vezes é baixa (até 50% para alguns tipos de influenza) permitindo que o teste seja utilizado apenas em épocas de maior circulação viral e o custo ainda elevado (11).

Mais recentemente, a elaboração e aprimoramento das técnicas de biologia molecular, gerou um importante avanço no diagnóstico das doenças virais. A amplificação do ácido nucleico através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) podendo ser realizada quando necessário após a transcrição reversa (RT-PCR), permitiu o diagnóstico de quase a totalidade das infecções causadas tanto por vírus RNA como DNA, de forma rápida (em até quatro horas em alguns ensaios) e altamente sensível e específica (13).

O PCR e suas variações, com sistemas automatizados de extração, amplificação e detecção de ácido nucleico, plataformas para múltiplos agentes (multiplex), ensaios quantitativos ou semiquantitativos, transformou-se em uma importante ferramenta diagnóstica. Associado ao surgimento de equipamentos cada vez menores e mais portáteis e a protocolos de fácil execução, o diagnóstico molecular vem se tornando uma opção custo-efetiva e sendo preferida aos demais métodos (11).

Considerando que nas infecções respiratórias virais em crianças é elevada a taxa de detecção de mais de um tipo de vírus nas amostras clínicas, o uso de PCR multiplex, gerou um aumento no número de codetecções virais. Estudos relatam presença de dois vírus distintos em 21% das amostras, três vírus em 5% e quatro vírus em 2% (14). Os agentes mais envolvidos nas codetecções são os rinovírus, coronavírus e o bocavírus humano.

O grau de participação de cada vírus nos episódios de codetecção ainda não está bem elucidado. Em média, nos adultos, os vírus respiratórios são excretados por até uma semana após o início da infecção. No entanto, já foi demonstrado que lactentes e pacientes imunossuprimidos podem apresentar um período mais prolongado de excreção, chegando a duas ou três semanas, ou até meses em algumas situações (15). Alguns vírus, como o adenovírus e o bocavírus humano podem permanecer por longos períodos na nasofaringe após a primoinfecção, tornando difícil a diferenciação dos quadros agudos e remanescentes.

Na tentativa de separar as coinfeções virais das codeteções, estão sendo empregados alguns métodos quantitativos, nos quais é possível avaliar a carga viral da amostra analisada. Assim, alguns autores consideram que o vírus que apresenta o maior número de cópias é o vírus dominante ou responsável pela infecção atual (16). Outras formas de avaliação utilizam amostras pareadas de sangue e secreção respiratória do paciente, uma vez que é descrito que na primoinfecção ocorre uma viremia inicial, confirmando infecção aguda (17). Estudos sorológicos, com pesquisa de anticorpos do tipo IgM ou aumento progressivo de títulos de anticorpos IgG também podem ser usados para essa finalidade (18).

Alguns pesquisadores descrevem coinfeção viral como fator de risco para gravidade nos quadros de ITRI em lactentes (19), em especial bronquiolite, porém mais estudos são necessários para estabelecer esta relação (20).

2.3 Bocavírus humano

2.3.1 Estrutura e propriedades biológicas

O bocavírus humano (HBoV) pertence à família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Bocavirus*. São vírus arredondados, de simetria icosaédrica, com diâmetro de aproximadamente 25 nm (21). Não envelopados, são compostos por DNA de fita simples e polaridade que pode ser positiva ou negativa, com 5.299 nucleotídeos (22). Uma vez dentro da célula do hospedeiro, o vírus depende das funções celulares para sua replicação, com especial participação da DNA polimerase (4). O genoma do HBoV apresenta três “*open reading frames*” (ORF) ou fases de leitura aberta. A primeira ORF, localizada na extremidade 5’, decodifica duas proteínas não estruturais, NS1 e NS1-70, que funcionam como proteínas multifuncionais, essenciais na replicação do DNA, terminação do ciclo celular e transativação gênica. A segunda ORF, exclusiva do gênero *Bocavirus*, decodifica outra proteína não estrutural, NP1, uma fosfoproteína nuclear envolvida na replicação. Por fim, a terceira ORF, localizada na extremidade 3’, decodifica duas proteínas estruturais do capsídeo viral (VP), denominadas VP1 e VP2. As VPs dos bocavírus apresentam uma similaridade na sequência de aminoácidos de 42-43% em relação aos outros membros do gênero *Bocavirus*, a saber, parvovírus bovino e minute vírus canino (21).

O bocavírus humano foi primeiro descrito em 2005 por Tobias Allander e colaboradores (23), sendo identificado em aspirado de nasofaringe (ANF) de pacientes com doença respiratória aguda. O vírus foi descoberto por rastreamento molecular, uma técnica de amplificação e clonagem randômica de ácido nucléico extraído de secreção da nasofaringe

coletada de indivíduos com doença respiratória aguda, seguida de sequenciamento em larga escala e análise de bioinformática (23). Posteriormente, entre os anos de 2009 e 2010, foram identificadas novas espécies de bocavírus humanos, e, atualmente, o HBoV apresenta quatro espécies distintas baseadas na divergência da VP1, denominadas HBoV1, HBoV2 (subdividido em A e B), HBoV3 e HBoV4 (24).

O padrão de resposta imunológica que ocorre durante uma infecção por HBoV ainda não está totalmente esclarecida. Alguns estudos apontam para um aumento global de citocinas inflamatórias durante a infecção, em especial o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que uma vez elevado, altera o recrutamento de neutrófilos e fagocitose por diminuição da produção de TNF pelo macrófago alveolar, contribuindo para lesão pulmonar (25). A inibição de produção de interferon alfa e beta (IFN α/β) mediada pela NP1, alterando a imunidade inata, pode contribuir na replicação viral e patogênese da infecção (26).

2.3.2 Manifestações clínicas

As principais manifestações clínicas associadas ao HBoV são as infecções do trato respiratório superior e inferior, mais associadas com o HBoV1 e as infecções gastrointestinais, mais associadas com as espécies HBoV2, HBoV3 e HBoV4 (4). Outras manifestações descritas são miocardite, meningoencefalite, otite média aguda e febre sem sinais de localização no paciente imunodeprimido (27-32). O vírus já foi encontrado em quase todos os líquidos corpóreos (sangue, saliva, urina, fezes, secreção respiratória, líquido pleural, líquido cefalorraquidiano e líquido amniótico) e também em amostras de água coletadas do meio ambiente (4). Análises filogenéticas demonstram que o HBoV1 diverge dos HBoV2-4 em maior intensidade do que entre as espécies HBoV2, HBoV3 e HBoV4 divergem entre si (20% *versus* 10% respectivamente). Esse fato permitiu concluir que o HBoV1 provavelmente evoluiu de um patógeno primariamente entérico para um patógeno respiratório (24,33).

O tratamento padrão do HBoV ainda é de suporte clínico, com hidratação, nebulização das vias aéreas e oxigenioterapia. Medidas de profilaxia com vacinas e/ou imunoglobulinas não foram desenvolvidas até o presente momento. Precauções padrão devem ser implementadas nos pacientes hospitalizados com o vírus (34).

2.3.3 Epidemiologia

Desde sua descoberta, diversos autores relataram a presença de HBoV em pacientes, na maioria crianças, com doença respiratória aguda, com prevalência variando de 1,5% a 19% nos diferentes estudos (4). Mundialmente distribuído, apresenta uma soroprevalência de até 96% nos adultos (35). Lactentes, com idade entre seis meses a dois anos, sendo a média de 12 meses de vida, são os mais acometidos pelo HBoV1 (36). Não apresenta uma sazonalidade muito bem definida, ocorrendo circulação de HBoV durante todo o ano, com picos nos meses de inverno e primavera (4,34,37).

No grupo dos HBoV entéricos, o HBoV2 é o mais prevalente, encontrado em até 26% das amostras de fezes de crianças e em 5% de adultos (24).

No Brasil, publicações de diversas regiões, incluindo população pediátrica e adulta, demonstraram uma prevalência do HBoV entre 9-10% (Quadro 1) (27,38-48).

A transmissão do bocavírus humano não está totalmente esclarecida. Acredita-se que, como outros membros da família *Parvoviridae*, a transmissão ocorra através de contato ou inalação de secreções infectadas, como fezes, urina e secreção respiratória (4). A transmissão intra-hospitalar já foi descrita, em especial em unidades fechadas, como unidade de terapia intensiva pediátrica e neonatal, sendo encontrado em aproximadamente 20% dos casos de infecção respiratória nosocomial (36,45).

Logo após sua descoberta, houve um questionamento sobre o papel do HBoV como causador de doença respiratória e gastrointestinal devido às elevadas taxas de codeteção com outros vírus encontradas nas amostras clínicas positivas para HBoV, alcançando 83% de codeteção nas amostras respiratórias e até 100% nas amostras entéricas (4). Esse fato impulsionou o desenvolvimento de outras técnicas diagnósticas além da reação em cadeia pela polimerase (PCR) qualitativa, a fim de comprovar a infecção aguda pelos bocavírus humanos (17,18,49-51).

Quadro 1 – Relação de publicações de HBoV detectados no Brasil entre 2008 a 2014.

Local	N	Idade	Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Laboratorial	Prevalência	Referência
Vitória -ES	162	todas idades Mediana 7 anos	IRA Síndrome Gripal	ANF Real-Time PCR	3,1% (todos < 2 anos)	Martins Junior RB e cols. 2014 (38)
Porto Alegre-RS	260	< 3 anos	ITRI Hospitalizadas	ANF Real-Time PCR	10,4%	da Silva ER e cols. 2013 (39)
São Paulo-SP	598 328: < 11 anos	todas idades	IRA	ANF/ LN Real-Time PCR	1,5% 2,4% (ped)	Caccia ER e cols. 2012 (27)
Salvador-BA	277	< 5 anos	PNM Hospitalizadas	ANF e Sangue: Real-Time PCR Sorologia IgM; IgG e avidéz IgG	ANF: 23% Confirmado agudo: 8%	Nascimento-Carvalho CM e cols. 2011 (40)
Recife-PE	407	< 5 anos	IRA	ANF PCR	18,7%	Bezerra PG e cols. 2011 (41)
Porto Alegre-RS	455	< 2 anos	ITRI	ANF Real-Time PCR	13,2%	Pilger DA e cols. 2011 (42) e 2013 (43)
Ribeirão Preto-SP	1015	< 66 anos Mediana 19,5 meses	IRA	ANF Real-Time PCR	4,8%	Proença-Modena JL e cols. 2011 (44)
São Paulo-SP	511	< 2 anos	IRA Hospitalizadas	ANF PCR	10,7%	Durigon GS e cols. 2010 (45)
Salvador-BA	66	< 2 anos	IRA Hospitalizadas	ANF PCR	6%	Souza EL e cols. 2010 (46)
Rio de Janeiro-RJ	205	< 15 anos	IRA	Swab nasal PCR	3,4%	Albuquerque MCM e cols 2012 (47)
Ribeirão Preto-SP	248	< 5anos	IRA	ANF PCR	10,5%	Gagliardi TB e cols 2009 (48)

Nota: IRA: infecção respiratória aguda; ANF: aspirado de nasofaringe; ITRI: infecção trato respiratório inferior; LN: lavado nasal; PNM: pneumonia; ped: pediátrico; PCR: reação em cadeia pela polimerase.

2.3.4 Diagnóstico laboratorial

A primeira publicação relatando o cultivo do HBoV in vitro ocorreu em 2009 por Dijkman R e colaboradores (22). Os pesquisadores cultivaram com sucesso HBoV1 de amostras de lactentes hospitalizados com ITRI em um modelo de cultura de células de epitélio respiratório humano pseudoestratificado. Foi encontrada replicação efetiva e sustentada e um padrão de transcrição semelhante aos outros membros do gênero *Bocavirus* com todos os RNA mensageiros (mRNA) transcritos de um único promotor, porém com

variações decorrentes de “*splicing*” alternativo e poliadenilação alternativa. Outros autores conseguiram reproduzir o cultivo do HBoV1 em kits comerciais de culturas de células respiratórias humanas (52). As células infectadas pelo vírus apresentaram significativa perda dos cílios e destruição das zonas ocludentes do epitélio. Foi demonstrada uma persistência da infecção por até 50 dias.

Alguns estudos que avaliaram tempo de excreção viral, evidenciaram um período prolongado de excreção do HBoV, com detecção do vírus durante meses, suscitando a hipótese de mecanismos de persistência ou latência do vírus (17,53). Diversos autores validaram essa hipótese, demonstrando persistência do vírus no núcleo de células infectadas de crianças com infecção aguda e evidência de presença e replicação do vírus em fragmentos de biopsias, a exemplo das tonsilas faríngeas e palatinas, de pacientes assintomáticos (54). Estudos que identificaram a presença do HBoV1 e produtos de sua replicação em tonsilas palatinas e faríngeas removidas de crianças assintomáticas, porém com histórico de infecções de vias aéreas de repetição, sugerem que os tecidos linfoides podem ser locais de latência viral (55,56).

Na prática clínica, o diagnóstico laboratorial do HBoV pode ser realizado através de técnicas moleculares, PCR qualitativo e quantitativo, com alvo nos genes NS, NP e VP, em amostras clínicas de pacientes suspeitos de infecção. Atualmente, kits comerciais multiplex para diversos vírus respiratórios já incluem o HBoV (34). Ensaio molecular com capacidade de diferenciar os 4 tipos de HBoV já foram descritos e estão disponíveis (57). Sequenciamento e análise filogenética do vírus permitem uma avaliação da diversidade viral e podem ser utilizadas nas investigações de surtos em unidades fechadas (45).

Os primeiros relatos de HBoV causando doença respiratória aguda em crianças, utilizaram para o diagnóstico confirmatório ensaios de PCR qualitativo em secreção de nasofaringe coletadas dos pacientes suspeitos de infecção (37,58-61).

No entanto, estudos subsequentes que evidenciaram altas taxas de codetecção do HBoV com outros vírus respiratórios, até 83% dos casos, e períodos prolongados de excreção do viral, por até um ano, questionaram o papel do HBoV com agente causador de infecção respiratória (53,62,63).

Desta forma, surgiu a necessidade de outros métodos diagnósticos e avaliação de outros líquidos corpóreos, para melhor correlação da detecção do vírus com doença. A utilização de técnicas quantitativas de real-time PCR permitiu correlacionar carga viral elevada ($>10^4$ cópias/mL) com infecção aguda (14,64). A presença do vírus no sangue de

pacientes infectados somadas às altas cargas virais na nasofaringe foram mais frequentemente encontradas em crianças com primoinfecção e com infecção apenas pelo HBoV1 (17,49).

O diagnóstico sorológico do HBoV foi outra ferramenta utilizada para associar a presença do vírus com infecção. Um dos primeiros estudos utilizando sorologia, demonstrou que em crianças com sibilância aguda e com HBoV detectado em aspirado de nasofaringe por real-time PCR, 49% apresentavam presença de IgM, 73% presença de IgG e 59% presença de IgM e/ou aumento progressivo de títulos de IgG. Naquelas que apresentavam altas cargas virais na nasofaringe e viremia comprovada, 100% tinham evidência sorológica de infecção primária (18).

Posteriormente, ensaios que avaliaram a avidéz de IgG específica contra HBoV, demonstraram boa correlação com infecção aguda, com especificidade de até 99,1% e sensibilidade de até 94,4% (50). Com a descoberta dos outros tipos de bocavírus humanos, HBoV2 - 4, foi evidenciado que os ensaios sorológicos para HBoV1 - 4 eram altamente específicos em relação a outros parvovírus, entretanto, apresentou certo grau de reação cruzada entre o HBoV1 e os HBoV2 - 4 (35).

Mais recentemente, técnicas de detecção de produtos de replicação viral, como o método de real-time RT-PCR com alvo no mRNA do HBoV1, correlacionaram taxas elevadas de carga viral com presença de mRNA, sugerindo infecção aguda pelo HBoV1 (44,54,65). O primeiro estudo publicado utilizando detecção mRNA do HBoV1 para diferenciar casos de infecção aguda com infecção persistente ou latente, foi realizado em Ribeirão Preto, SP, Brasil (44). Outros autores confirmaram essa técnica e demonstraram que em crianças com presença de DNA de HBoV1 na secreção nasofaríngea que estavam assintomáticas *versus* aquelas com sintomas respiratórios, 25% das sintomáticas contra 0% das assintomáticas tiveram detecção de mRNA (65).

Assim, para melhor relacionar a presença do DNA de HBoV1 encontrado em secreção nasofaríngea (ANF) com doença respiratória aguda, pode-se utilizar os seguintes: quantificação de carga viral no ANF evidenciando altos títulos de vírus, presença de viremia do HBoV1 em amostras de sangue pareadas com amostras de ANF, mono-detecção de HBoV1 nas amostras de ANF, evidência de replicação viral com presença de mRNA nas amostras respiratórias e evidência sorológica de infecção aguda (presença de IgM, elevação de títulos de IgG e/ou baixa avidéz de IgG) (4,65).

2.4 Considerações finais

Desde a sua descoberta, o bocavírus humano tem sido pesquisado em diversas partes do mundo. Apesar de um número crescente de estudos publicados, as suas características clínicas e epidemiológicas necessitam de melhor compreensão. Atualmente estão descritos 4 subgrupos distintos de HBoV (1 - 4), sendo o HBoV1 mais associado com os quadros respiratórios. Diversos trabalhos de vigilância epidemiológica, situam o HBoV1 como terceiro ou quarto principal vírus causador de doença respiratória aguda em crianças pequenas que necessitam de hospitalização (4). Uma vez que o comportamento dos vírus respiratórios podem variar conforme região geográfica, estudos de vigilância clinico-epidemiológica regionais são fundamentais para avaliar o grau de importância do HBoV em nosso meio.

3 OBJETIVOS

- 1) estimar, em estudo longitudinal, a contribuição relativa do bocavírus humano (HBoV) como agente etiológico de infecção respiratória aguda (IRA) em crianças atendidas em hospital universitário da cidade de São Paulo;
- 2) descrever as características clínicas dos lactentes infectados com o HBoV e sua relação com os demais vírus respiratórios estudados;
- 3) definir a distribuição sazonal do HBoV em comparação com os principais vírus respiratórios humanos e a qual frequência de codetecção com esses vírus;
- 4) diferenciar a variação genética do HBoV mediante análise filogenética das estirpes isoladas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística da população estudada

Foi realizado um estudo prospectivo de vigilância de infecção respiratória aguda (IRA) em crianças menores de 24 meses internadas no Departamento de Pediatria e Puericultura da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP), durante o período de 1 de março de 2008 a 30 de setembro de 2010. Os pacientes foram divididos em dois grupos distintos: A e B.

Grupo A: eram elegíveis os pacientes menores de 24 meses de vida que foram hospitalizados por infecção respiratória aguda no período de 1 de março de 2008 a 30 de setembro de 2010 e que apresentavam no momento da admissão sinais e sintomas de infecção do trato respiratório inferior, incluindo história de tosse e/ou desconforto respiratório e/ou que apresentavam um ou mais dos seguintes diagnósticos clínicos atribuídos pela equipe médica responsável pela internação: bronquiolite, pneumonia alveolar e não alveolar, sibilância ou broncoespasmo, laringotraqueobronquite, síndrome coqueluchoide, coqueluche, cianose e apneia.

Grupo B: eram elegíveis lactentes maiores que sete dias de vida que encontravam-se internados na unidade neonatal (UNN) desde o nascimento, e que apresentavam sinais e sintomas compatíveis com infecção respiratória aguda ou que estivessem sob ventilação mecânica, no período entre 1 de março de 2008 a 30 de junho de 2009.

Para cada criança do grupo A incluída no projeto, foi coletada uma amostra de aspirado de nasofaringe. Foram incluídas na análise crianças com amostras coletadas em até sete dias da internação hospitalar. Um caso foi considerado associado a determinado vírus respiratório quando detectado por reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os indivíduos selecionados poderiam ser incluídos mais de uma vez durante o período de estudo, contanto que cada inclusão representasse um novo episódio respiratório agudo. O tempo de início dos sintomas não foi considerado como critério de inclusão ou exclusão. As definições utilizadas para os diagnósticos clínicos incluídos no estudo seguiram as referências tradicionalmente aceitas na literatura (66,67).

No grupo B, semanalmente, foram identificadas as crianças na unidade neonatal que preenchiam os critérios de inclusão e coletadas as amostras de ANF por uma fisioterapeuta respiratória. Assim como no grupo A, um caso foi considerado associado a determinado vírus respiratório quando detectado por reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os indivíduos selecionados poderiam ser incluídos mais de uma vez durante o período de estudo enquanto as

condições clínicas preenchessem os critérios de inclusão, não havendo limite de número total de amostras coletadas.

Aos pais ou responsáveis pelos pacientes elegíveis, foi oferecida participação na pesquisa e explicado o procedimento de coleta de aspirado de nasofaringe para obtenção da amostra clínica. Foi obtido termo de consentimento livre e esclarecido dos que concordaram em participar.

Foram excluídos os pacientes cujos responsáveis não assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e cujas amostras clínicas não foram obtidas ou foram coletadas após sete dias da data de admissão hospitalar, este último apenas no grupo A.

Nos pacientes incluídos no grupo A, um questionário contendo informações sobre sinais e sintomas na admissão hospitalar, antecedentes pessoais relevantes, antecedentes familiares, situação vacinal, permanência em creche e contato com outras crianças, tempo de aleitamento materno, dados antropométricos, condições de moradia e outras informações cabíveis foi realizado com os pais ou responsáveis e complementado com dados do prontuário médico. Dados da internação como tempo de hospitalização, necessidade e tipo de antibioticoterapia, suplementação de oxigênio, necessidade de terapia intensiva e/ou ventilação mecânica foram coletados do prontuário. Resultados de exames laboratoriais realizados no momento da admissão, a saber, hemograma completo, hemocultura, proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação, foram registrados. Quando disponíveis, foram avaliadas as radiografias simples de tórax e classificadas nos diagnósticos pré-estabelecidos conforme padronização realizada previamente com os membros da equipe do estudo. O questionário completo encontra-se no Anexo I.

Nos lactentes incluídos no grupo B, foi aplicado um questionário contendo informações sobre a gestação materna e parto, complicações perinatais, sinais e sintomas do trato respiratório, sinais e sintomas de infecção aguda, necessidade e tipo de antibioticoterapia, suplementação de oxigênio, necessidade de terapia intensiva e/ou ventilação mecânica e exames laboratoriais e de imagem relacionados ao quadro respiratório. As informações foram coletadas do prontuário médico. O questionário completo encontra-se no Anexo II.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (Até 2009 associado ao projeto número 389/04 e posteriormente sob o projeto número 064/09) e da Universidade de São Paulo (ICB Projeto número 932/ CAAE 0025.0.019.000-09). O termo de consentimento livre e esclarecido encontra-se no Anexo III.

4.2 Coleta e processamento das amostras clínicas

As amostras do grupo A foram coletadas de segunda a sexta-feira entre 8:00h e 12:00h da manhã durante todo o período de estudo. Todos os pacientes que se encontravam na Unidade de Retaguarda da Pediatria da ISCMSP e que preenchiam os critérios de inclusão eram elegíveis. Excepcionalmente, lactentes elegíveis que se encontravam em outras enfermarias do Departamento de Pediatria, a saber Unidade de Internação (Enfermaria do quarto andar) e as unidades de terapia intensiva (UTI) pediátrica, foram incluídos na pesquisa.

As amostras do grupo B foram coletadas semanalmente nas terças-feiras entre 13:00h e 17:00h da tarde durante todo o período de estudo. Todos os que pacientes que encontravam-se na Unidade Neonatal da ISCMSP e que preenchiam os critérios de inclusão eram elegíveis.

A coleta de secreção respiratória em ambos os grupos foi realizada por duas fisioterapeutas participantes da equipe de pesquisa, através da aspiração da nasofaringe preferencialmente durante a sessão de fisioterapia respiratória. Foi introduzida uma sonda própria para aspiração nas narinas dos pacientes até atingir a nasofaringe. O conteúdo era aspirado para um frasco sem conservantes. Quando o paciente apresentava pequena quantidade de secreção, foi instilado soro fisiológico 0,9%, na quantidade de 1 mL em cada narina, antes do procedimento de aspiração.

Os aspirados de nasofaringe (ANF) foram mantidos sob refrigeração (4 - 6 °C) por até cinco horas, para serem posteriormente subdivididos em três criotubos com capacidade de 1,5 mL cada, e, armazenados em um recipiente contendo nitrogênio líquido. As amostras foram encaminhadas semanalmente ao Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM) do Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB II) da Universidade de São Paulo, onde permaneceram armazenadas a uma temperatura de - 70 °C até o momento de uso.

Todas as amostras recebidas e armazenadas no LVCM do ICB II, foram levadas ao *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC, Atlanta – GA, EUA, onde foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR) para detecção dos seguintes vírus respiratórios: vírus sincicial respiratório humano A e B (RSV A e B), vírus influenza A, B e C (FLUA, FLUB e FLUC), vírus parainfluenza 1, 2, 3 e 4 (HPIV-1, -2, -3, -4), metapneumovírus humano (HMPV), coronavírus (HCoV -229E; -OC43; -HKU1; -NL63), adenovírus (ADV), bocavírus humano (HBoV-1, -2, -3 e -4), rinovírus (HRV) e enterovírus respiratórios (HEV). Todas as amostras foram testadas para o gene humano RNase P (RNP), que tem como finalidade verificar a qualidade do espécime e a performance da extração. As amostras positivas para bocavirus por qPCR foram submetidas ao sequenciamento de

nucleotídeos pelo método de SANGER. As amostras obtidas entre janeiro de 2009 a setembro de 2010 foram avaliadas para a presença de vírus influenza A pandêmico H1N1 no próprio LVCM.

4.3 Diagnóstico molecular

4.3.1 Extração do ácido nucleico total

A extração do material genético viral, foi realizada com o Nuclisens® Iso Kit (TL) (BioMerieux, Lyon, France) que extrai ácido nucleico total (DNA/RNA), de 24 amostras em 45 minutos com o protocolo “*on-board*”, seguindo as instruções do fabricante. Obtivemos um volume final de 210 µL de ácido nucléico total extraído.

Suscintamente, na alíquota de 1 mL contendo amostra e tampão de lise (TL) e após 15 minutos em temperatura ambiente (TA) para a lise celular e exposição do ácido nucleico, foi acrescido à mistura 50 µL de Sílica Magnética, que sobre condições de elevadas concentrações de sal, ligaram-se aos ácidos nucléicos. Estas partículas de sílica, atuam como fase sólidas e os componentes que não continham ácidos nucléicos foram removidos através de várias etapas de lavagens efetuadas no extrator automático *Nuclisens EasyMag* (BioMerieux, Lyon, France). Por último, os ácidos nucléicos foram eluídos da fase sólida, com um tampão de eluição denominado *Nuclisens Eluition Bufffer* (BioMerieux, Lyon, France). O eluído, contendo RNA e DNA total, foi armazenado em freezer -70 °C, até o momento da sua utilização.

4.3.2 Primers

Para a detecção dos 21 vírus respiratórios, incluindo HBoV dos 4 tipos (1, 2, 3 e 4) pelas técnicas de qPCR e PCR convencional, foram utilizados os *primers* do painel de vírus respiratório do CDC, previamente publicados (68-75) (Quadro 2).

Quadro 2 - Relação dos *primers* utilizados no PCR em tempo real e convencional, *Nested* e sequenciamento das amostras.

Primer	Sequencia (5' > 3')	Amplicon (nt)	utilização	Proteína alvo	Referência
HMPV_fw HMPV_rev HMPV_sonda	CAA GTG TGA CAT TGC TGA YCT RAA ACT GCC GCA CAA CAT TTA GRA A TGG CYG TYA GCT TCA GTC AAT TCA ACA GA	90	qPCR	F	Kodani e cols. 2011(69)
RSV_fw RSV_rev RSV_sonda	GGC AAA TAT GGA AAC ATA CGT GAA TCT TTT TCT AGG ACA TTG TAY TGA ACA G CTG TGT ATG TGG AGC CTT CGT GAA GCT	100	qPCR	M	Fry e cols. 2007(70)
HPIV1_fw HPIV1_rev HPIV1_sonda	ACA AGT TGT CAA YGT CTT AAT TCR TAT TCG GCA CCT AAG TAR TTY TGA GTT ATA GGC CAA AGA "T"TG TTG TCG AGA CTA TTC CAA	128	qPCR	H/N	Morgan e cols. 2013(74)
HPIV2_fw HPIV2_rev HPIV2_sonda	GCA TTT CCA ATC TAC AGG ACT ATG A ACC TCC TGG TAT AGC AGT GAC TGA AC CCA TTT ACC "T"AA GTG ATG GAA TCA ATC GCA AA	96	qPCR	H/N	
HPIV3_fw HPIV3_rev HPIV3_sonda	TGG YTC AAT CTC AAC AAC AAG ATT TAA G TAC CCG AGA AAT ATT ATT TTG CC CCC RTC TG"TT" TGG ACC AGG GAT ATA CTA CAA A	200	qPCR	H/N	
HPIV4_fw HPIV4_rev HPIV4_sonda	CTG CCA AAT CGG CAA TTA AAC CTG GCA GCA ATC ATA AGR TGA TTC CA TTA TTA TCT CTG C"TT" TCC TTA CAG GCC ACA TCA	100	qPCR	N	
229E_fw 229E_rev 229E_sonda	CAG TCA AAT GGG CTG ATG CA AAA GGG CTA TAA AGA GAA TAA GGT ATT CT CCC TGA CGA CCA CGT TGT GGT TCA	82	qPCR	N	Dare e cols. 2007(68)
OC43_fw OC43_rev OC43_sonda	CGA TGA GGC TAT TCC GAC TAG GT CCT TCC TGA GCC TTC AAT ATA GTA ACC TCC GCC TGG CAC GGT ACT CCC T	82	qPCR	N	
NL63_fw NL63_rev NL63_sonda	GAC CAA AGC ACT GAA TAA CAT TTT CC ACC TAA TAA GCC TCT TTC TCA ACC C AAC ACG CT"TT" CCA ACG AGG TTT CTT CAA CTG AG	128	qPCR	N	
HKU1_fw HKU1_rev HKU1_sonda	CCT TGC GAA TGA ATG TGC T TTG CAT CAC CAC TGC TAG TAC CAC TGT GTG GCG GTT GCT ATT ATG TTA AGC CTG	125	qPCR	Pol	Woo e cols. 2005(75)
ADV_fw ADV_rev ADV_sonda	GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT TG CAC CAG ACC CGG GCT CAG GTA CTC CGA	150	qPCR	Hexon	Heim e cols. 2003(73)
HRV_fwa HRV_fwb HRV_rev HRV_sonda	CY[A] GCC [T]GC GTG GC CY[A] GCC [T]GC GTG GT GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C	90	qPCR	Pol	Lu e cols. 2008(72)
HEV_fw HEV_rev HEV_sonda	GGT GGC TGC GTT GGC GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C	144	qPCR	Pol	CDC, Não publicados
HBoV_fw HBoV_rev HBoV_sonda	TGC AGA CAA CGC YTA GTT GTT T CTG TCC CGC CCA AGA TAC A CCA GGA TTG GGT GGA ACC TGC AAA	164	qPCR	NS1	Lu e cols. 2006(71)
RNP3_fw RNP3_rev RNP3_sonda	CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG CC CCA GTC TCT GTC AGC ACT CCC TTC	~86*	qPCR	RNAse P	CDC, Não publicados
FLU C	Sob pedido do CDC	89	qPCR	M	CDC, Não publicados
HBoV_F1 HBoV_R1	ACGGCCAGTGTCTGAACACTC AAACAGCTATGACAGGCGTTGTC	459	PCR	NS1	CDC, Não publicados
HBoV_F2 HBoV_R2	TTAACGACTGCAGACAACGCCTG ATACAAATCCTTTGTTCAAATG	419	NESTED e SEQ		

Nota: HMPV indica metapneumovírus; RSV: vírus sincicial respiratório; HPIV1-4: vírus parainfluenza 1-4; 229E, OC43, NL63 e HKU1: são tipos de coronavírus; ADV: adenovírus; HRV: rinovírus; HEV: enterovírus; HBoV: bocavírus humano; FLU C: influenza C; RNP: gene humano da RNAse P; fw: “forward”; rev: “reverse”; qPCR: PCR em tempo real; SEQ: sequenciado; *marcado B- 5'FAM, 3'BHQ1; F: fusão; M: matriz; H/N: hemaglutinina/neuroaminidase; N: nucleoproteína; Pol: polimerase; NS1: proteína não estrutural.

4.3.3 Diagnóstico de 21 vírus respiratório por RT-PCR em Tempo Real (qPCR)

Cada amostra foi amplificada, a partir do DNA/RNA extraído no item 4.3.1, pela técnica de PCR em tempo real objetivando a detecção do HBoV1 - 3 e os outros vírus respiratórios, a saber, RSV, ADV, HMPV, HPIV1 - 4, HCoV (229E, OC43, NL63, HKU1), HRV, HEV, FLU (A, B, C, A-pandêmico H1N1) separadamente como demonstrado na Figura 1, seguindo os protocolos previamente publicados (68-75). Para a detecção de influenza A, B e A-pandêmico H1N1, foi utilizado o *Kit LightCycler® 480 Probes Master* (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) juntamente 0,5 µL de cada *primer* [40 µM] (*forward* e *reverse*) e sonda [10 µM] do *Kit Influenza A(H1N1) Primer and Probe Set Invitrogen* (Carlsbad, CA, USA). O diagnóstico de influenza C foi realizado por RT-PCR em tempo real utilizando *primers* cedidos pelo CDC (Quadro 2).

Operator: _____
 Date: _____
 Study: Sta Casa - Respiratory Virus
 Kit: AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit (7615-7648)
 Kit lot No.: _____ Outdate: _____

No. of samples: 13 X 13 tubos

	temp	duration	# cycles
cycle 1	45	10 min	1
cycle 2	95	10 min	1
cycle 3	95	15 sec	45
	55	1 min	collect

component	con.	ul/rxn	ul/mix
RNAse free H ₂ O		5	65
Buffer	2x	12.5	162.5
Forward primer	50X	0.5	6.5
Reverse primer	50X	0.5	6.5
Probe	50X	0.5	6.5
Enzyme	25x	1	13
		Vol.: 20	260
		Template: 5	

Instrument: _____ Distribuir 10µL do mix em cada orifício correspondente (horizontal), contendo 5µL de amostra correspondente (vertical)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	HRV*	1º tubo
B	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	RSV*	2º tubo
C	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	229E*	3º tubo
D	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	OC43*	4º tubo
E	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	HKU1*	5º tubo
F	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	NL63*	6º tubo
G	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	Flu A	7º tubo
H	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	Flu B	8º tubo

Instrument: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	HPIV1*	9º tubo
B	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	HPIV2*	10º tubo
C	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	HPIV3*	11º tubo
D	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	HPIV4*	12º tubo
E	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	MPV*	13º tubo
F	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	ADV*	14º tubo
G	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	HEV*	15º tubo
H	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Neg	RNP	16º tubo

Figura 1 – Figura representativa da “Sample sheet” utilizada na reação da PCR em tempo real para a detecção dos 21 vírus respiratórios. Na figura observa-se que para cada 10 amostras, são necessários 2 placas. A ciclagem e as quantidades dos reagentes utilizados são demonstrados.

As reações foram realizadas utilizando o *AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit* (Ambion, California, USA), onde 5 µL do DNA/RNA extraído foi acrescido de 0,5 µM de *primers forward* e *reverse*, 0,1 µM de sonda e 1 unidade de enzima e água para completar 20 µL da mistura de reação obtendo o volume final de 25 µL conforme instruções do fabricante. A

amplificação foi realizada num equipamento *Stratagene Mx3000p (Agilent Technologies)* sob as condições da termociclagem que consistiram de um ciclo de 45 °C por 10 minutos para a produção de cDNA utilizado na detecção dos vírus de RNA, utilizados na avaliação de coinfeções, seguido de 1 ciclo de 95 °C por mais 10 minutos para ativação da *iTaq DNA polymerase* e 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, seguido de 1 minuto a 55 °C para a coleta da fluorescência. Foi considerado positivo todas as amostras que obtiveram um “*cycle threshold*” (Ct) menor que 40.

4.3.4 Genotipagem e variabilidade genética do HBoV

4.3.4.1 Reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR)

Todas as amostras testadas previamente para HBoV por qPCR, foram posteriormente testadas pela técnica de *nested* PCR objetivando a detecção dos quatro tipos virais de HBoV, visto que o qPCR utilizado no item 4.3.3 só detectam os tipos 1 e 3 deste vírus. A PCR do HBoV foi efetuada com dNTPs, tampão de PCR e Taq *Polymerase* de procedência da Roche *Life Sciences Taq polymerase kit*.

Resumidamente, 50 µL de reação foi preparada utilizando 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (1 µL), 5 µL de tampão de reação [10X], 10 pM de cada iniciador (“*forward e reverse*”) (1 µL de cada), 1,5 µL de MgCl₂ a [50 mM], 10 mM de dNTP (1 µL) e água livre de nuclease para completar 40 µL de mix na PCR e 48 na *NESTED* acrescido de 10 µL do DNA extraído no item 4.3.1 na PCR e 2 µL da PCR na *Nested*.

As amostras foram amplificadas em termociclador automático (*GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems Inc., EUA*), a partir de uma etapa a 94 °C por 2 min., seguida de 35 ciclos na PCR (30 ciclos na *NESTED*) a 95 °C por 30 segundos para desnaturação das fitas; 50 °C (55 °C para *NESTED*) por 30 seg. para o “*annealing*” dos primers e 72 °C por 45 seg. para extensão seguida de uma etapa final de 72 °C por 7 min. para completar a extensão. Como controle positivo, foi utilizado um plasmídeo modificado que contém inserido em seu genoma as sequências alvo correspondente aos 21 vírus estudados. Como controle negativo foi utilizado água DEPEC. Os produtos amplificados foram estocados a 4 °C até o próximo procedimento.

4.3.4.2 Análise e purificação dos produtos amplificados

A detecção do produto amplificado foi realizado por eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL[®]) a 2% em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato, 1 mM de EDTA [pH 8.0]) e 0,5 µg/mL brometo de etídeo. Uma alíquota de 10 µL da amostra misturados com 2 µL de azul de bromofenol (*loading buffer*) foi submetida à eletroforese em cuba horizontal (Gibco BRL[®]), imerso em tampão TBE (1x concentrado) durante 40 minutos a 100 V. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta (*MacroVue UV-20 HOEFER*). Foram considerados positivos todas as amostras que tiveram, após amplificação do produto alvo, fragmento equivalente a 419 pares de bases (pb).

A PCR e NESTED fizeram uso de *primers*, dNTPs e taq DNA polimerase para produzir múltiplas cópias de uma sequência de DNA específica. Quando a reação terminou, a maior parte dos *primers* e dNTP permaneceram intactas, e, se não retirados, iriam interferir no sequenciamento. Então, a purificação dos produtos da PCR foi realizada com o kit ExoSap (*exonuclease I – Amersham Pharmacia Biotech*), onde as enzimas Exonuclease I (*Exo I*) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) removeram estes materiais indesejados com a adição de 2 µL de enzima (*Exo/SAP*) em 5 µL de PCR, correspondendo de 1 a 10 ng, e 13 µL de H₂O *UltraPure Gibco[®]*, completando o volume pra 20 µL de material a ser purificado. A reação foi realizada em termociclador a 37 °C por 15 minutos, seguido de 80 °C por 15 minutos, para inativação da enzima.

4.3.4.3 Sequenciamento do gene NS1

Após a purificação as fitas de DNA foram sequenciadas utilizando-se o kit “*ABI PRISM DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit*” (“*Big Dye*” - *Applied Biosystems, Inc., EUA*), seguindo as instruções do fabricante.

Foram utilizados para o sequenciamento dos *amplicons* os *primers* descritos no Quadro 2. Cerca de 5 µL, correspondendo de 10 a 30 ng do produto purificado, foram adicionados a um microtubo com 5 pmol de *primer Forward ou reverse* (1 µL) e 2 µL do “*Terminator ready reaction Mix (Big Dye)*”, 2 µL do tampão de sequenciamento (*save money - Tris HCl 200 mM [pH 9,0] e 5 mM MgCl₂*) e água Milli-Q[®] para completar um volume final de 10 µL. Todas as reações foram feitas em triplicatas, sendo uma das reações de sequenciamento com *primer forward* e duas para o *primer reverse*.

A extensão enzimática foi realizada em placa de 96 orifícios, sendo que 90 orifícios eram amostras, três eram controles positivos e três negativos. Toda reação foi

realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 durante 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos para a desnaturação do DNA molde, 50 °C por 10 segundos para o “*annealing*” dos *primers* e 60 °C por quatro minutos para a extensão da fita.

O produto obtido foi purificado, visando a remoção de excesso de dideoxinucleotídeos terminadores presentes na reação com a utilização do kit *Centri Sep 96 (Princeton Separations INC., USA)*, conforme instruções do fabricante e submetidos imediatamente à eletroforese em polímero POP6, utilizando sequenciador automático ABI modelo 3100 (*Applied Biosystems, Inc., EUA*).

4.3.4.4 Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas e editadas utilizando o programa Sequencher 4.8 (*Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan – USA*) e alinhadas utilizando o programa Meg Align™ 4.05 (*Expert Analysis Software - DNASTAR, Inc., EUA*), tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as sequências, calculadas par a par, o que possibilitou a identificação das sequências de nucleotídeos idênticas e suas subsequentes tipagens. A análise filogenética foi realizada pelo critério de máxima verossimilhança (MV), utilizando-se o modelo evolutivo F84. Foi realizada uma busca heurística com algoritmo TBR (bissecção de árvore – “*tree bisection reconnection*”) resultando em uma árvore de topologia não enraizada com valores de *bootstrep*.

4.4 Análise estatística

A análise descritiva foi realizada utilizando distribuições ou taxas de frequências. Para a comparação entre as variáveis categóricas foram utilizados os testes de χ^2 e/ou teste exato de Fischer, nas associações entre as características clínicas e demográficas. Para as variáveis contínuas, como idade e dias de hospitalização, foram utilizados o Teste de Wilcoxon (“*Wilcoxon signed rank*”) uma vez que a amostra não estava em distribuição normal. Foram avaliadas algumas associações de vírus respiratórios resultando em pneumonia, utilizando uma ferramenta estatística de associações através de análises de afinidade, que permite identificar padrões ou tendências em bases de dados que contém muitas informações, denominada aRules (76). Para avaliar as regras no aRules nós utilizamos suporte mínimo de 1% e confiança mínima de 30%. As análises estatística foram realizadas utilizando o “*software*” de estatística R, que inclui o pacote aRules (77). Foi considerada significância estatística quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados gerais

Foram coletadas 1113 amostras de secreção nasofaríngea de crianças menores que 24 meses com doença respiratória aguda internadas na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo durante o período total de estudo. Do total de 1113 amostras, 957 pertenciam ao grupo A (crianças da comunidade hospitalizadas com quadro respiratório agudo) e 156 ao grupo B (berçário). Foram excluídas 31 amostras do grupo A por não possuírem resultados completos de detecção de vírus respiratórios. Conforme estabelecido nos critérios de inclusão, um indivíduo poderia ser incluído mais de uma vez durante o período de estudo, contanto que cada inclusão representasse um novo episódio respiratório agudo (no caso do grupo A) ou enquanto as condições clínicas preenchessem os critérios de inclusão (no caso de grupo B), não havendo limites de número total de amostras coletadas. A distribuição das amostras está representada no fluxograma da Figura 2.

O tempo referido de início dos sintomas não foi considerado para inclusão das amostras. Entretanto, nos episódios nos quais essa informação estava disponível (n=124; todas do grupo A), 88,7% das amostras haviam sido coletadas em até sete dias do início dos sintomas, sendo possível supor que a maioria dos episódios eram infecções agudas.

Uma vez que no grupo A o objetivo era avaliar infecções virais comunitárias, foram incluídas amostras que haviam sido coletadas em até sete dias da data da admissão hospitalar. Dessas, apenas 60 foram obtidas após 48 horas de hospitalização e a maior parte (81,4%) foi coletada em até 24 horas da admissão na enfermaria.

A Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, é um hospital terciário situado na região central da cidade. Recebe uma população referenciada de seus múltiplos ambulatorios de especialidades pediátricas e de outros serviços de menor complexidade da região. Entretanto, mantém uma demanda espontânea que contempla casos de todos os graus de complexidade, o que justifica o perfil da população estudada.

Figura 2 - Fluxograma representando a distribuição e resultado de amostras de secreção de nasofaringe coletadas de crianças hospitalizadas com infecção respiratória na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, entre março de 2008 a setembro de 2010.

Objetivando confirmar a uniformidade das amostras coletadas a fim de assegurar que as comparações entre elas são confiáveis, foi avaliada a quantidade de gene humano que codifica uma RNase P (RNP), através da técnica de qPCR. Foi observado que as amostras eram extremamente uniformes conforme representado na Figura 3.

Figura 3 - Distribuição dos valores de “*cicle threshold*” (Ct), ou número de ciclos, do produto de amplificação do gene humano da RNase P (RNP) das amostras de secreção de nasofaringe coletadas de crianças hospitalizadas com infecção respiratória aguda na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, entre março de 2008 a setembro de 2010. Cada ponto representa uma amostra. N= 926.

Da totalidade das amostras testadas, foram detectadas 153 (14,1%) amostras positivas para o bocavírus humano por qPCR. Dessas, 152 amostras foram sequenciadas e tipadas como HBoV1 quando comparadas com amostras padrão obtidas no *GenBank* e demonstrada na topologia da árvore como HBoV-1, -2, -3 e -4. A análise filogenética demonstrou que houve elevada similaridade nas sequências de nucleotídeos do fragmento NS1, com variação entre 98,8 a 99,7% (Figura 4). A análise da substituição de nucleotídeo sinônimos e não sinônimos em relação aos aminoácidos das diferentes amostras deste estudo mostrou que das 152 sequências, formaram-se 11 grupos de amostras distintas: dezenove amostras (12,5%) apresentaram mutações não sinônimas com alteração de aminoácido, nas quais 17 substituíram a metionina pela isoleucina na posição 351; uma amostra apresentou uma substituição da valina pela isoleucina na posição 437 e outra apresentou uma substituição da arginina pela lisina na posição 441. Setenta amostras estudadas apresentaram substituições sinônimas, não alterando os aminoácidos correspondentes. Destas, 30 apresentaram duas substituições simultâneas, sendo elas A1182G e G1347A, mas mantiveram seus aminoácidos correspondentes inalterados, sendo eles a glutamina na posição 394 e a leucina na posição 449, respectivamente. Do total das amostras, 63 não apresentaram nenhuma substituição tanto de nucleotídeo quanto de aminoácido, quando comparada com a amostra padrão utilizada, se mostrando extremamente conservada no fragmento estudado (Tabela 1). A tabela representativa de sequências idênticas encontra-se no Anexo IV.

Figura 4 - Árvore filogenética representando as sequências genéticas de HBoV identificados em nosso estudo (BR08_SP e BR09_SP) comparada com sequências de outras 27 regiões geográficas disponíveis na base de dados *GenBank*. Números em parênteses representam o número de sequências idênticas.

Tabela 1 - Correlação do número de substituições de nucleotídeos e aminoácidos na região alvo do gene NS1 do bocavirus humano com o número de sequências que apresentam a referida mutação.

Amostra	Nucleotídeo de substituição	Sin / N_Sin ^a	Aminoácido de substituição	nº de cepas com mutação
SP_678	G 1071 A	N_Sin	M 357 I	17
SP_248	G 1309 A	N_Sin	V 437 I	1
SP_385	G 1322 A	N_Sin	R 441 K	1
SP_431	G 1173 A	Sin	L391	1
SP_154	A 1182 G	Sin	Q394	30
	G 1347 A		L449	
SP_239	C 1239 T	Sin	F 413	1
SP_51 Ber	C 1239 T	Sin	F 413	4
	G 1317 A		G 439	
SP_74	A 1281 C	Sin	T 427	23
SP_173	C 1308 T	Sin	I 436	10
SP_108	G 1317 A	Sin	G 439	1

Nota: ^a _ Sin – Substituição sinônima; N_Sin – Substituição não sinônima

O fato de encontrarmos apenas HBoV1, contribuiu para a associação desse agente como causador de doença respiratória aguda, uma vez que a literatura vem demonstrando uma maior correlação dos demais subtipos (HBoV2 - 4) a quadros de gastroenterites (4).

O método molecular utilizado para o diagnóstico do HBoV fornece resultados semi-quantitativos em relação à quantidade de vírus presente em cada amostra. Esse dado pode ser avaliados pelos valores que representam o número de ciclos necessário para detecção, denominado de “*cicle threshold*” (Ct). Desta forma, quanto menor o valor do Ct, maior a quantidade de vírus presente na amostra. A avaliação dos valores de Ct para HBoV está representada na Tabela 2. Não houve diferença estatística entre os valores de Ct de amostras com presença de apenas HBoV em relação àquelas com HBoV associado a outros vírus respiratórios. Os valores de Ct encontrados nos pacientes do berçário (grupo B) foram significativamente maiores do que os de pacientes originados da comunidade (grupo A).

A análise dos resultados obtidos foi dividida em resultados do grupo A e resultados do grupo B para melhor compreensão.

Tabela 2 - Distribuição dos valores de “*cicle threshold*” (Ct), ou número de ciclos, das amostras positivas para HBoV coletadas de crianças hospitalizadas com infecção respiratória aguda na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, entre março de 2008 a setembro de 2010.

	Média	Mediana	Intervalo	p-valor*
Coinfecção Comunidade	30,42	32,59	12,91 - 39,28	0,6413
Infecção Simples Comunidade	30,23	32,11	15,68 - 36,7	
Coinfecção Berçário	35,95	36,66	30,04 - 39,64	0,7188
Infecção Simples Berçário	35,32	36,2	30,04 - 38,25	
Infecção simples: Berçário vs. Comunidade				0,03312
Coinfecção Berçário vs. Comunidade				0,01806

Nota: * Comparação das médias dos valores; HBoV indica bocavírus humano;

5.2 Resultados do Grupo A

Foram avaliadas 926 amostras que apresentavam resultados completos para a pesquisa de vírus respiratórios. Dessas, 809 (87,4%) foram positivas para pelo menos um dos 21 vírus respiratórios testados, sendo 146 (15,7%) positivas para o HBoV1.

No total do grupo, a média de idade foi de 7,7 meses, mediana 6 meses e o tempo médio de hospitalização foi de 10,6 dias, com mediana de 6 dias. Os diagnósticos mais frequentes foram bronquiolite (35%) e pneumonia (31%). Ao todo, 113 crianças necessitaram de permanência em terapia intensiva e 12 (1,3%) foram a óbito, sendo que destas 10 apresentavam algum vírus respiratório detectado. Dentre as crianças que morreram, 42% (n=5) obteve diagnóstico de pneumonia; todas com vírus respiratório positivo e hemocultura negativa para bactérias.

Comparando lactentes positivos para algum vírus respiratório com aqueles negativos, foi evidenciado que o tempo de hospitalização foi significativamente maior na população de infectados, sendo que os que apresentavam infecção viral múltipla (66%) permaneceram quase o dobro de dias que os com infecção por apenas um vírus (Tabela 3, Figura 5). Em relação à idade, não houve diferença entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 3 - Comparação do tempo de hospitalização de lactentes positivos para vírus respiratórios com lactentes negativos e dentre os positivos aqueles com infecção simples *versus* os com infecção por múltiplos vírus. N=926.

	Min	1st Qu.	Mediana	Média	3rd Qu.	Max	p-valor*
Vírus Negativo	2	3	5	8,487	8	105	0,008154
Vírus Positivo	1	4	6	10,99	10	287	
Infecção Simples	1	3	5	5,952	8	19	<0,00001
Infecção Múltipla	1	4	6	10,92	11	285	

Nota: Valores expressos em números de dias. Min indica mínimo valor; Max: máximo valor; 1st Qu: primeiro quartil; 3rd Qu.: terceiro quartil. * Comparação das médias dos valores

Figura 5 - Representação gráfica da comparação do tempo de hospitalização de lactentes positivos para vírus respiratórios (infetados) com lactentes negativos (não infectados) e dentre os positivos aqueles com infecção simples (mono infectados) *versus* os com infecção por múltiplos vírus (coinfectados). N=926.

Tabela 4 - Comparação da idade de lactentes positivos para vírus respiratórios com lactentes negativos e dentre os positivos aqueles com infecção simples *versus* os com infecção por múltiplos vírus. N=926.

	Min	1st Qu.	Mediana	Média	3rd Qu.	Max	p-valor*
Vírus Negativo	0	3	6	7,957	12	23	0,8041
Vírus Positivo	0	3	6	7,821	11	23	
Infecção Simples	0	3	6	7,562	11	23	0,2015
Infecção Múltipla	0	3	6	8,05	12	23	

Nota: Valores expressos em meses. Min indica mínimo valor; Max: máximo valor; 1st Qu: primeiro quartil; 3rd Qu.: terceiro quartil. * Comparação das médias do valores

Dentre as 809 amostras positivas para algum vírus respiratório, os rinovírus foram os mais detectados, estando presente em 436 amostras (54%), seguido do vírus sincicial respiratório com 283 (35%) amostras positivas e bocavírus humano, com 146 (18%) positivos. A distribuição dos diferentes vírus respiratórios pesquisados e o padrão de circulação sazonal ao longo do período de estudo estão representados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Figura 6 - Distribuição dos diferentes vírus respiratórios detectados em 809 amostras de ANF positivas para pelo menos um dos vírus respiratórios testados durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na Santa Casa de São Paulo. Valores estão representados em números absolutos. Algumas amostras foram positivas para mais de um vírus.

*Nota: ANF indica aspirado de nasofaringe; HRV: rinovírus; RSV: vírus sincicial respiratório; HBoV: bocavírus humano; HEV: enterovírus; ADV: adenovírus; HMPV: metapneumovírus humano; HPIV1: vírus parainfluenza 1; HPIV2: vírus parainfluenza 2; HPIV3: vírus parainfluenza 3; HPIV4: vírus parainfluenza 4; FLU A: vírus influenza A; FLU B: vírus influenza B; FLU C: vírus influenza C; OC43, NL63, HKU1 e 229E: são subtipos de coronavírus humano.

Figura 7 - Distribuição mensal dos principais vírus respiratórios detectados nos lactentes hospitalizados por IRA em 809 amostras de aspirado de nasofaringe durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na cidade de São Paulo. Valores estão representados em número total de amostras.

*Nota: IRA indica infecção respiratória aguda; HRV A: rinovírus A; HRV C: rinovírus C; RSV: vírus sincicial respiratório; HBoV: bocavírus humano; HEV: enterovírus; ADV: adenovírus; HMPV: metapneumovírus humano; HPIV1: HPIV3: vírus parainfluenza 3; FLU : vírus influenza, incluindo A, B e C; HCoV: coronavírus humano.

Durante o período de estudo, foram encontradas 146 amostras positivas para o bocavírus humano, sendo que a maioria (56%) foi detectada no ano de 2008. O HBoV circulou ao longo de todos os meses estudados, com maior prevalência nos meses de maio a agosto. A Figura 8 representa a circulação sazonal do vírus em relação aos demais vírus respiratórios.

Houve uma elevada taxa de codeteção nas amostras positivas para o HBoV. Duas amostras foram excluídas dessa análise por não apresentarem os resultados completos de investigação de vírus respiratório, totalizando um universo de 144 amostras. Dessas, 121 (84%) apresentavam positividade para o HBoV e para pelo menos mais um dos outros 20 vírus respiratórios testados (Figura 9). A maioria das amostras apresentava HBoV mais um ou mais dois vírus (Figura 10).

Figura 8 - Circulação dos bocavírus humanos detectados nos lactentes hospitalizados por infecção respiratória aguda durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na cidade de São Paulo. O gráfico superior representa o HBoV em relação aos demais vírus respiratórios. O gráfico inferior representa a circulação apenas do HBoV. Os valores estão expressos em número absolutos.

*Nota: HBoV Pos indica amostras positivas para o bocavírus humano.

Figura 9 - Representação do número de infecções múltiplas em relação às infecções simples nas amostras positivas para bocavírus humano. Valores estão representados em número total de amostras. N=144.

Figura 10 - Distribuição do padrão de coinfecção das amostras positivas para bocavírus humano em relação ao número de outros vírus diferentes encontrados em cada amostra avaliada. Valores estão representados em número total de amostras. N=144.

*Nota: HBoV indica bocavírus humano;

Dentre as amostras de HBoV coinfectadas, os rinovírus foram os mais associados, presentes em 80 amostras (55,5%), seguido de adenovírus em 42 amostras (29,2%) e RSV em 34 amostras (23,6%). A distribuição do vírus encontrados está representada na Figura 11. Ao

todo, as duas associações mais frequentes foram HBoV + HRV (presente em 26 das 42 amostras com padrão HBoV + 1) e HBoV + HRV + 1 outro vírus respiratório (presente em 26 das 42 amostras com padrão HBoV +2), demonstrando a marcante participação dos rinovírus nas coinfeções com o bocavírus humano.

Figura 11 - Distribuição dos diferentes vírus respiratórios detectados em 121 amostras positivas para bocavírus com presença de coinfeção. Valores estão representados em números absolutos. Algumas amostras foram positivas para mais de um vírus.

*Nota: HRV indica rinovírus; HRV A: rinovírus humano A; HRV B: rinovírus humano B; HRV C: rinovírus humano C; HRV S/T: rinovírus humano não tipado; ADV: adenovírus; RSV: vírus sincicial respiratório; HEV: enterovírus; HMPV: metapneumovírus humano; HPIV1: vírus parainfluenza 1; HPIV3: vírus parainfluenza 3; HPIV4: vírus parainfluenza 4; FLU A: vírus influenza A; FLU B: vírus influenza B; FLU C: vírus influenza C; OC43, NL63, HKU1 e 229E: são subtipos de coronavírus humano.

Foram avaliadas características demográficas, clínicas e laboratoriais das crianças incluídas no grupo A. Comparando o grupo de pacientes positivos para o bocavírus humano em relação ao grupo de pacientes negativos para esse vírus, foi observado que as crianças com HBoV eram mais velhas, utilizaram mais antibióticos, e apresentavam o diagnóstico de pneumonia com maior frequência e de bronquiolite com menor frequência do que as negativas para HBoV (Tabela 5). Não houve diferença estatística em relação ao tempo de hospitalização, à necessidade de terapia intensiva e uso de ventilação mecânica, ao número de óbitos e à frequência de presença de alguma doença de base. Houve uma tendência a um

menor número de casos com diagnóstico de sibilância nas crianças infectadas pelo HBoV ($p=0,05086$).

Tabela 5 - Comparação de parâmetros demográficos e clínicos em lactentes positivos para HBoV com lactentes negativos para HBoV hospitalizados na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo durante o período de março de 2008 a setembro de 2010.

	HBoV Positivos			HBoV Negativos			<i>p</i> -valor
Idade (meses)[#]	9,767			7,492			0,0000068
Dias Hospitalização [#]	9,442			10,86			0,5372
	Sim	Não	%	Sim	Não	%	
Terapia Intensiva	14	109	11,4	99	594	14,3	0,4788
Ventilação Mecânica	12	111	9,7	87	603	12,6	0,4547
Óbitos	2	127	1,5	10	704	1,4	1
Uso de Antibióticos	70	49	58,8	315	334	48,5	0,04588
Doença de Base	51	69	42,5	302	380	44,3	0,7652
Sibilância	93	29	76,2	575	111	83,8	0,05086
Pneumonia	58	65	47,1	227	465	32,8	0,002825
Bronquiolite	32	91	26	286	406	41,3	0,001284

Nota: # valores de idade e dias de hospitalização expressos em médias. Os itens em negrito são estatisticamente significativos.

A fim de melhor caracterizar a população infectada pelo HBoV, foram comparadas as crianças infectadas apenas pelo bocavírus com aquelas que apresentavam outros vírus respiratórios além do HBoV. Com essa estratégia objetivou-se verificar possíveis interferências na apresentação da doença respiratória causada pelo bocavírus quando outro vírus respiratório estava presente.

A Tabela 6 apresenta as características demográficas dos pacientes infectados pelo bocavírus. De forma geral, a média de idade foi de 9,7 meses, não havendo diferença entre as crianças com infecção simples em relação às com infecção múltipla. Os sexos estavam igualmente distribuídos. Aproximadamente metade das crianças apresentava alguma doença de base, sendo pneumopatia, cardiopatia e antecedente de prematuridade as mais comuns. A identificação de possíveis fatores de risco ou proteção para infecção respiratória viral nessa faixa etária revelou que um quarto da população frequentava creches e quase metade era

exposta à fumaça de cigarro. A maioria encontrava-se no momento do estudo, ou havia recebido anteriormente, regime de aleitamento materno. Cardiopatia congênita foi mais encontrada nas crianças infectadas apenas pelo HBoV ($p=0,027$). Não houve diferença significativa em nenhum dos demais parâmetros avaliados entre as crianças com monoinfecção *versus* coinfecção.

Tabela 6 - Características demográficas de crianças positivas para HBoV hospitalizadas na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo por infecção respiratória aguda durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na cidade de São Paulo, Brasil. N=144.

	HBoV Monoinfecção		HBoV Coinfecção		p
	N=23		N=121		
	N	%	N	%	
Sexo					
Masculino	11	47,8	75	62	0,248
Feminino	12	52,2	46	38	0,248
Idade (meses)*	9,97		9,6		0,968
Doença de Base (total)	10	50	41	41	0,621
Asma	1	5	5	5	1
Cardiopatia	6	30	10	10	0,027
Pneumopatia	6	30	22	22	0,562
Prematuridade	5	25	14	14	0,310
Fatores de risco					
Creche	5	23,8	22	26,2	1
Exposição cigarro	9	42,8	35	42,2	1
Leite materno	10	47,6	52	67,5	0,126

Nota: * Valores expressos em média; HBoV indica bocavírus humano

Avaliados os sintomas clínicos apresentados no momento da admissão hospitalar, tosse (> 96%) foi o mais frequente, seguido de desconforto respiratório (taquipneia e dispneia entre 85 – 93%) e coriza (71 - 81%). Febre foi relatado pela maioria (68 – 85%), porém apenas um terço apresentava temperaturas elevadas ($T_{\text{axilar}} \geq 39^{\circ}\text{C}$). Diarreia ocorreu entre 8 - 14% dos pacientes e conjuntivite estava presente em 13 - 23% dos casos (Tabela 7). A maioria das crianças necessitou de suplementação de oxigênio (aproximadamente 80%), sendo que a média da medida de oximetria de pulso em ar ambiente era 91% e apenas 22% das crianças apresentavam medidas abaixo de 90% (Tabela 8).

Tabela 7 - Sinais e sintomas clínicos de crianças positivas para HBoV hospitalizadas na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo por infecção respiratória aguda durante o período de Março de 2008 a Setembro de 2010, na cidade de São Paulo, Brasil. N=144.

	HBoV Monoinfecção		HBoV Coinfecção		
	N=23		N=121		
	N	%	N	%	p
Sinais e sintomas					
Tosse	21	100	98	96,1	0,603
Sibilância	15	79	78	77,2	0,580
Taquipneia	19	90,5	93	93	1
Dispneia	18	85,7	91	90	0,696
Cianose	2	9,5	11	10,9	1
Febre	18	85,7	68	68,7	0,181
Febre $\geq 39^{\circ}\text{C}$	8	38,1	31	31,3	0,611
Coriza	17	81	72	71,3	0,431
Conjuntivite	5	23,8	13	12,9	0,307
Diarreia	3	14,3	8	8	0,402

Nota: HBoV indica bocavírus humano;

Ao todo, 14 (9,7%) pacientes infectados com HBoV necessitaram de cuidados intensivos, com 12 (8,3%) submetidos à ventilação mecânica e dois (1,4%) óbitos (Tabela 8). A média de dias de hospitalização variou entre 12,5 a 8,8 dias entre o grupo de monoinfectados *versus* coinfectados, respectivamente. A maioria utilizou antibióticos durante a internação, com uma tendência de maior frequência no grupo de infecção simples em relação ao de infecção múltipla (76,2% vs 54,5%; $p=0,089$). Aproximadamente metade das

crianças tiveram o diagnóstico de pneumonia, sendo a maioria não alveolar. O diagnóstico de broncoespasmo foi mais comum no grupo de coinfeções *versus* monoinfecção (21,5% vs 0%; $p<0,005$) apontando para uma possível interferência de outros vírus respiratórios no desencadeamento de sibilância. No entanto, o diagnóstico de infecção do trato respiratório superior (ITRS) foi mais encontrado nas crianças infectadas apenas pelo HBoV ($p=0,016$). Exames laboratoriais coletados na admissão apresentavam aumento discreto de provas inflamatórias, com média de valores de proteína C reativa (CRP) variando entre 3,13 e 4,5 mg/dL, e média do número de leucócitos variando entre 13.956 e 12.597 células.

Tabela 8 - Características clínicas e laboratoriais de crianças positivas para HBoV hospitalizadas na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo por infecção respiratória aguda durante o período de março de 2008 a setembro de 2010, na cidade de São Paulo, Brasil. N=144.

	HBoV Monoinfecção N=23		HBoV Coinfecção N=121		
	N	% ou variação	N	% ou variação	p
Dias Hospitalização*	12,52	2-122	8,8	1-49	0,968
Óbitos	1	4,4	1	0,8	0,295
Terapia Intensiva	2	9,5	12	11,8	1
Ventilação Mecânica	2	9,5	10	9,8	1
Oxigênio	17	81	80	78,4	1
Uso de Antibióticos	16	76,2	54	54,5	0,089
Diagnósticos Clínicos					
Bronquiolite	6	28,6	26	25,5	0,788
Pneumonia	11	52,4	48	47	0,811
Pneumonia Alveolar	2	9,5	16	17,2	0,519
ITRS	3	14,3	1	1	0,016
Broncoespasmo	0	0	22	21,5	<0,005
Exames Laboratoriais					
CRP*	3,13	0,4-12,7	4,5	0,4-33,2	0,723
Leucócitos*	13956	1500-29800	12597	3130-38900	0,127

Nota: * Valores expressos em média; HBoV indica bocavírus humano; ITRS: infecção do trato respiratório superior; CRP: proteína C reativa expresso em mg/dL; leucócitos expresso em número de células.

Uma criança apresentou um quadro até o momento nunca antes relacionado com o HBoV. Trata-se de uma lactente do sexo feminino, com um mês de vida, que foi hospitalizada com uma história de tosse há 1 semana e febre com temperatura axilar $\geq 39^{\circ}\text{C}$ há 1 dia. Sem outros sintomas associados. Na admissão hospitalar encontrava-se taquipneica, com frequência respiratória (FR) de 48 incursões por minuto (ipm) e saturação de oxigênio, medida por oximetria de pulso, de 92% em ar ambiente, resultando na indicação de hospitalização. Radiografia de tórax sem sinais de pneumonia. A hipótese diagnóstica inicial foi uma sepsis presumida com insuficiência respiratória aguda. Após três dias de internação houve piora do padrão respiratório com necessidade de intubação orotraqueal e ventilação mecânica. O hemograma, que na admissão estava normal, evoluiu com pancitopenia, resultando em sangramento digestivo e choque hipovolêmico. Após oito dias de internação, a criança evoluiu com óbito. Realizada autópsia que evidenciou sinais de síndrome hemofagocítica, provável responsável pela morte. A paciente era previamente hígida e apresentava peso e estatura adequados para a idade. Estava em aleitamento materno exclusivo. A investigação de vírus respiratórios coletada na admissão hospitalar resultou em apenas HBoV1 positivo. As hemoculturas coletadas foram negativas.

O segundo caso de óbito no grupo de crianças com HBoV foi um lactente masculino de três meses de vida. No final de julho de 2008 foi hospitalizado com uma história de tosse paroxística há mais de duas semanas, associado a coriza e desconforto respiratório. Ausência de febre. Na admissão hospitalar encontrava-se com taquidispneia, FR 68 ipm, presença de sibilância e medida de oximetria de pulso de 84% em ar ambiente. Radiografia de tórax sem alterações. Hemograma com 14.400 leucócitos, sendo 75% de neutrófilos segmentados, proteína C reativa 0,7 mg/dL. Realizada hipótese diagnóstica de síndrome coqueluchoide e broncoespasmo. Permaneceu internado por 10 dias, sem necessidade de terapia intensiva. Utilizou antibioticoterapia (eritromicina) pela suspeita, não confirmada, de coqueluche e suplementação com oxigênio. A hemocultura resultou negativa. Havia recebido apenas uma dose de vacina contra coqueluche aos 2 meses de vida e não havia outros tossidores em casa. Era previamente hígido, estava em regime de aleitamento materno exclusivo e não frequentava creche apesar de ter contato com outras crianças em casa (irmãos). Painel de vírus respiratório coletado na admissão foi positivo para HBoV e rinovírus A (HRV A). Dez dias após a alta, é novamente hospitalizado com história de tosse há 3 dias associado a desconforto respiratório. Ausência de febre. Na admissão hospitalar apresentava taquidispneia, com FR 58 ipm, sibilância presente e saturação de oxigênio de 91% em ar ambiente. Radiografia de tórax normal. Hemograma com 7.850 leucócitos, sendo 83% de

neutrófilos segmentados; proteína C reativa 0,5 mg/dL. Internado com diagnóstico de broncoespasmo para medicação broncodilatadora e suplementação de oxigênio. Evoluiu no decorrer da hospitalização com insuficiência respiratória e necessidade de ventilação mecânica, sendo transferido para UTI. Durante a permanência na UTI houve uma complicação infecciosa com sepsis e óbito. Tempo total da segunda hospitalização foi 49 dias, sendo 17 na UTI. Hemocultura da admissão resultou negativa; Pesquisa de vírus respiratórios do momento da admissão apresentava HBoV ainda positivo (20 dias após a primeira coleta na internação anterior) associado a adenovírus e parainfluenza 3.

Pneumonia foi o segundo diagnóstico mais frequente na população estudada, totalizando 286 casos (239 com algum vírus respiratório positivo), sendo 80 casos de pneumonia alveolar (dessas 63 com vírus respiratório positivo). Dentre todas as pneumonias, 19 (8%) eram do tipo alveolar com hemocultura negativa e presença de apenas um vírus respiratório. Nesses casos de monoinfecção, os HRV sem tipagem definida e RSV foram os mais prevalentes (cada um com quatro casos). O HBoV foi responsável por dois casos, um em agosto de 2008 e o outro em agosto de 2009.

Foram avaliadas algumas associações de vírus respiratórios resultando em pneumonia, utilizando uma ferramenta estatística de associações que permite identificar padrões ou tendências em bases de dados que contém muitas informações (76). Destaca-se a coinfeção de adenovírus, vírus sincicial respiratório e bocavírus humano, que, quando presente, apresentou um risco de 75% para o diagnóstico de pneumonia. Esse valor foi muito superior ao risco de cada um desses três vírus separadamente causarem o agravo (ADV=38%; HBoV=45% e RSV=26%) ou do risco de pneumonia para os casos em que a pesquisa de vírus respiratórios foi negativa (40% de risco), ressaltando a importância dessa associação. A Figura 12 representa a circulação de ADV, HBoV e RSV em relação aos casos de pneumonias totais e pneumonia alveolares.

Figura 12 - Distribuição mensal de adenovírus, bocavírus humano e vírus sincicial em relação aos casos de pneumonias totais e pneumonia alveolares. Valores estão representados em número total de amostras.

Nota: PNM indica pneumonia; RSV: vírus sincicial respiratório; HBoV: bocavírus humano; ADV: adenovírus;

Durante o período de estudo ocorreu a pandemia de influenza A H1N1 (FLUA-pH1N1). Foram encontradas 15 amostras positivas, sendo 73,3% coinfectadas com algum outro vírus respiratório. O HBoV estava presente em uma criança que apresentava uma infecção mista por 4 vírus (FLUA-pH1N1, HBoV, RSV e HRVA). Apenas uma criança necessitou de terapia intensiva e todas receberam alta hospitalar com melhora.

5.3 Resultados do Grupo B

Foram coletadas 156 amostras de aspirado de nasofaringe de 59 lactentes entre março de 2008 a junho de 2009, com uma média de 2,6 amostras coletadas para cada criança.

No total, 35 amostras (22,4%) eram positivas para algum dos 21 vírus respiratório testados, sendo sete (4,5%) positivas para o HBoV1.

Ao contrário do grupo A, a maioria (85,7%) apresentava apenas um vírus respiratório detectado por amostra, sendo que o número máximo de vírus distintos encontrados foi no total três, que ocorreu em apenas uma amostra clínica (Figura 13).

A distribuição dos vírus respiratórios detectados no período de estudo estão representadas nas Figuras 14, 15 e 16. O adenovírus foi o mais prevalente, sendo detectado em 34% das amostras positivas, seguido de rinovírus (26%), bocavírus humano (20%) e vírus sincicial respiratório (14%). Houve uma menor taxa de circulação viral nos meses de verão.

Figura 13 - Distribuição do número de vírus respiratório detectados por amostra de aspirado de nasofaringe coletados de crianças hospitalizadas na Unidade Neonatal da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo entre março de 2008 a junho de 2009 . Valores estão representados em número total de amostras. N=35.

Figura 14 - Distribuição dos diferentes vírus respiratórios detectados em 35 amostras positivas. Valores estão representados em números absolutos. Algumas amostras foram positivas para mais de um vírus.

Nota: HRV B indica rinovírus humano B; HRV C: rinovírus humano C; HRV S/T: rinovírus humano não tipado; ADV: adenovírus; RSV: vírus sincicial respiratório; HEV: enterovírus; HPIV1: vírus parainfluenza 1; HPIV3: vírus parainfluenza 3; OC43: coronavírus humano OC43.

Figura 15 - Circulação dos vírus respiratório detectados nas crianças hospitalizadas na Unidade Neonatal da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo entre março de 2008 a junho de 2009 . Valores estão representados em número total de amostras. N=35.

Figura 16 - Circulação e distribuição dos vírus respiratório detectados nas crianças hospitalizadas na Unidade Neonatal da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo entre março de 2008 a junho de 2009 . Valores estão representados em número total de amostras. N=35.

Nota: HRV B indica rinovírus humano B; HRV C: rinovírus humano C; HRV S/T: rinovírus humano não tipado; ADV: adenovírus; RSV: vírus sincicial respiratório; HEV: enterovírus; HPIV1: vírus parainfluenza 1; HPIV3: vírus parainfluenza 3; OC43: coronavírus humano OC43.

Nessa população, foram encontradas sete amostras positivas para HBoV1 de seis crianças distintas. O HBoV1 foi detectado apenas em 2008, entre os meses de maio a setembro.

As amostras do grupo B representam infecções adquiridas dentro do ambiente hospitalar, uma vez que as crianças incluídas estavam hospitalizadas na unidade neonatal

desde o nascimento. Conforme protocolo, era possível coletar amostras semanais sucessivas dos lactentes incluídos no estudo e desta forma foi possível, em muitos casos, estabelecer o período no qual ocorreu a infecção viral. A Tabela 9 apresenta o total de coletas e resultados das crianças infectadas com HBoV1.

Tabela 9 - Resultado de coletas de secreção nasofaríngea de lactentes internados na Unidade Neonatal que apresentaram positividade para HBoV. N=6.

Datas coletas/ paciente	Número da Amostra	Resultado Vírus Respiratórios
RN, CS		
16/04/08	BR08_SP01Ber	NEGATIVA
28/04/08	BR08_SP11Ber	HEV68
06/05/08	BR08_SP15Ber	HEV68
13/05/08	BR08_SP22Ber	HBoV1 + RSV
02/06/08	BR08_SP26Ber	ADV
12/06/08	BR08_SP34Ber	NEGATIVA
25/06/08	BR08_SP38Ber	NEGATIVA
22/07/08	BR08_SP51Ber	HBoV1
RN, AMJ		
28/04/08	BR08_SP10Ber	NEGATIVA
06/05/08	BR08_SP20Ber	HBoV1
RN, TLV		
13/05/08	BR08_SP21Ber	NEGATIVA
02/06/08	BR08_SP28Ber	HBoV1
12/06/08	BR08_SP33Ber	NEGATIVA
03/07/08	BR08_SP43Ber	NEGATIVA
RN, MGXG		
13/08/08	BR08_SP65Ber	HBoV1
RN, MCM		
1GEMELAR		
05/08/08	BR08_SP55Ber	NEGATIVA
13/08/08	BR08_SP64Ber	NEGATIVA
26/08/08	BR08_SP69Ber	NEGATIVA
10/09/08	BR08_SP71Ber	HBoV1
15/10/08	BR08_SP84Ber	NEGATIVA
RN, RFV		
10/09/08	BR08_SP74Ber	HBoV1

Nota: HEV68 indica enterovírus humano 68; RSV: vírus sincicial respiratório; ADV: adenovírus; HBoV1: bocavírus humano tipo 1.

Uma criança (RN, CS), teve detecção de HBoV em duas ocasiões durante a mesma internação. A primeira ocorreu em maio de 2008, em uma coinfeção com RSV, e a segunda, em julho de 2008, com infecção apenas pelo HBoV (Tabela 9). Ele apresentou três coletas negativas para o HBoV entre as coletas positivas e o nível de Ct do HBoV foi menor na segunda coleta (30,04) em comparação com a primeira (39,64). A análise filogenética dessas amostras revelou que tratava-se de genótipos distintos (BR08_SP22Ber e BR08_SP51Ber) (Figura 4). Esse dado indica que ocorreram duas infecções distintas por HBoV e não uma reativação ou reinfeção pelo mesmo genótipo.

A maioria das crianças incluídas nesse grupo não apresentavam os dados clínicos e laboratoriais de forma completa. Foi possível avaliar dados parciais anotados nas fichas de coleta das crianças positivas para HBoV, com descrição a seguir.

Dentre as seis crianças infectadas por HBoV, cinco eram do sexo masculino e em duas as coletas ocorreram além do período neonatal (um paciente estava com dois meses de idade e o outro estava com sete e nove meses nos momentos das coletas). Todas as crianças apresentavam alguma doença de base: quatro nasceram prematuras (26 semanas; 29 semanas; 31 semanas e 32 semanas), três desenvolveram doença pulmonar crônica pelo uso de oxigênio, duas nasceram com cardiopatia congênita (uma com comunicação interventricular e outra não especificado) e três com encefalopatia por anóxia neonatal. Todas estavam com suplementação de oxigênio em unidade de terapia intensiva neonatal, sendo que três estavam em ventilação mecânica no momento da coleta. Antibióticos foram administrados para as seis crianças. O diagnóstico foi de sepsis para todos os pacientes e um apresentava um diagnóstico secundário de pneumonia não alveolar.

Uma criança com HBoV foi a óbito. Era um lactente do sexo masculino, nascido a termo com peso de 3685g e anóxia neonatal (índice de Apgar 0 para o primeiro minuto e 4 para o quinto minuto). Evoluiu com desconforto respiratório precoce e necessidade de ventilação mecânica logo após o nascimento. A primeira coleta aos 13 dias de vida foi negativa para vírus respiratórios. A segunda coleta, aos 21 dias de vida, foi positiva para o HBoV. Nesse momento o lactente encontrava-se em mal estado geral, com diagnóstico de choque séptico e mantendo ventilação mecânica, antibioticoterapia de amplo espectro antimicrobiano e uso de drogas vasoativas. Hemoculturas coletadas todas negativas. Houve piora progressiva culminando no óbito aos 26 dias de vida.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo foram avaliadas as infecções agudas do trato respiratório inferior causadas pelo bocavírus humano em lactentes hospitalizados. Para tal, foi utilizado o aspirado de nasofaringe dos pacientes incluídos e pesquisado a presença de 21 vírus respiratórios, incluindo o HBoV. Utilizando a avaliação da quantidade de RNP nas amostras coletadas, foi possível confirmar que eram uniformes, e assim, de alta qualidade para interpretação dos resultados obtidos.

Nós encontramos algum vírus respiratório em 87,4% das amostras coletadas de crianças vindas da comunidade e hospitalizadas por doença respiratória aguda. Essa taxa de positividade foi semelhante a outros estudos publicados na literatura que utilizaram população e metodologia comparáveis (14,16,78).

A escolha do método diagnóstico a ser empregado na avaliação etiológica das infecções respiratórias influencia nos resultados obtidos, por exemplo, os ensaios que utilizam técnicas moleculares aumentaram consideravelmente a taxa de detecção viral, permitindo a identificação de patógenos antes não conhecidos, como é o caso do metapneumovírus humano e o bocavírus (11). Em contrapartida, esses métodos por apresentarem uma alta sensibilidade, aumentaram o número de coinfeções virais, criando dúvidas sobre o papel de determinados vírus nas infecções do trato respiratório inferior. Na tentativa de elucidar esse dilema, Utokaparch e cols. avaliou a presença de vírus respiratórios em ANF de lactentes menores de 24 meses admitidos em um serviço de emergência com infecção respiratória aguda. Foram comparados os resultados positivos através de cultura de células e/ou imunofluorescência e PCR em tempo real quantitativo. Foi observado que o qPCR aumentou a detecção de vírus de 84,3% para 94,3%. Comparadas as cargas virais nas situações onde foi detectado dois ou mais vírus distintos, foi observada uma clara diferença no número de cópias entre os vírus, sendo possível estabelecer um vírus dominante na amostra (16). Nós publicamos resultados da análise de dados parciais dessa mesma amostra do nosso estudo, com pesquisa para nove vírus respiratórios (RSV, HMPV, ADV, HPIV1, HPIV2, HPIV3, FLUA, FLUB, FLUA-pH1N1) com uma taxa de positividade viral de apenas 53%, mostrando a importância da utilização de um painel amplo para o diagnóstico mais preciso de infecção respiratória em lactentes (79).

Em nosso estudo, mais da metade das amostras positivas apresentavam múltiplos vírus. Foi evidenciado que os lactentes que estavam com infecção múltipla permaneceram o

dobro do tempo hospitalizados em comparação com aqueles que estavam infectados por apenas um vírus (5,9 dias infecção simples vs. 10,9 dias infecção múltipla; $p < 0,00001$). Não há um consenso na literatura sobre o impacto das coinfeções virais nas infecções do trato respiratório e possíveis implicações nos parâmetros de gravidade e desfechos clínicos. Com a maior utilização dos métodos moleculares para diagnóstico, é crescente o número de estudos que reportam altas taxas de coinfeção, fato que tem motivado a avaliação mais detalhada dessa situação (80,81).

Cilla e cols. em um estudo sobre pneumonia virais em crianças menores de três anos de idade, avaliou o impacto das coinfeções nos parâmetros de gravidade. Os vírus mais encontrados, em ordem decrescente, foram: RSV, HBoV e RHV. Foi demonstrado que crianças infectadas com dois ou mais vírus tiveram maiores taxas de hospitalização do que as que apresentavam apenas um vírus (67,2% vs. 41,1%; $p = 0,005$) (82). Calvo e cols. comparando infecções virais múltiplas com aquelas apenas por RSV, encontrou que nas coinfeções os lactentes apresentavam febre mais elevada ($p < 0,001$), utilizaram mais antibióticos ($p = 0,03$) e permaneceram mais tempo hospitalizados ($p = 0,05$) (83).

Em contrapartida, outros autores reportaram infecções mais graves causadas por infecções virais simples em relação às múltiplas, especialmente quando o RSV era o agente causador da infecção simples (20,84). Marguet e colaboradores, em uma avaliação do papel dos vírus respiratórios na gravidade das bronquiolites, demonstrou que, em lactentes jovens (média idade 2,4 meses) sem comorbidades, o vírus sincicial respiratório gerou quadros mais graves em comparação com os demais vírus pesquisados, incluindo coinfeções como RSV+HRV. Quando o RSV está presente, o risco relativo da necessidade de suplementação de oxigênio e de pior escore de gravidade aumentou em 2,5 vezes, bem como o tempo de hospitalização por um período maior que cinco dias, que teve um aumento de 6,2 vezes (84).

Por fim, um terceiro grupo de autores não encontrou diferenças estatísticas entre populações coinfectadas vs. infecção simples (10,80,81,85-88). Assim, mais estudos com utilização de painel viral amplo por técnica de PCR e que avaliem parâmetros clínicos são necessários para melhor elucidar o papel das coinfeções virais nos lactentes.

O bocavírus foi o terceiro vírus mais detectado em nosso estudo, presente em 15,8% das amostras de crianças da comunidade. Após sua descoberta em 2005, estudos que incluíram o HBoV dentre os vírus pesquisados encontraram uma prevalência semelhante para lactentes jovens hospitalizados (14,41,78,89-94).

Zhang e cols. publicou uma avaliação prospectiva na China incluindo crianças hospitalizadas com idade menor que 72 meses, sendo 82,7% menores de 24 meses, por

doença respiratória aguda entre maio de 2008 a março de 2010. Foram avaliados 18 vírus utilizando técnica de PCR. Os autores encontram 94,3% de positividade viral nas 350 amostras coletadas. O HBoV foi o terceiro vírus mais encontrado (33,8%), superado por RSV (51%) e HEV/HRV (54%) (78). A sazonalidade do HBoV foi muito semelhante com a que nós reportamos, apesar de estarmos em hemisférios opostos. Na China, em 2008 houve pico de HBoV em julho e em 2009, entre julho e agosto, meses de verão, enquanto que aqui em São Paulo, Brasil, obtivemos em 2008 pico em julho e em 2009 não houve exatamente um pico, porém maior número de casos entre maio e agosto, meses de outono e inverno. Outros autores do hemisfério norte publicaram uma circulação anual, porém com picos nos meses de inverno e primavera (4,34).

Houve uma elevada taxa de coinfeção (84%) nas amostras positivas para o bocavírus humano. A maioria (57,6%) apresentava mais um ou dois vírus associados ao HBoV. Os vírus mais envolvidos nas coinfeções foram, em ordem decrescente, HRV, ADV e RSV. Esses dados estão de acordo com outras publicações da literatura (4,17,64,78,81,88).

Diversos estudos foram publicados ressaltando essa elevada taxa de coinfeção do HBoV, em mais de 80% dos casos, e até 44% de presença em pacientes assintomáticos (53,70). Ademais, foi verificado que o HBoV pode ter um tempo prolongado de excreção viral em lactentes, com mediana de 50 dias podendo se estender por até 402 dias, caracterizando mecanismo de persistência, e até 50% de recorrência de infecções em dois anos (63). Esse comportamento impulsionou uma discussão sobre o papel do HBoV como causador de infecção respiratória.

A fim de responder essa dúvida e consolidar o HBoV1 como patógeno respiratório, pesquisadores relataram outros métodos para diagnóstico do vírus além do PCR convencional: quantificação de carga viral evidenciando altos títulos de vírus, presença de viremia do HBoV, mono-deteção de HBoV nas amostras de ANF, evidência de replicação viral com presença de mRNA nas amostras respiratórias e evidência sorológica de infecção aguda (presença de IgM, elevação de títulos de IgG e/ou baixa avidéz de IgG) (4,44,56,65).

Em nosso estudo, para melhor caracterizar o HBoV como causador de infecção respiratória aguda, utilizamos duas estratégias: avaliação das características clínicas e laboratoriais das crianças infectadas apenas com HBoV em comparação com aquelas que apresentavam outros vírus associados ao HBoV e avaliação semi-quantitativa através da análise dos Cts encontrados nas amostras positivas apenas para HBoV e naquelas com HBoV e outros vírus coinfectados.

Na comparação de dados clínicos e laboratoriais foi encontrado que o diagnóstico de broncoespasmo foi mais frequente nas crianças coinfectadas do que naquelas apenas com HBoV (21,5% vs. 0%; $p < 0,005$), sugerindo a participação dos demais vírus respiratórios no desencadeamento de sibilância. Considerando que as associações mais frequentes foram HBoV + HRV e HBoV + HRV + outro vírus e o fato do HRV ser associado na literatura com sibilância, é justificado esse achado mais frequente nas coinfeções (95). Vale ressaltar que apesar de menos frequente do que os demais vírus, o HBoV é associado a quadros de sibilância e, em nossa população, 76,2% das crianças infectadas com HBoV apresentavam esse sintoma, assim como também foi demonstrado por outros autores (64,96). No entanto, houve uma tendência para maior frequência de sibilância nos pacientes com HBoV negativo *versus* aqueles com HBoV positivo (83,8% vs 76,2%; $p = 0,0508$).

Não houve diferença significativa nos demais parâmetros avaliados entre as crianças com apenas bocavírus em relação às aquelas com HBoV e outros vírus associados, e, em contrapartida, foram encontradas diferenças importantes entre os pacientes com HBoV positivo *versus* aqueles com HBoV negativo, como maior presença de pneumonias. Esse fato contribui para demonstrar que existem características particulares da infecção causada pelo HBoV e que elas se mantêm mesmo na presença de outros vírus respiratórios.

Os resultados de comparação de Cts de HBoV em infecção isolada com infecção múltipla foram surpreendentes. Alguns autores defendem que infecções simples cursam com maior carga viral de determinado patógeno em relação quando este está presente em uma infecção mista e, em coinfeções, deve haver um vírus dominante que encontra-se em maior quantidade, sugerindo inclusive valores de corte para considerar a identificação de um vírus como significativa (17,44,49,64). Desta forma, o uso da quantificação viral em uma amostra clínica, seria útil para confirmar que aqueles vírus ali presentes estão de fato causando doença aguda.

Nós não encontramos diferenças estatísticas entre os valores de Ct de amostras com presença de apenas HBoV em relação às aquelas em que o HBoV estava associado a outros vírus respiratórios (média Ct 30,42 coinfeção vs. 30,23 infecção simples ; $p = 0,6413$). Esse fato foi surpreendente pois esperava-se que as infecções simples apresentassem menores valores de Ct. É importante ressaltar que, como já discutido previamente, as amostras eram extremamente uniformes, sendo possível essa comparação. Outro fato inusitado foi que os valores de Ct de HBoV detectados na unidade neonatal (grupo B) foram significativamente maiores do que os de crianças vindas da comunidade (grupo A) (média de Ct 30,42 grupo A vs. 35,32 no grupo B; $p = 0,018$). Era esperado para o grupo da unidade neonatal, no qual

certamente tratava-se de uma primoinfecção por HBoV adquirida no ambiente hospitalar, que houvesse uma maior carga viral, e portanto menores valores de Ct, em comparação com as crianças que adquiriram o bocavírus humano na comunidade. Smit e cols. (97) em uma publicação sobre infecções de vírus respiratórios na unidade neonatal encontrou uma média de Ct de 34,59 nas amostras positivas para vírus respiratórios; nesse estudo os autores encontraram apenas uma amostra positiva para HBoV.

Uma vez que não existem muitas publicações abordando quais são os valores de carga viral habitualmente encontrados na nasofaringe de recém-nascidos infectados com um vírus respiratório, é possível, que nessa população, uma menor carga viral seja o suficiente para provocar doença. Mais estudos são necessários para confirmar se há efetivamente uma relação causal entre quantidade de vírus detectado e doença aguda.

O HBoV é um importante agente causador de pneumonia viral com necessidade de hospitalização em lactentes. Na comparação entre crianças com HBoV positivos com aquelas negativas para HBoV foi evidenciado que 47,1% das crianças infectadas pelo HBoV apresentavam diagnóstico de pneumonia *versus* 32,8% das não infectadas ($p=0,0028$). Apoiando esse achado foi demonstrado que o uso de antibióticos foi mais comum nas crianças com HBoV (58,8%) do que naquelas negativas para esse agente (48,5%) com $p=0,045$. Em contrapartida, o diagnóstico de bronquiolite foi mais frequente nos pacientes negativos para HBoV (41,3% HBoV negativo *vs.* 26% HBoV positivos; $p=0,001$).

Uma meta-análise recém publicada sobre a incidência de infecção viral nas pneumonia da comunidade em crianças, avaliando estudos de diversas partes do mundo incluindo o Brasil (98), encontrou uma incidência de 57,4% (76,1% em crianças ≤ 12 meses), sendo que 29,3% eram infecções por múltiplos vírus (99). Rinovírus, RSV e HBoV foram os agentes mais comuns, em ordem decrescente de frequência. Outros autores também reportaram resultados semelhantes com o HBoV ocupando a terceira posição em frequência na etiologia de pneumonias virais em crianças (89,91,100).

Pneumonia foi o segundo diagnóstico mais frequente em nossa população (31%) estando muito próxima do primeiro lugar, bronquiolite (35%). Dentre os 12 óbitos registrados, cinco (42%) apresentavam o diagnóstico de pneumonia. Ainda hoje, ela é considerada a principal causa de mortes por doenças infecciosas em crianças. A Organização Mundial de Saúde reporta que aproximadamente 935.000 crianças menores de 5 anos morreram em 2013 devido a pneumonia, sendo responsável por 15% de todas as causas de morte nessa faixa etária (101). Foram avaliadas algumas associações de vírus respiratórios resultando em maior prevalência de pneumonia. Nós encontramos que a coinfeção de

adenovírus, vírus sincicial respiratório e bocavírus humano apresentou um risco de 75% para o diagnóstico de pneumonia. Esse valor foi muito superior ao risco de cada um desses três vírus separadamente causarem o agravo (ADV=38%; HBoV=45% e RSV=26%) ou do risco de pneumonia para os casos em que a pesquisa de vírus respiratórios foi negativa (40%), ressaltando a importância dessa associação. Esse achado sugere que a coinfeção específica de HBoV com RSV e ADV é potencialmente mais grave do que outras coinfeções com HBoV, ou de quando ocorre a infecção simples. Desta forma, a determinação etiológica da infecção respiratória aguda no lactente pode ser útil na estratificação de risco do paciente, possibilitando medidas preventivas para redução de morbi-mortalidade.

Fry e cols. publicaram dados semelhantes sobre o papel do HBoV na etiologias de pneumonias e forte relação com as coinfeções presentes (70). Os autores demonstraram que a infecção por HBoV, terceira mais comum entre os vírus respiratórios, aumentava o risco de hospitalizações por pneumonia em quatro vezes. Contudo, quando foram excluídas as coinfeções (83%, sendo as associações HBoV + HRV e HBoV + RSV as mais prevalentes), não houve aumento do risco, sugerindo que as coinfeções interferem na gravidade da doença causada pelo HBoV.

Um lactente apresentou uma síndrome hemofagocítica (HLH) secundária ao quadro infeccioso respiratório, evoluindo para o óbito. O HBoV foi o único vírus detectado. Ao nosso saber esse é o primeiro caso relatado de HLH relacionada ao HBoV. A síndrome hemofagocítica é uma doença rara, grave, potencialmente fatal (mortalidade 8-22%), ocasionada por uma proliferação e ativação linfocitária desordenada, caracterizada por células “*natural killers*” inativas ou debilitadas, levando a uma hiperativação macrofágica e expressão exagerada de citocinas inflamatórias (102,103). Manifesta-se por febre, associada a disfunção hepática, distúrbios de coagulação, pancitopenia, esplenomegalia, hipertrigliceridemia, aumento de ferritina, redução do fibrinogênio, proliferação macrofágica progressiva e excesso de produção de citocinas. Existem critérios clínicos e laboratoriais para a confirmação diagnóstica. Tem como característica patognomônica a presença de macrófagos fagocitando eritrócitos, leucócitos e/ou plaquetas na medula óssea, linfonodos, fígado, baço entre outros órgãos (104). Foi primeiramente descrita em 1939 e pode ser dividida em dois grupos: primária (associada à síndromes genéticas ou familiar autossômica recessiva) e secundária (associada às infecções, neoplasias ou outros agravos inflamatórios e autoimunes).

Dentre a HLH relacionada às infecções virais, o vírus Epstein –Barr (EBV) é o mais descrito, podendo ser gatilho para a HLH tanto na primoinfecção como nas reativações

(102). Outros herpes vírus associados são o citomegalovírus (CMV) e herpes vírus tipo 8. O vírus da imunodeficiência humana (HIV), associado ou não ao CMV também está descrito como gatilho para HLH. Existem 28 publicações sobre parvovírus B19 ocasionando HLH (104,105). Menos da metade eram crianças e a maioria apresentava doença hematológica de base. A maior parte desse grupo teve um desfecho favorável. Os enterovírus também são associados e já foram publicados 12 casos pediátricos na literatura (102,104). Em relação aos vírus respiratórios, são raras as publicações, sendo o influenza o mais presente. Já foram reportados casos de influenza sazonal, H1N1 pandêmico e H5N1 aviário, a maioria com evolução para óbito (104,106). Outros vírus respiratórios já publicados foram: parainfluenza, adenovírus e coronavírus (102,107). Por fim, existem publicações associando HLH com dengue, rubéola, caxumba e hantavírus (102,104).

A paciente que identificamos com HLH associada ao HBoV era uma lactente de um mês de vida, sem antecedentes pessoais ou perinatais e que foi hospitalizada com uma infecção respiratória aguda. Após três dias de internação evoluiu com piora clínica que culminou no óbito e o diagnóstico de HLH foi confirmado *post-mortem* pela patologia. O único vírus respiratório detectado foi o HBoV1. Não havia outros sinais e sintomas além dos compatíveis com infecção do trato respiratório inferior no início do quadro. Os exames laboratoriais iniciais eram normais. Não foi realizada a pesquisa de outros vírus associados a HLH, como EBV, CMV, HIV e parvovírus B19. Entretanto, a criança apresentava apenas um mês de vida, nasceu de uma gestação a termo e estava em regime de aleitamento materno exclusivo. Não apresentava nenhum outro sinal ou sintoma compatível com uma primoinfecção por esses agentes. Não é possível descartar uma HLH primária concomitante a uma infecção respiratória viral. No entanto, os dados apontam para uma ativação inflamatória secundária ao insulto infeccioso causado pelo HBoV.

Os resultados obtidos no grupo de lactentes internados na unidade neonatal (grupo B), acrescentaram conhecimentos importantes. Do total de amostras coletadas, 22,5% apresentava vírus respiratório positivo, com uma taxa de coinfeção de apenas 14,3%. Os vírus mais detectados, em ordem decrescente, foram : ADV, HRV, HBoV e RSV. Em um estudo realizado na Holanda incluindo 334 recém-nascidos internados na unidade neonatal, independente de diagnóstico ou sintomas, durante o período de um ano, foram coletados aspirados de nasofaringe para pesquisa de 18 vírus respiratórios utilizando técnica de PCR. Os autores encontraram 10,2% de positividade para vírus respiratórios com taxa de coinfeção de 9%. Nesse estudo os vírus parainfluenza (44%) foram os mais detectados, seguido por HRV (20%) e RSV (18%); HBoV foi encontrado em apenas um paciente (3%) (97). Por se tratar de

infecções adquiridas dentro do ambiente hospitalar era esperada uma incidência de vírus respiratórios inferior ao grupo de crianças com infecções adquiridas na comunidade (45,108,109). Da mesma forma, uma vez que a circulação viral nesse ambiente é diminuta, a expectativa de coinfeções também era menor (110).

Nós encontramos sete HBoV positivos em seis crianças (uma criança apresentou duas coletas positivas). Apenas uma amostra apresentava coinfeção viral (com RSV). Todas as amostras foram identificadas em 2008. Nós identificamos que o pico de circulação de HBoV ocorreu nos meses de julho a agosto, e, nesse grupo a coleta de amostras encerrou em maio de 2009, portanto antes do pico sazonal, podendo justificar a ausência de detecção em 2009.

Uma criança apresentou duas infecções pelo HBoV durante a mesma internação. A análise filogenética das amostras revelou que eram cepas distintas. Foram realizadas três coletas nos dois meses de intervalo entre as infecções pelo HBoV, todas negativas para esse patógeno. Outras duas crianças que tinham disponíveis coletas subsequentes à amostra positiva para HBoV, tiveram esses resultados negativos, sendo que em uma o intervalo entre o positivo e o negativo foi de apenas uma semana. Assim, nesse grupo da unidade neonatal foi observada recorrência de infecção, porém, não foi verificada persistência. Nós não possuímos dados de tempo de excreção do HBoV nas amostras da comunidade, uma vez que não era a finalidade do estudo. Entretanto, se consideramos dados da literatura que apontam para um período longo de persistência do HBoV, talvez o fato das amostras do berçário possuírem menor quantidade de vírus (representada pelo Ct) do que as da comunidade resulte em um menor tempo de excreção viral.

A quase totalidade das amostras positivas para HBoV foram sequenciadas e todas foram classificadas como HBoV1. A partir de 2009 começaram a surgir publicações descrevendo espécies distintas de HBoV, e assim, diversos autores passaram a procurar os diferentes subtipos nas amostras clínicas. Neste momento torna-se mais evidente a participação do HBoV1 nos quadros respiratórios e dos demais subtipos (HBoV2 - 4) nos quadros gastrointestinais. Isso foi demonstrado por uma avaliação no Reino Unido e Tailândia, com 6.524 amostras de secreção respiratória e 2.500 amostras de fezes, sendo que nas amostras de secreção respiratória foi encontrado apenas HBoV1 enquanto que nas fezes foi encontrado principalmente HBoV2 (111). Não obstante, alguns grupos do oriente encontraram HBoV2 - 4 nas amostras de crianças com doença respiratória aguda (112-114). Na Coreia do Sul, foram detectados cinco (2,3%) HBoV2 em 212 crianças hospitalizadas com ITRI, desses apenas um sem coinfeção (112). Na China foram reportados 10 (4,3%) HBoV2 em ANF de 235 crianças hospitalizadas com quadro respiratório, sendo 70% com coinfeção

(113). E por fim, no Japão, em uma avaliação de 850 crianças com doença respiratória aguda, foram encontrados no ANF 132 (15,5%) HBoV1; cinco (0,6%) HBoV2; três (0,4%) HBoV3 e cinco (0,6%) HBoV4. Apenas os HBoV1 resultaram em hospitalização (114).

Assim, o fato de encontramos apenas o HBoV1 nas nossas amostras de secreção respiratória de crianças hospitalizadas por ITRI, contribuiu para a associação do bocavírus humano tipo 1 como causador de doença respiratória aguda na população pediátrica.

7 CONCLUSÕES

Durante o período de estudo (março de 2008 a setembro de 2010) foram detectadas 153 amostras positivas para HBoV (14%) de 1113 amostras coletadas, sendo sete HBoV positivos na unidade neonatal. Dentre as 926 amostras incluídas de crianças da comunidade, o HBoV ocupou a terceira posição em frequência de vírus respiratórios detectados, sendo superado apenas pelo RSV e HRV.

Além de frequente causa de hospitalização, a infecção por HBoV é potencialmente grave. Foi observado que as crianças positivas para HBoV eram significativamente mais velhas (média idade 9,7 meses), utilizaram mais antibióticos, apresentaram o diagnóstico de pneumonia com maior frequência (independente da presença de outros vírus coinfectantes) e o de bronquiolite com menor frequência do que as crianças negativas para HBoV. No total de HBoV positivos, três crianças foram a óbito.

O HBoV circulou ao longo de todos os meses estudados, com maior prevalência nos meses de maio a agosto. Houve uma elevada taxa de codeteção com os demais 20 vírus respiratórios pesquisados nas amostras de crianças originadas da comunidade. Apenas 16% dos bocavírus humanos positivos não estavam associados a outros vírus. Rinovírus, adenovírus e RSV, em ordem decrescente, foram os agentes com maior frequência de codeteção.

A análise filogenética das amostras positivas para HBoV, demonstrou que foram detectados apenas HBoV1 nas amostras de secreção respiratória de crianças hospitalizadas por ITRI. Esse achado contribuiu para a consolidação do bocavírus humano tipo 1 como causador de doença respiratória aguda na população pediátrica.

REFERÊNCIAS*

1. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 2011; 377(9773):1264–75.
2. Nair H, Nokes J, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9725):1545–55.
3. Pavia AT. Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis. *Clin Infect Dis*. 2011;52(4 Suppl):S284–9.
4. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus-the first 5 years. *Rev Med Virol*. 2011;22(1):46–64.
5. Langley GF, Anderson LJ. Epidemiology and Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infections Among Infants and Young Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(6):510–7.
6. Mejías A, Chávez-Bueno S, Jafri HS, Ramilo O. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(11 Suppl):S189–97.
7. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2011;12(1):36–44.
8. Eisenberg KW, Szilagyi PG, Fairbrother G, Griffin MR, Staat M, Shone LP, et al. Vaccine Effectiveness Against Laboratory-Confirmed Influenza in Children 6 to 59 Months of Age During the 2003-2004 and 2004-2005 Influenza Seasons. *Pediatrics*. 2008;122(5):911–9.
9. Resch B, Sommer C, Nuijten MJC, Seidinger S, Walter E, Schoellbauer V, et al. Cost-effectiveness of Palivizumab for Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Children, Based on Long-term Epidemiologic Data From Austria. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(1):e1–e8.
10. Peng D, Zhao D, Liu J, Wang X, Yang K, Xicheng H, et al. Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *Virol J*. 2009;6(1):155–61.
11. Yan Y, Zhang S, Tang Y-W. Molecular Assays for the Detection and Characterization of Respiratory Viruses. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(04):512–26.
12. Murdoch DR, Jennings LC, Bhat N, Anderson TP. Emerging Advances in Rapid Diagnostics of Respiratory Infections. *Infectious Disease Clinics of NA*. 2010;24(3):791–807.
13. Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. 2004;23(1):S6–10.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15], Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

14. Christensen A, Nordbø SA, Krokstad S, Rognlien AGW, Døllner H. Human bocavirus commonly involved in multiple viral airway infections. *Journal of Clinical Virology*. 2008;41(1):34–7.
15. Lindblom A, Bhadri V, Söderhäll S, Ohrmalm L, Wong M, Norbeck O, et al. Respiratory viruses, a common microbiological finding in neutropenic children with fever. *J Clin Virol*. 2010;47(3):234–7.
16. Uto kaparch S, Marchant D, Gosselink JV, McDonough JE, Thomas EE, Hogg JC, et al. The Relationship Between Respiratory Viral Loads and Diagnosis in Children Presenting to a Pediatric Hospital Emergency Department. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(2):e18–e23.
17. Christensen A, Nordbø SA, Krokstad S, Rognlien AGW, Døllner H. Human bocavirus in children: Mono-detection, high viral load and viraemia are associated with respiratory tract infection. *Journal of Clinical Virology*. 2010;49(3):158–62.
18. Kantola K, Hedman L, Allander T, Jartti T, Lehtinen P, Ruuskanen O, et al. Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin Infect Dis*. 2008;46(4):540–6.
19. Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter H-P, Kundi M, Popow-Kraupp T. Single Versus Dual Respiratory Virus Infections in Hospitalized Infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2005;24(7):605–10.
20. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2011;6(1):71–7.
21. Gurda BL, Parent KN, Bladek H, Sinkovits RS, DiMattia MA, Rence C, et al. Human Bocavirus Capsid Structure: Insights into the Structural Repertoire of the Parvoviridae. *Journal of Virology*. 2010;84(12):5880–9.
22. Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human Bocavirus Can Be Cultured in Differentiated Human Airway Epithelial Cells. *Journal of Virology*. 2009;83(15):7739–48.
23. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(36):12891–6.
24. Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human Bocaviruses Are Highly Diverse, Dispersed, Recombination Prone, and Prevalent in Enteric Infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;201(11):1633–43.
25. Hirose Y, Hamada H, Wakui T, Ogawa T, Terai M. Characteristic systemic cytokine responses in children with human bocavirus-positive lower respiratory tract infection. *Microbiol Immunol*. 2014;58(3):215–8.

26. Zhang Z, Zheng Z, Luo H, Meng J, Li H, Li Q, et al. Human Bocavirus NP1 Inhibits IFN-Production by Blocking Association of IFN Regulatory Factor 3 with IFNB Promoter. *The Journal of Immunology*. 2012 ;189(3):1144–53.
27. Caccia ERB, Watanabe ASA, Carraro E, Leal E, Granato C, Bellei N. Frequency of human bocavirus respiratory infections among at-risk patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2012 ;54(6):307–10.
28. Brebion A, Vanlieferinghen P, Dechelotte P, Boutry M, Peigue-Lafeuille H, Henquell C. Fatal Subacute Myocarditis Associated with Human Bocavirus 2 in a 13-Month-Old Child. *J Clin Microbiol*. 2014;52(3):1006–8.
29. Mori D, Ranawaka U, Yamada K, Rajindrajith S, Miya K, Perera HKK, et al. Human Bocavirus in Patients with Encephalitis, Sri Lanka, 2009–2010. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(11):1859–62.
30. Beder LB, Hotomi M, Ogami M, Yamauchi K, Shimada J, Billal DS, et al. Clinical and microbiological impact of human bocavirus on children with acute otitis media. *Eur J Pediatr*. 2009;168(11):1365–72.
31. Sadeghi M, Kantola K, Finnegan DPJ, McCaughey C, Hedman L, Soderlund-Venermo M, et al. Possible Involvement of Human Bocavirus 1 in the Death of a Middle-Aged Immunosuppressed Patient. *J Clin Microbiol*. 2013;51(10):3461–3.
32. Schenk T, Maier B, Hufnagel M, Strahm B, Konty U, Neumann-Haefelin D, et al. Persistence of human bocavirus dna in immunocompromised children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1):82–4.
33. Schildgen O, Qiu J, Söderlund-Venermo M. Genomic features of the human bocaviruses. *Future Virol*. 2012;7(1):31–9.
34. Peltola V, Söderlund-Venermo M, Jartti T. Human Bocavirus Infections. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(2):178–9.
35. Kantola K, Hedman L, Arthur J, Alibeto A, Delwart E, Jartti T, et al. Seroepidemiology of Human Bocaviruses 1-4. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;204(9):1403–12.
36. Calvo C, García-García ML, Pozo F, Carvajal O, Pérez-Breña P, Casas I. Clinical Characteristics of Human Bocavirus Infections Compared With Other Respiratory Viruses in Spanish Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(8):677–80.
37. Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis*. 2006;194(9):1276–82.
38. Martins Júnior RB, Carney S, Goldemberg D, Bonine L, Spano LC, Siqueira M, et al. Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(6):716–21.

39. da Silva ER, Pitrez PMRC, Arruda E, Mattiello R, Sarria EE, de Paula FVE, et al. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors. *BMC Infectious Diseases*; 2013;13(1):1–8.
40. Nascimento-Carvalho CM, Cardoso M-RA, Meriluoto M, Kemppainen K, Kantola K, Ruuskanen O, et al. Human bocavirus infection diagnosed serologically among children admitted to hospital with community-acquired pneumonia in a tropical region. *J Med Virol*. 2011;84(2):253–8.
41. Bezerra PGM, Britto MCA, Correia JB, Duarte MDCMB, Fonceca AM, Rose K, et al. Viral and Atypical Bacterial Detection in Acute Respiratory Infection in Children Under Five Years. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18928.
42. Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, Leistner-Segal S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(1):56–60.
43. do Amaral de Leon C, Amantea SL, Pilger DA, Cantarelli V. Clinical and epidemiologic profile of lower respiratory tract infections associated with human bocavirus. *Pediatr Pulmonol*. 2013;48(11):1112–8.
44. Proença-Módena JL, Gagliardi TB, Escremim de Paula F, Iwamoto MA, Criado MF, Camara AA, et al. Detection of Human Bocavirus mRNA in Respiratory Secretions Correlates with High Viral Load and Concurrent Diarrhea. *PLoS ONE*. 2011;6(6):e21083.
45. Durigon GS, Oliveira DBL, Vollet SB, Storni JG, Felício MCC, Finelli C, et al. Hospital-acquired human bocavirus in infants. *Journal of Hospital Infection*. 2010;76(2):171–3.
46. Souza EL, Ramos JG, PROENCA-MODENA JL, Diniz A, Carvalho G, Ciuffo I, et al. Human Bocavirus in Very Young Infants Hospitalized with Acute Respiratory Infection in Northeast Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics*. 2010;56(2):125–7.
47. Albuquerque MCM, Varella RB, Santos N. Acute respiratory viral infections in children in Rio de Janeiro and Teresópolis, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2012;54(5):249–55.
48. Gagliardi TB, Iwamoto MA, Paula FE, Proenca-Modena JL, Saranzo AM, Criado MF, et al. Human bocavirus respiratory infections in children. *Epidemiol Infect*. 2009;137(07):1032–6.
49. Söderlund-Venermo M, Lahtinen A, Jartti T, Hedman L, Kemppainen K, Lehtinen P, et al. Clinical assessment and improved diagnosis of bocavirus-induced wheezing in children, Finland. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(9):1423–30.
50. Hedman L, derlund-Venermo MS, Jartti T, Ruuskanen O, Hedman K. Dating of human bocavirus infection with protein-denaturing IgG-avidity assays—Secondary immune activations are ubiquitous in immunocompetent adults. *Journal of Clinical Virology*. 2010;48(1):44–8.
51. Don M, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Allander T, Korppi M. Don't forget serum in the diagnosis of human bocavirus infection. *J Infect Dis*. 2011;203(7):1031–3.

52. Deng X, Li Y, Qiu J. Human bocavirus 1 infects commercially available primary human airway epithelium cultures productively. *Journal of Virological Methods*. 2014;195:112–9.
53. Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, Magaret A, Zerr DM, Wald A, et al. Frequent and Prolonged Shedding of Bocavirus in Young Children Attending Daycare. *Journal of Infectious Diseases*. 2010;201(11):1625–32.
54. Proença-Modena JL, Paula FE, Buzatto GP, Carenzi LR, Saturno TH, Prates MC, et al. Hypertrophic Adenoid Is a Major Infection Site of Human Bocavirus 1. *J Clin Microbiol*. 2014;52(8):3030–7.
55. Lu X, Gooding LR, Erdman DD. Human Bocavirus in Tonsillar Lymphocytes. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(8):1332–3.
56. Proença-Módena JL, Buzatto GP, Paula FE, Saturno TH, Delcaro LS, Prates MC, et al. Respiratory viruses are continuously detected in children with chronic tonsillitis throughout the year. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2014;78(10):1655–61.
57. Kantola K, Sadeghi M, Antikainen J, Kirveskari J, Delwart E, Hedman K, et al. Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. *J Clin Microbiol*. 2010;48(11):4044–50.
58. Manning A, Russell V, Eastick K, Leadbetter GH, Hallam N, Templeton K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis*. 2006;194(9):1283–90.
59. Hindiyeh MY, Keller N, Mandelboim M, Ram D, Rubinov J, Regev L, et al. High rate of human bocavirus and adenovirus coinfection in hospitalized Israeli children. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):334–37.
60. Chen L, Yao Q, Ma J, Li J, Zhang Q, Yang Y, et al. A novel integrated strategy for detection of human bocavirus based on a heminested PCR assay combined with boiling lysis method of samples in human specimens. *Journal of Virological Methods*. 2014;203:48–53.
61. Sloots T, Mcerlean P, Speicher D, Arden K, Nissen M, Mackay I. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *Journal of Clinical Virology*. 2006;35(1):99–102.
62. Schildgen O, Müller A, Allander T, Mackay IM, Völz S, Kupfer B, et al. Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(2):291–304.
63. Martin ET, Kuypers J, McRoberts JP, Englund JA, Zerr DM. Human Bocavirus 1 Primary Infection and Shedding in Infants. *Journal of Infectious Diseases*. 2015; Jan 28 [Epub ahead of print].
64. Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HGM, Lehtinen P, Osterback R, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*. 2007;44(7):904–10.

65. Christensen A, Døllner H, Skanke LH, Krokstad S, Moe N, Nordbø SA. Detection of spliced mRNA from human bocavirus 1 in clinical samples from children with respiratory tract infections. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(4):574–80.
66. Court SDM. The definition of acute respiratory illnesses in children. *Postgraduate Medical Journal*. 1973;49:771–6.
67. Bordley WCW, Viswanathan MM, Lohr KNK, 7. Diagnosis and testing in bronchiolitis: a systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004;158(2):119–26.
68. Dare RK, Fry AM, Chittaganpitch M, Sawanpanyalert P, Olsen SJ, Erdman DD. Human Coronavirus Infections in Rural Thailand: A Comprehensive Study Using Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;196(9):1321–8.
69. Kodani M, Yang G, Conklin LM, Travis TC, Whitney CG, Anderson LJ, et al. Application of TaqMan Low-Density Arrays for Simultaneous Detection of Multiple Respiratory Pathogens. *J Clin Microbiol*. 2011;49(6):2175–82.
70. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human Bocavirus: A Novel Parvovirus Epidemiologically Associated with Pneumonia Requiring Hospitalization in Thailand. *Journal of Infectious Diseases*. 2007;195(7):1038–45.
71. Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, Mackay IM, Sloots TP, Fry AM, et al. Real-Time PCR Assays for Detection of Bocavirus in Human Specimens. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3231–5.
72. Lu X, Holloway B, Dare RK, Kuypers J, Yagi S, Williams JV, et al. Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Comprehensive Detection of Human Rhinoviruses. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):533–9.
73. Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Åkerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol*. 2003;70(2):228–39.
74. Morgan OW, Chittaganpitch M, Clague B, Chantira S, Sanasuttipun W, Prapasiri P, et al. Hospitalization due to human parainfluenza virus-associated lower respiratory tract illness in rural Thailand. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2012;7(3):280–5.
75. Woo PCY, Lau SKP, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y, et al. Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *Journal of Virology*. 2005;79(2):884–95.
76. Hahsler M, Grun B, Hornik K. arules – A Computational Environment for Mining Association Rules and Frequent Item Sets. *Journal of Statistical Software*. 2005;14(15):1–25.
77. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. [Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2005 Jan. Available from: <http://http://www.R-project.org/>. [Acessado em 10 de junho de 2015].

78. Zhang C, Zhu N, Xie Z, Lu R, He B, Liu C, et al. Viral Etiology and Clinical Profiles of Children with Severe Acute Respiratory Infections in China. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e72606.
79. Durigon GS, Oliveira DBL, Felicio MCC, Finelli C, Pereira MFB, Storni JG, et al. Poor Outcome of Acute Respiratory Infection in Young Children with Underlying Health Condition in Brazil. *International Journal of Infectious diseases*. 2015;34:3–7.
80. Sly PD, Jones CM. Viral co-detection in infants hospitalized with respiratory disease: is it important to detect? *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(4): 277-80.
81. Chorazy ML, Lebeck MG, McCarthy TA, Richter SS, Torner JC, Gray GC. Polymicrobial Acute Respiratory Infections in a Hospital-based Pediatric Population. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(5):460–6.
82. Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. *J Med Virol*. 2008;80(10):1843–9.
83. Calvo C, García-García ML, Blanco C, Vázquez MC, Frías ME, Pérez-Breña P, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *Journal of Clinical Virology*. 2008;42(3):268–72.
84. Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le Roux P, Deschildre A, Forget C, et al. In Very Young Infants Severity of Acute Bronchiolitis Depends On Carried Viruses. *PLoS ONE*. 2009;4(2):e4596.
85. Ferraro AA, Ferronato AE, Sacramento PICRD, Botosso VF, Oliveira DBL de, Marinheiro JC, et al. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87 (4): 1-7.
86. Nascimento MS, Souza AV de, Ferreira AV de S, Rodrigues JC, Abramovici S, Silva Filho LVFD. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. *Clinics*. 2010;65(11):1133–7.
87. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatrica*. 2009;98(1):123–6.
88. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent Detection of Viral Coinfection in Children Hospitalized With Acute Respiratory Tract Infection Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(7):589–94.
89. Cantais A, Mory O, Pillet S, Verhoeven PO, Bonneau J, Patural H, 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*. 2014;60(4):402–7.
90. Ahn JG, Choi SY, Kim DS, Kim KH. Human bocavirus isolated from children with acute respiratory tract infections in Korea, 2010-2011. *J Med Virol*. 2014;86:2011-18.

91. Esposito S, Daleno C, Prunotto G, Scala A, Tagliabue C, Borzani I, 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*. 2012;7(1):18–26.
92. Hasan R, Rhodes J, Thamthitiwat S, Olsen SJ, Prapasiri P, Naorat S, et al. Incidence and Etiology of Acute Lower Respiratory Tract Infections in Hospitalized Children Younger Than 5 Years in Rural Thailand. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(2):e45–e52.
93. Nunes MC, Kuschner Z, Rabede Z, Madimabe R, Van Niekerk N, Moloi J, et al. Clinical Epidemiology of Bocavirus, Rhinovirus, Two Polyomaviruses and Four Coronaviruses in HIV-Infected and HIV-Uninfected South African Children. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e86448.
94. Uršič T, Jevšnik M, Žigon N, Krivec U, Beden AB, Praprotnik M, et al. Human bocavirus and other respiratory viral infections in a 2-year cohort of hospitalized children. *J Med Virol*. 2011;84(1):99–108.
95. Piotrowska Z, Vazquez M, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. Rhinoviruses Are a Major Cause of Wheezing and Hospitalization in Children Less Than 2 Years of Age. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;28(1):25–9.
96. Deng Y, Gu X, Zhao X, Luo J, Luo Z, Wang L, et al. High Viral Load of Human Bocavirus Correlates with Duration of Wheezing in Children with Severe Lower Respiratory Tract Infection. *PLoS ONE*. 2012;7(3):e34353.
97. Smit PM, Pronk SM, Kaandorp JC, Weijer O, Lauw FN, Smits PHM, et al. RT-PCR detection of respiratory pathogens in newborn children admitted to a neonatal medium care unit. *Pediatr Res*. 2012;73(3):355–61.
98. Nascimento-Carvalho CM, Ribeiro C, Cardoso M-RA, Barral A, Araújo-Neto CA, Oliveira JR, et al. The Role of Respiratory Viral Infections Among Children Hospitalized for Community-Acquired Pneumonia in a Developing Country. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(10):939–41.
99. Wang M, Cai F, Wu X, Wu T, Su X, Shi Y. Incidence of viral infection detected by PCR and real-time PCR in childhood community-acquired pneumonia: A meta-analysis. *Respirology*. 2015;20(3):405–12.
100. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. Spectrum of Respiratory Viruses in Children With Community-acquired Pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(8):808–13.
101. World Health Organization. Pneumonia. WHO Fact Sheet [Internet]. 331st ed. Geneva; 2014 Nov 1;1–5. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en>
102. Maakaroun NR, Moanna A, Jacob JT, Albrecht H. Viral infections associated with haemophagocytic syndrome. *Rev Med Virol*. 2010;20(2):93–105.
103. Usmani GN, Woda BA, Newburger PE. Advances in understanding the pathogenesis of HLH. *Br J Haematol*. 2013;161(5):609–22.

104. Ansuini V, Rigante D, Esposito S. Debate around infection-dependent hemophagocytic syndrome in paediatrics. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13(1):15-23.
105. Kerr JR. A review of blood diseases and cytopenias associated with human parvovirus B19 infection. *Rev Med Virol*. 2015 May 11; [Epub].
106. Shrestha B, Omran A, Rong P, Wang W. Report of a Fatal Pediatric Case of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Associated with Pandemic Influenza A (H1N1) Infection in 2009. *Pediatrics and Neonatology*. 2015;56(3):189–92.
107. Beffermann N, Pilcante J, Sarmiento M. Acquired hemophagocytic syndrome related to parainfluenza virus infection: case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2015;9(78):1–5.
108. Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*. *Curr Top Microbiol Immunol*; 2010;343:195–224.
109. Calvo C, García-García ML, Blanco C, Santos MJ, Pozo F, Pérez-Breña P, et al. Human bocavirus infection in a neonatal intensive care unit. *Journal of Infection*. 2008;57(3):269–71.
110. Piralla A, Lunghi G, Percivalle E, Viganò C, Nasta T, Pugni L, et al. FilmArray® respiratory panel performance in respiratory samples from neonatal care units. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Elsevier Inc; 2014;79(2):183–6.
111. Chieochansin T, Kapoor A, Delwart E, Poovorawan Y, Simmonds P. Absence of Detectable Replication of Human Bocavirus Species 2 in Respiratory Tract. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(9):1503–5.
112. Han T-H, Chung J-Y, Hwang E-S. Human Bocavirus 2 in Children, South Korea. *Emerging infectious diseases*. 2009;15(10):1699–700.
113. Song J-R, Jin Y, Xie Z-P, Gao H-C, Xiao N-G, Chen W-X, et al. Novel Human Bocavirus in Children with Acute Respiratory Tract Infection. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(2):324–7.
114. Koseki N, Teramoto S, Kaiho M, Gomi-Endo R, Yoshioka M, Takahashi Y, et al. Detection of Human Bocaviruses 1 to 4 from Nasopharyngeal Swab Samples Collected from Patients with Respiratory Tract Infections. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):2118–21.

ANEXO I

PROTOCOLO VÍRUS RESPIRATÓRIOS

A) Identificação

Nome:

RG:

Data Nascimento:

AT:

Data Internação:

Sexo:

Data Coleta:

Data Alta/ Óbito:

Telefone Contato:

Local Internação:

B) Sinais e Sintomas

1) Início sintomas:

2) Tosse	S	N	I
Tosse > 1 semana	S	N	I
Tosse > 2 semanas	S	N	I
Tosse > 4 semanas	S	N	I
Tosse paroxística	S	N	I
Tosse com guincho	S	N	I
3) Sibilos	S	N	I
4) Taquipnéia	S	N	I
5) FR:			
6) Dispnéia	S	N	I
7) Cianose	S	N	I
8) Apnéia/Pausa	S	N	I
9) Febre	S	N	I
Febre ≥ 39	S	N	I
10) Coriza	S	N	I
Hialina	S	N	I
Mucopurulenta	S	N	I
11) Secreção ocular	S	N	I
12) Diarréia	S	N	I
13) Sat O2			

C) Sinais Gravidade

1) O2	S	N	I
2) UTI			
Tempo:	S	N	I
3) VM			
Tempo:	S	N	I
4) VNI			
Tempo:	S	N	I
5) ATB	S	N	I
Nome:			
Macrolídeo	S	N	I

D) Diagnósticos:**E) Exames**

1) Rx Torax	S	N	I
BE	S	N	I
PNM alveolar	S	N	I
PNM não alveolar	S	N	I
DP	S	N	I
Atelectasia	S	N	I
Normal	S	N	I
2) PCR	S	N	I
Valor			
3) VHS	S	N	I
Valor			

4) HCM	S	N	I
Resultado			
5) HMG	S	N	I
Leucócitos			
Neutrófilos			
Linfócitos			

F) Antecedentes Pessoais

1) História prévia sibilância	S	N	I
2) Uso corticóide inalatório	S	N	I
3) Uso inibidor leucotrieno	S	N	I
4) Diagnóstico asma	S	N	I
5) História prévia bronquiolite	S	N	I
6) Cardiopatia	S	N	I
Qual:			
7) Sd Genética	S	N	I
Qual:			
8) Encefalopatia	S	N	I
9) Pneumopatia não asma	S	N	I
10) DRGE	S	N	I
11) Imunodeficiência	S	N	I
12) Broncodisplasia	S	N	I
13) Prematuridade	S	N	I
Semanas:			
14) Medicação imunossupressora	S	N	I
15) Usa O2 domiciliar	S	N	I
16) Outra doença de base:			

G) Antecedentes Familiares

1) Contato TB	S	N	I
2) Antecedente atopia	S	N	I
3) Familiar com tosse	S	N	I
4) Contato com crianças	S	N	I
5) Creche	S	N	I
6) Tabagistas	S	N	I

H) Vacinação

1) DPT	S	N	I
Num Doses:			
2) Pneumococo	S	N	I
Qual:			
Num Doses:			
3) Influenza	S	N	I
Qual:			
Datas:			
4) Palivizumab	S	N	I
Datas:			

I) Outros

Peso:	Estatura:		
Tempo Leite Materno:			
Parto	Vaginal	Cesária	Ignorado
Moradia:			
Num cômodos:			
Num pessoas:			

ANEXO II

Protocolo de Vírus Respiratórios UNN

Nome:
 Data de Nascimento: Data alta:
 RG do RN:
 RG materno:
 IG (Ballard): Sexo:
 Apgar:
 PN: Comprimento: PC:

 PIG AIG GIG
 Tipo de Parto: vaginal Cesária
 Desconforto Respiratório:
 ___ TTRN
 ___ SDR
 ___ DR Adaptativo
 ___ BCP
 Malformações : ___ sim ___ não Qual?
 Cardiopatia: ___ sim ___ não Qual?
 Surfactante: ___ sim ___ não n° de doses:
 Broncodisplasia: ___ sim ___ não
 Leite Materno: ___ sim ___ não
 ECN: ___ sim ___ não
 Uso de O2 : Início
 Fim
 Uso VM : Início
 Fim
 Uso VM não invasiva: Início
 Fim
 Uso de ATB:
 Nome:
 Início :
 Fim:
 Exames iniciais: HMG
 PCR

HC:
RX tórax

Data da coleta:

O2: __ sim __ não VM : __ sim __ não

VMNI: __ sim __ não

Sintomas Gerais

1-Tosse	6- Hipotermia
2-Sibilos	7- Apneia/ Pausa
3-Dispnéia	8- Hipoglicemia
4- Taquipneia	9- Resíduo
5- Febre	10- Hipoatividade

Outras Coletas

Data:

IG corrigida: Dias de vida:

Necessidade de __ O2 __ VM __ VMNI

Sintomas Gerais:

Piora dos exames:

ANEXO III

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa: “Vírus respiratórios: Características clínicas e epidemiológicas de lactentes hospitalizados com infecção respiratória aguda..”

Pesquisador responsável:

Nome: Giuliana Stravinskas Durigon

CRMSP: 117677

Cargo: Médica assistente do Departamento de Pediatria e Puericultura Santa Casa SP

Endereço: R. Dr. Cesário Motta Jr, 112, Santa Cecília, SP CEP 01221020

Tel: 21767000 Ramal 5481

Orientador: Dr. Eitan Naaman Berezin, chefe da disciplina de Infectologia Pediátrica Santa Casa SP.

As infecções nos pulmões das crianças podem ser causadas por vírus, bactérias e fungos ou por uma junção desses micróbios. Essa pesquisa servirá para saber quais são os vírus que infectam as crianças que são internadas com infecção no pulmão. Vai ser colhida uma pequena quantidade de catarro do nariz da criança com um caninho fino que se chama sonda durante a fisioterapia respiratória que serve para retirar o catarro e melhorar a respiração. Essa coleta é rápida, não traz nenhum risco para a criança, não machuca mas pode incomodar um pouco. O catarro colhido será então levado ao laboratório para procurar vírus respiratório. Todo material que sobrar será jogado fora de forma correta, respeitando as leis ambientais e sanitárias para não provocar danos ou riscos às outras pessoas ou ao meio ambiente. Um questionário com informações sobre a doença atual, doenças passadas e condições de saúde da criança será realizado com o responsável legal. Informações técnicas escritas no prontuário médico e que ajudarão no entendimento da pesquisa serão anotadas. O resultado da pesquisa poderá ajudar na decisão de quais remédios ajudarão no tratamento da infecção pulmonar. Conhecendo quais são os vírus que causam infecção respiratória nas crianças novos tipos de tratamento poderão ser inventados no futuro. A participação na pesquisa não é obrigatória e a desistência poderá ocorrer a qualquer momento. Nenhum prejuízo acontecerá no tratamento da criança se não aceitar participar da pesquisa ou se desistir a qualquer momento. A pesquisa não tem objetivo de tratamento e a participação é voluntária e sem custos ao paciente. As informações e resultados da pesquisa poderão ser usadas para tese de pós graduação (mestrado e/ ou doutorado), para apresentação em congresso científico e para publicação em revista científica, respeitando o sigilo médico. Qualquer dúvida ou informação sobre a pesquisa poderá ser solicitada a qualquer momento ao pesquisador responsável.

Eu,responsável pelo menor....., entendi as informações sobre a pesquisa e aceito participar.

São Paulo,de.....de200.....

.....
Responsável legal

.....
Dra Giuliana Stravinskas Durigon

Pesquisadora responsável

ANEXO IV

Conjunto de amostras idênticas obtidas do alinhamento de 409 nucleotídeos das sequências brasileiras, utilizadas na análise de genotipagem.

Representante	Representadas												
BR09_SP678 (17)	SP215	SP573	SP627	SP618	SP573	SP890	SP883	SP873	SP870	SP217	SP222	SP228	SP232
	SP554	SP535	SP504	SP501									
BR08_SP74 (23)	SP181	SP529	SP297	SP479	SP253	SP259	SP186	SP202	SP219	SP229	SP243	SP623	SP475
	SP273	SP549	SP446	SP214	SP216	SP693	SP530	SP411	SP476	SP309			
BR08_108 (9)	Ber62	Ber71	Ber74	SP187	SP186	SP213	SP218	SP226	SP238				
BR08_SP06 (47)	SP07	SP52	SP117	SP121	SP122	SP141	SP158	SP159	SP170	SP175	SP176	SP177	SP193
	SP198	SP203	SP205	Ber30	SP967	SP946	SP929	SP940	SP914	SP845	SP742	SP692	SP651
	SP616	SP613	SP600	SP597	SP577	SP533	SP522	SP520	SP513	SP480	SP471	SP418	SP398
	SP419	SP423	SP324	SP315	SPEx1	SP251	SP253	SP300					
BR08_SP154 (30)	SP240	SP559	SP322	SP272	SP305	SP306	SP307	SP206	SP207	SP231	SP137	SP12	SP82
	SP190	SP25	SP325	SP498	SP618	SP712	SP888	SP602	SP133	SP150	SP444	SP287	SP499
	SP670	SP876	SP169	SP400									
BR08_SP51 Ber (4)	SP195	SP220	SP234	SP241									
BR08_SP173 (10)	SP340	SP72	SP182	SP183	SP191	SP197	SP208	SP225	SP244	SP255			