

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA – FACULDADE DE
CIÊNCIAS MÉDICAS**



**ETIOLOGIA DAS
INFEÇÕES
RESPIRATÓRIAS VIRAIS
EM CRIANÇAS EM IDADE
PRÉ-ESCOLAR**

CÁTIA MARINA RODRIGUES DA PIEDADE

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

MAIO 2013

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA – FACULDADE DE
CIÊNCIAS MÉDICAS**



**ETIOLOGIA DAS INFEÇÕES
RESPIRATÓRIAS VIRAIS EM
CRIANÇAS EM IDADE PRÉ-
ESCOLAR**

CÁTIA MARINA RODRIGUES DA PIEDADE

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Orientador: Professor Doutor Paulo Paixão

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

MAIO 2013

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação

- **“Estudo comparativo das infeções respiratórias virais em crianças que permanecem na creche e/ou domicílio e nas que recorrem a uma urgência hospitalar”**, Cátia Piedade^{1,3}, Paulo Paixão^{1,3}, Ana Carvalho², Madalena Santos⁴, Maria José Silvestre⁴, Laura Brum^{1,3}, Teresa Marques^{3,5}, Nuno Neuparth³; apresentação de poster no “XI congresso nacional de doenças infecciosas e Microbiologia Clínica” que se realizou no Porto em Dezembro de 2012;

¹Hospital da Luz – Laboratório de Patologia Clínica (Labco).

²Hospital da Luz – Pediatria.

³CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa.

⁴Hospital Curry Cabral.

⁵Laboratório de Microbiologia - Hospital Egas Moniz, CHLO.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Professor Paulo Paixão pela oportunidade de realizar a minha tese de mestrado sobre a sua orientação e também por me ter proporcionado a possibilidade de participar no projeto “ENVIRH”. Obrigada pela paciência, dedicação e por ter sempre depositado um voto de confiança no meu trabalho. Pelo constante incentivo e pelas constantes críticas que sem dúvida foram essenciais para a realização deste trabalho. É um orgulho poder trabalhar ao seu lado.

Um especial agradecimento à Professora Teresa Marques por me ter proporcionado a oportunidade de realizar a minha tese de mestrado no seu departamento, o que para mim foi um privilegio e um orgulho.

Um muito obrigada à Dra. Madalena Almeida Santos pela preciosa ajuda e por toda a disponibilidade e infinita paciência que teve comigo, muito obrigada por tudo. À Dra. Maria José Silvestre por ter autorizado que a prática deste trabalho tenha sido realizada no seu serviço.

À Mestre Maria Jesus Chasqueira um muito obrigada pela ajuda, pelo constante apoio e pela amizade. Um obrigada à Lúcia e Oflia pelo constante incentivo e simpatia.

Aos meus pais e irmão não preciso de muitas palavras, vocês são tudo, muito obrigada por tudo, sem vocês nada disto era possível. À minha mãe um obrigada especial pela paciência, constante incentivo e por nunca me ter deixado desistir.

À Dra. Paula um obrigada seria pouco por tudo o que me tem ajudado e por nunca me ter deixado desistir.

Aos meus verdadeiros amigos, os que realmente o são sabem a quem me dirijo, e sabem o quanto foi difícil para mim chegar até aqui, obrigada por todo o apoio, sei que durante a realização deste trabalho não fui, muitas vezes, um boa companhia, prometo recompensar-vos.

Aos meus colegas deste mestrado, atualmente amigos, Joana, Catarina, João e Ana Rita foi um prazer conhecer-vos, obrigada pelos bons momentos proporcionados.

Obrigada a todos que de uma maneira ou de outra ajudaram na elaboração deste trabalho.

Resumo

Os vírus respiratórios continuam a ocupar um papel relevante na morbidade e mortalidade infantil, tendo na última década sido alargado o espectro de vírus potencialmente causadores das infeções respiratórias. O diagnóstico destas infeções pode ser efetuado por várias metodologias, sendo as técnicas de biologia molecular consideradas as mais sensíveis para este fim.

No âmbito do Projeto Ambiente e Saúde em Creches e Infantários (ENVIRH) foi efetuada uma comparação da prevalência dos principais vírus respiratórios em crianças em idade pré-escolar, com critérios de infeção respiratória, recorrendo a técnicas de biologia molecular, em duas populações: crianças que se encontravam na escola/domicílio e crianças que recorreram a uma urgência hospitalar.

O estudo decorreu em dois períodos, de Fevereiro a Maio de 2011 e de Outubro de 2011 a Abril de 2012. Foram efetuadas duas colheitas de zaragoas, uma nasal e outra orofaríngea. A metodologia utilizada para a identificação viral nas amostras foi a PCR e RT-PCR multiplex em tempo real. Os vírus pesquisados foram: Influenza A e B, Parainfluenza 1-4, Metapneumovirus humano, Vírus Sincicial respiratório (VSR), Rinovírus, Enterovírus, Coronavírus e Bocavirus.

Foram realizadas 100 colheitas em crianças com idades compreendidas entre os 5 meses e os 5 anos. Foram obtidas 64 amostras dos infantários/domicílios, das quais 47 foram positivas. Da urgência Hospitalar obtiveram-se 36 amostras, em que 32 foram positivas. O vírus da gripe A (H3) foi o mais frequentemente detetado nas duas populações, mas apenas durante o surto de 2012. O VSR e os adenovírus foram mais frequentes nas crianças que recorreram ao hospital, ao contrário dos enterovirus e dos coronavírus, que não foram detetados nesta população. Os bocavirus nunca foram detetados isoladamente.

Este estudo reforça a importância de se utilizarem técnicas de biologia molecular para o diagnóstico etiológico das infeções respiratórias, devido à elevada sensibilidade das mesmas, o que se reflete na elevada percentagem de amostras positivas. O facto de se utilizarem técnicas “multiplex”, que permitem a pesquisa simultânea de vários vírus, facilita a deteção de um maior espectro destes agentes. A elevada prevalência de Influenza A H3N2 deveu-se ao facto de grande parte do estudo ter coincidido com um período de surto por este vírus. O sistema de alerta montado durante o projeto ENVIRH pareceu promissor para uma eventual utilização futura em períodos de atividade gripal.

Abstract

In the last decade, as respiratory viruses keep representing a relevant factor in child morbidity and mortality, the spectrum of viruses that may potentially cause respiratory infections has been widened. Within the several methodologies that may be applied in the diagnosis of these types of infections, the ones that use molecular biology are considered to be the most sensitive.

The Environment and Health in Daycares and Nurseries Project (ENVIRH) arranged for a study, by means of molecular biology techniques, on the main respiratory viruses' influence in pre-school aged children with respiratory infection symptoms. This study compared children in two different populations: children at school or at home and children that were taken to a hospital emergency service.

The study was conducted in two different time periods, one from February to May 2011 and the other from October 2011 to April 2012. During this time, two swab collections were held, one nasal and one oropharyngeal. PCR and RT-PCR multiplex in real time techniques were used for viral identification of the samples, searching for the viruses Influenza A and B, Parainfluenza 1-4, human Metapneumovirus, Respiratory Syncytial Virus (RSV), Rhinovirus, Enterovirus, Coronavirus and Bocavirus.

One hundred (100) collections were held in children between the ages of 5 months and 5 years, sixty-four (64) at home/school and thirty-six (36) at the hospital's emergency service. From a total of seventy-nine (79) positive samples, forty-seven (47) were obtained at home/school and thirty-two (32) at the hospital. The virus detected the most in both populations was the Influenza A (H3), but only during the outbreak of 2012. Unlike the enteroviruses and coronaviruses, that were not detected within this population, the RSV and the adenoviruses were most common within the children at the hospital. Bocaviruses were never detected isolated from other viruses.

The high percentage of positive samples reinforces the significance of using molecular biology techniques for the etiological diagnosis of respiratory infections. The use of multiplex techniques, that make the simultaneous search for multiple viruses possible, enhances the detection of a larger spectrum of such agents. Most of the study coincided with an outbreak of the Influenza A H3N2 virus, thus explaining the high number of its cases identified. The alert system set up during the ENVIRH project looked promising enough for eventual periods of flu activity in the future.

Abreviaturas

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

HIV - *Human immunodeficiency virus*

PCR – *Polimerase chain reaction*

RNA - *Ribonucleic acid*

RT-PCR – *Reverse transcription- Polimerase chain reaction*

Índice

1. Introdução	1
1.1. Infecções respiratórias em crianças	4
1.2. Infecções respiratórias virais	6
1.2.1. Infecções do trato respiratório superior	7
1.2.2. Infecções do trato respiratório inferior	8
1.3. Principais vírus respiratórios	11
<i>1.3.1. Adenoviridae</i>	11
<i>1.3.2. Orthomyxoviridae</i>	14
<i>1.3.3. Paraxomyxoviridae</i>	20
1.3.3.1. Vírus parainfluenza	21
1.3.3.2. Vírus sincicial respiratório	23
1.3.3.3. Metapneumovirus humano	26
<i>1.3.4. Coronaviridae</i>	29
1.3.4.1. Coronavírus	29
<i>1.3.5. Picornoviridae</i>	32
1.3.5.1. Rinovírus	32
1.3.5.2. Enterovírus	34
<i>1.3.6. Parvoviridae</i>	36
1.3.6.1. Bocavirus humano	36
1.4. Diagnóstico dos vírus respiratórios	38
1.4.1. Cultura para isolamento de vírus	40
1.4.2. Detecção de antigénios	40
1.4.3. Teste de ácidos nucleicos	41

2. Material e Métodos	43
2.1. População estudada	44
2.2. Técnicas de extração de ácido nucleico	45
2.3. Técnicas de PCR em tempo real	48
3. Resultados	56
3.1. Prevalência da infecção viral	57
3.2. Frequência por agente viral	59
3.2.1. Resultados globais	59
3.2.2. Resultados obtidos no ano 2011	60
3.2.3. Resultados obtidos no ano 2012	63
3.3. Relação com gravidade do quadro	66
3.4. Comparação do quadro clínico dos diferentes agentes virais	68
3.5. Vacinação	69
3.6. Distribuição dos agentes virais pelas diferentes creches e respectivas salas	70
3.7. Distribuição dos diferentes agentes virais com a idade das crianças	72
4. Discussão resultados	73
5. Conclusões	79
6. Referências bibliográficas	85
7. Anexos	95

1 -Introdução

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação foi inserido no projeto “Ambiente e Saúde em creches e infantários - ENVIRH”, (projeto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia – PTDC/SAU-ESA/100275/2008), e que teve como instituições intervenientes: a Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCM-UNL), o Centro Hospitalar de Lisboa Central (CHLC, EPE), a Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT-UNL), o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSARJ) e o Laboratório Nacional de Engenharia Civil (LNEC). A coordenação do Projeto esteve a cargo da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (Investigador principal: Professor Doutor Nuno Neuparth), mas dado que o Departamento de Microbiologia (Diretora do Departamento: Professora Doutora Teresa Marques) desta instituição também tinha um papel crucial neste projeto, assim como na organização da quarta edição do Mestrado em Microbiologia Médica da Universidade Nova de Lisboa, foram desta forma criadas as condições para a minha participação neste projeto.

Atendendo à falta de estudos sobre a relação entre a qualidade do ar interior e a saúde de crianças em infantários, este projeto focou-se num conjunto de problemas clínicos comuns no contexto das crianças que frequentam estas instituições. É do senso comum que as crianças adoecem frequentemente quando começam a frequentar os infantários e isto é particularmente verdade para alguns grupos de risco, como os latentes e as crianças em idade pré-escolar com sibilância. Foram definidos como objetivos específicos, para a tarefa em que participei, a relação entre a frequência das infeções respiratórias virais e a qualidade do ar ambiente dentro das salas de aula dos infantários participantes (ar esse que foi avaliado pela equipa de Engenheiros do LNEC), assim como também determinar a etiologia viral das infeções respiratórias em crianças em idade pré-escolar. Durante o estudo e devido a questões técnicas, o primeiro objetivo foi abandonado, pelo que a nossa tarefa ficou centralizada na determinação da etiologia viral das infeções respiratórias.

Numa primeira fase, foi realizada uma seleção dos infantários, com base na qualidade do ar dos mesmos, sendo nesta fase preliminar aplicados questionários sobre saúde respiratória e pedidos os consentimentos necessários para a realização do estudo (efetuada por outros elementos da equipa do projeto).

Seguidamente, e já com intervenção da equipa da microbiologia, foram criados critérios para a sinalização de casos de doença. Estes critérios baseavam-se na presença de infeção respiratória, tendo a criança que apresentar pelo menos duas das seguintes manifestações clínicas: tosse, febre, sibilância e/ou congestão nasal. Assim sendo, quando uma criança participante apresentava os critérios acima referidos, era sinalizado o caso de doença através de um número verde criado para o efeito e, desta forma, procedia-se a realização da colheita de zaragatoas da naso e orofaringe (na escola ou domicílio), sendo esta tarefa da minha responsabilidade.

Na segunda fase deste projeto, com o intuito de obtermos uma maior amostragem e de relacionarmos a etiologia viral com a gravidade das infecções respiratórias, alargou-se o estudo a uma Urgência Pediátrica, a fim de podermos obter amostras de casos de infeção respiratória presumivelmente mais graves; assim, seria possível comparar os agentes etiológicos nas duas situações, os casos de infeção que recorreram à urgência ou os que permaneceram no domicílio. Para esta amostragem hospitalar, foi escolhido o serviço de urgência do Hospital da Luz. Para além de se procurar relacionar os agentes identificados com a apresentação, gravidade e evolução do quadro clínico, procurou-se ainda determinar a importância clínica das co-infeções por estes agentes.

Assim, o trabalho desenvolvido teve como objetivos:

- O estudo da prevalência dos principais vírus respiratórios responsáveis por infeções respiratórias em crianças em idade pré-escolar, que permaneceram no domicílio/infantários ou que recorreram a uma urgência hospitalar;
- Avaliação da eficácia do sistema de sinalização das infeções respiratórias agudas.

1.1. Infecções respiratórias em crianças

As infecções do trato respiratório causam muitas das doenças pediátricas mais significativas tanto nas áreas desenvolvidas como nas sub-desenvolvidas do Mundo, sendo uma preocupação global a nível de saúde pública. A maioria das infecções do trato respiratório inferior em crianças é causada por vírus. Cerca de 20% das mortes em crianças com idades inferiores a cinco anos são devidas a infecções respiratórias agudas baixas (bronquiolite, pneumonia e bronquite), sendo que 90% destas mortes são de pneumonia, pelo que o reconhecimento precoce e o tratamento imediato desta doença são cruciais. (87, 99)

O número de casos de infecções respiratórias agudas é estimado em 94 037 000 por ano (OMS, 2002), com 3,9 milhões de mortes em todo o mundo. Assim, as infecções respiratórias agudas estão entre as principais causas de morte em crianças com menos de cinco anos de idade. (142)

Enquanto a maioria das crianças saudáveis utiliza as suas defesas naturais na luta contra a infeção, as crianças cujos sistemas imunológicos estão comprometidos estão em maior risco de desenvolver doenças respiratórias graves. Recém-nascidos com baixo peso, crianças desnutridas e não amamentadas, crianças com doenças pré-existentes, tais como HIV e sarampo, apresentam um risco aumentado de contrair pneumonia. Fatores ambientais como a poluição do ar, permanência em espaços lotados e pais com hábitos tabágicos, aumentam o risco de uma criança contrair pneumonia. (120, 142)

As infecções respiratórias superiores são muito frequentes mas raramente são graves, ao contrário das infecções respiratórias inferiores que são responsáveis por quadros potencialmente mais graves como a pneumonia, as bronquiolites ou a tuberculose, que são os principais contribuintes para a mortalidade acima referida. (85)

A grande variedade de vírus respiratórios que têm sido detetados frequentemente neste tipo de infeções, incluem o vírus influenza A e B, parainfluenza (1, 2 e 3), vírus sincicial respiratório (VSR), rinovirus, enterovirus e adenovirus. Desde o ano de 2000, o painel destes vírus foi alargado com novas descobertas incluindo os vírus da gripe aviária (H5N1, H7N9, H7N7 e H7N3), o metapneumovirus humano (HMPV), o vírus

responsável pela síndrome respiratória aguda grave (SARS), alguns novos coronavírus (NL63 e HKU1) e os Bocavirus. (20, 31, 61)

Vários estudos mostraram que o tipo de vírus e a respetiva carga viral pode influenciar as características clínicas das infecções. A presença de mais que um tipo de vírus na amostra respiratória também pode afetar a sintomatologia da infecção. No entanto, muitos aspetos da relação entre o tipo de vírus, o número de vírus detetados, a sua quantidade nas secreções respiratórias e a gravidade da doença em crianças permanecem por esclarecer. (31)

1.2. Infecções respiratórias virais

A infecção que se processa através da via respiratória inicia-se habitualmente por intermédio de aerossóis, secreções nasais ou através da saliva. As secreções nasais estão presentes em muitas das doenças respiratórias, ajudando na propagação do vírus, as mãos e objetos contaminados por secreções nasais parecem ser bons meios de propagação viral. A formação de aerossóis geralmente é desencadeada pelo espirro, pela tosse ou mesmo apenas pelo ato simples de falar. Estes quando inalados por indivíduos suscetíveis podem originar a infecção. (70)

As fossas nasais desempenham um papel de defesa no que diz respeito à entrada de partículas estranhas, sendo que devido às suas características e à sua camada de muco conseguem reter grande parte das partículas. Muitos microrganismos conseguem, apesar de tudo, ultrapassar essa barreira e causar infecção. A nível do pulmão, defesas imunológicas como as imunoglobulinas de superfície do tipo IgA, segregadas localmente, macrófagos e células NK (*natural killer*), funcionam de alertas à entrada de agentes infecciosos, evitando a instalação da infecção. (13)

Os fatores relacionados com variações físicas do ambiente, como a temperatura, humidade, vento e poluição, parecem ter alguma influência na transmissão das infecções das vias respiratórias. A disseminação do vírus na comunidade, sobretudo no que diz respeito a vírus respiratórios, é mais elevada em aglomerados humanos, como creches, escolas, quartéis, locais coletivos de trabalho pouco ventilados e transportes públicos. Os vírus que se eliminam nas vias aéreas mostram maior eficácia de disseminação na comunidade do que outros que possuem outras vias de eliminação. Como estes vírus sobrevivem por tempo limitado fora das células, é de supor que existam sempre na população pessoas infetadas, em condições de transmitir vírus respiratórios. (141)

Depois da entrada dos vírus no organismo, estes desenvolvem todo o seu ciclo de replicação, quer a nível da porta de entrada, quer noutros locais onde posteriormente se disseminam, embora os vírus que causam infecção das vias respiratórias, raramente se difundem pelo resto do organismo. A sua rápida replicação a nível das vias aéreas superiores tem como consequência que a maioria dos vírus respiratórios apresenta um período de incubação curto, geralmente de 2 a 5 dias. (111)

As infecções do trato respiratório dividem-se em infecções do trato respiratório superior e inferior, consoante a sua localização e os órgãos atingidos pela infeção.

1.2.1. Infeção do trato respiratório superior

As Infeções comuns do trato respiratório superior incluem:

- ✓ Constipação;
- ✓ Amigdalite;
- ✓ Sinusite;
- ✓ Laringite.

✓ Constipação

A síndrome da constipação é um conjunto de manifestações clínicas causadas por diferentes agentes microbianos. As constipações são de etiologia viral, como os rinovirus, que são responsáveis por mais de 40% dos casos. Muitos outros vírus têm sido implicados, incluindo coronavírus, VSR, vírus parainfluenza, adenovirus, enterovirus e coxsackievirus A e B. (4, 84)

A constipação é caracterizada por vários graus de congestão nasal, dores de garganta, conjuntivite e tosse. (144)

✓ Amigdalite

A amigdalite é uma inflamação circunscrita das amígdalas, uma doença normalmente provocada por uma infeção viral ou bacteriana. Ao início, o sintoma mais evidente costuma ser febre, que frequentemente ultrapassa os 39°C, acompanhada por mal-estar geral, sensação de prostração, sudação e dores de cabeça. Um outro sintoma

característico, por vezes o primeiro a surgir, é a dor de garganta, que se intensifica ao mover a cabeça e ao engolir. (111)

Agentes virais, como os rinovirus, coronavirus, adenovirus, influenza e parainfluenza, frequentemente causam faringoamigdalite associada a outras manifestações do aparelho respiratório. (4, 109)

✓ Sinusite

A sinusite é uma inflamação da mucosa de um ou mais dos seios peri nasais, sendo que o diagnóstico de sinusite em crianças passa habitualmente pela distinção entre uma simples infecção do trato respiratório superior e uma situação alérgica. (111)

✓ Laringite

A laringite é descrita como uma inflamação da laringe, resultando num quadro em que predomina a rouquidão, normalmente, associada à tosse e febre. Geralmente ocorre em crianças mais velhas e em adultos e está associada com a infecção viral. (4, 111)

1.2.2. Infecção do trato respiratório inferior

As infecções comuns do trato respiratório inferior, incluem:

- ✓ Laringotraqueobronquite – *Croup*;
- ✓ Bronquiolite;
- ✓ Pneumonia.

✓ **Laringotraqueobronquite - Croup**

O *croup* ou laringotraqueobronquite é uma doença respiratória que normalmente é desencadeada por uma infecção viral aguda das vias aéreas superiores. No entanto, como acaba por se estender ao aparelho respiratório inferior é designada por laringotraqueobronquite. (115)

A infecção leva a um edema na laringe, o que interfere com a respiração normal e é caracterizada por diferentes graus variáveis de estridor inspiratório, tosse e rouquidão resultante da obstrução da região da laringe. Os sintomas clínicos podem aumentar e existir um agravamento da clínica que pode incluir insuficiência respiratória com hipoxia, resultante da diminuição da troca de ar, e finalmente a morte. (1, 111, 115)

A etiologia das síndromes de *croup* é diversa e a consideração da possibilidade de causa não infecciosa no diagnóstico diferencial é de grande importância. (76)

A maioria dos casos de *croup* é causada pelos vírus parainfluenza humano tipos 1, 2 e 3, sendo estes os principais agentes causadores desta doença, destacando-se o tipo 3 que é responsável por aproximadamente 11% das hospitalizações pediátricas respiratórias. No entanto, outros vírus causam *croup*, como os adenovirus, Influenza A e B, rinovirus, VSR e enterovirus. (52, 119)

A maioria das crianças com *croup* não necessita de hospitalização. O tratamento é principalmente de suporte e destinado a manter as vias aéreas e hidratação. (115)

✓ **Bronquiolite**

A bronquiolite é uma infecção das vias aéreas que afeta lactentes e crianças jovens e começa geralmente com uma simples infecção do trato respiratório, com corrimento nasal, tosse, febre baixa, irritabilidade e perda de apetite. Rapidamente a criança piora e apresenta um quadro repentino de dispneia, com retração dos espaços intercostais, cianose e prostração. Aumentando a obstrução, esta leva a uma hipoxemia progressiva, que, se não aliviada, pode ser seguida por exaustão e morte.(4, 111)

Na maioria dos casos, incluindo também aqueles que precisam de hospitalização, a recuperação total da doença pode ocorrer em cerca de 1-2 semanas. (4)

O principal agente de bronquiolite é o VSR, representando cerca de 50 a 90% de todos os internamentos por bronquiolites, estando associado a uma substancial morbidade, e em menor grau de mortalidade. A seguir ao VSR, outros agentes como os vírus parainfluenza (1, 2 e 3), os vírus da gripe, os metapneumovirus e os adenovirus são também agentes comuns de bronquiolites. (121)

✓ **Pneumonia**

A pneumonia, com um peso global de 5 000 mortes de crianças todos os dias, é responsável por cerca de 21 % de todas as mortes em crianças com menos de 5 anos, estimando-se que em cada 1000 crianças nascidas vivas, 12-20 morrem de pneumonia antes de completarem os cinco anos, o que faz com que a pneumonia seja a principal causa de morte em crianças em todo o mundo. (120)

A pneumonia é uma das principais complicações das infecções respiratórias agudas, sendo esta uma forma de infecção respiratória aguda que afeta os pulmões. Quando um indivíduo apresenta um quadro de pneumonia, os alvéolos são preenchidos com pús e líquido, o que leva a dispneia e consequente hipoxemia. (4)

Os sintomas de pneumonia viral e bacteriana são semelhantes, sendo os mais comuns a dificuldades em respirar (dispneia), tosse, febre, calafrios, perda de apetite ou a sibilância (mais comum nas infecções virais). As manifestações clínicas dependem do agente microbiano, idade e estado imunológico da criança. A patologia pulmonar ou anormalidades estruturais podem complicar a apresentação clínica e a gestão da infecção.(111)

Os agentes etiológicos de pneumonia em crianças são variados, destacando-se vírus respiratórios como o VSR, vírus parainfluenza tipo 1 e 3, Influenza A e B e adenovirus. Além dos vírus anteriormente citados, muitas são as bactérias que também estão associadas a este tipo de infecções. (71, 117)

1.3. Principais Vírus Respiratórios

1.3.1. *Adenoviridae*

Os adenovirus humanos foram isolados pela primeira vez em 1953, de amígdalas e adenoides de crianças, o que, juntamente com a observação da sua afinidade para o tecido linfático, levou à designação de seu nome. (141) Os adenovirus são responsáveis por uma grande variedade de doenças em crianças, estando mais comumente associados a doença respiratória e do trato gastrointestinal (gastroenterites), mas manifestações cardíacas, neurológicas, cutâneas, urinárias e linfáticas podem também ocorrer frequentemente. (94)

Características gerais

Os adenovirus são vírus sem invólucro, constituídos por uma cápside proteica, fibras, núcleo e proteínas associadas. A cápside proteica apresenta uma simetria icosaédrica de aproximadamente 70 a 100 nm de diâmetro, sendo composta por 252 subunidades, ou capsómeros, de dois tipos distintos: hexôes (240) e pentôes (12). O genoma viral não é segmentado, sendo constituído por uma única molécula de DNA linear de cadeia dupla que codifica para proteínas estruturais e não-estruturais. Os determinantes antigênicos podem ser encontrados na cápside, nos hexôes e nas fibras. (4, 82, 111)

A família *Adenoviridae* inclui quatro gêneros: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus*, *Mastadenovirus*, sendo este último o responsável pela infecção nos humanos. A classificação é baseada em propriedades biológicas que conduzem a um sistema baseado em diferenças genômicas. Há pelo menos 52 serotipos imunologicamente distintos que podem causar infecções em humanos. Os adenovirus são invulgarmente estáveis a agentes químicos e físicos e às condições adversas de pH, permitindo desta forma uma sobrevivência prolongada fora do corpo. (2, 82, 94)

Todos os adenovirus apresentam um antígeno comum, dito de grupo, que é utilizado para o diagnóstico de infecções por estes vírus, independentemente do serotipo.(141)

Epidemiologia

Embora as características epidemiológicas dos adenovirus variem consoante o tipo, todos são transmitidos por contacto direto, transmissão fecal-oral e, ocasionalmente, através da água. Alguns serotipos podem estabelecer infecções persistentes nas amígdalas, adenóides e nos intestinos dos hospedeiros infetados. (94) Existe associação entre alguns serotipos e determinados quadros clínicos que serão descritos no ponto seguinte.

Manifestações Clínicas

A entrada dos adenovirus nos hospedeiros é através da boca, nasofaringe ou pela conjuntiva ocular. O período de incubação típico para uma gastroenterite é de 3-10 dias. Enquanto para uma infecção do trato respiratório o tempo de incubação é entre 2 a 14 dias. Os surtos são mais comuns no final do inverno, primavera e início do verão, embora as infecções por adenovirus possam ocorrer durante todo o ano. (4, 82)

Dos 52 serotipos, menos de metade produzem doença em seres humanos. Na população pediátrica, manifestações respiratórias da infecção por adenovirus incluem faringite febril aguda (serotipos 1 a 3 e 5 a 7), febre faringoconjuntival (serotipos 3, 7 e 14), pneumonia (serotipos 1 a 4 e 7) e síndrome semelhante à tosse convulsa (serotipo 5). (110)

Alguns serotipos como o 1, 2, 5 e 6 mostraram-se endémicos em algumas partes do mundo onde têm sido estudados, e a infecção é geralmente adquirida durante a infância. Outros serotipos causam infecção esporádica e surtos ocasionais, como por exemplo a queratoconjuntivite epidémica, que está associada aos serotipos 8,19 e 37. Epidemias de doença febril com conjuntivite estão associadas a alguns serotipos de adenovirus transmitidos pela água, muitas vezes centrado em torno de piscinas e

pequenos lagos. A doença respiratória aguda é mais frequentemente associada aos serotipos 4 e 7, e mais recentemente ao serotipo 14, nos Estados Unidos. (4, 110)

Os adenovirus entéricos 40 e 41 causam gastroenterite, geralmente em crianças. Para alguns serotipos de adenovirus, o espectro clínico da doença associada à infecção varia consoante a porta de entrada, assim, como exemplo, a infecção com o adenovirus 7 adquirida pela inalação é associada com doença do trato respiratório inferior grave, enquanto a transmissão oral do vírus normalmente não causa doença ou causa apenas numa forma leve. (94)

Os adenovirus causam mais comumente doença respiratória, no entanto, consoante o serotipo presente, pode também causar outras doenças, tais como gastroenterite, conjuntivite, cistite, entre outras. Os sintomas de infecção respiratória causada por estes vírus vão desde da comum constipação à pneumonia, laringite e bronquite. Latentes e indivíduos imunocomprometidos são mais suscetíveis a complicações graves da infecção por adenovirus. (4)

As infecções por adenovirus representam 5 a 10% de todas as doenças respiratórias em crianças. A infecção típica adenoviral produz tosse, congestão nasal e *croup* e é muitas vezes acompanhada de sintomas sistémicos como febre e cefaleias, calafrios, mal-estar e mialgias. O adenovirus são os agentes causais em aproximadamente 10% dos casos de pneumonia pediátrica. (94, 110)

Muitas vezes as infecções por adenovirus do aparelho respiratório são bastante difíceis de distinguir das provocadas por outros vírus respiratórios ou até mesmo de infecções bacterianas. (4)

Tratamento e Prevenção

A maioria das infecções são leves e não necessitam de terapêutica. Não existe também uma terapêutica específica para vírus, a doença grave por adenovirus pode ser tratada apenas tendo em conta os sintomas e complicações da infecção. (110)

Foram desenvolvidas vacinas para os serotipos 4 e 7, mas só estão disponíveis para a prevenção de doença aguda respiratória entre recrutas militares, embora a produção de vacinas tenha sido interrompida em 1999. Um bom controlo de infeção, incluindo o evitar o contacto direto, é eficaz para interromper surtos nosocomiais, tais como queratoconjuntivite epidémica. A manutenção do tratamento de piscinas e a higiene das mãos é recomendada em ambientes de grupo de cuidados infantis. (94)

1.3.2. *Orthomyxoviridae* – Vírus Influenza

A gripe é uma infeção respiratória aguda causada por vírus da família *Orthomyxoviridae*. Foi o primeiro vírus respiratório humano a ser isolado e caracterizado. (110)

Características gerais

Classificados taxonomicamente como orthomyxovirus, os vírus influenza são vírus de RNA de cadeia simples, com genoma segmentado, com três tipos principais, A, B e C, tendo o influenza A múltiplos subtipos. Os vírus influenza A e B são muito importantes em patologia humana, sendo que o tipo C raramente causa doença. (12, 110)

A estrutura do vírus influenza é irregular, apresentando partículas de 80 a 120 nm de diâmetro.(110). Para todos os tipos de Influenza A e B, as principais características da superfície residem nas suas glicoproteínas, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), enquanto o influenza C tem na sua constituição apenas a HA. (34, 110) As proteínas de todos os viriões são especificados pelo genoma segmentado viral, mas a bicamada lipídica e os constituintes de hidratos de carbono de glicoproteínas e glicolípidos no envelope viral são derivadas da célula hospedeira. (12, 151)

A variação antigénica dos vírus influenza ocorre através de dois processos: *drift* e *shift* antigénicos. A variação específica da HA e da NA é a base para o *drift* e *shift* antigénico dos vírus prevalentes. O *drift* implica uma pequena alteração em qualquer antígeno, devido a mutação, sem mudança do subtipo e ocorre nos vírus Influenza A e

B. O *shift* implica uma alteração importante num ou em ambos os antigénios, com a mudança do subtipo. O genoma segmentado permite esta mudança antigénica, dado que uma estirpe do vírus influenza A pode adquirir genes HA e NA a partir de vírus da gripe de subtipos diferentes. Este rearranjo do genoma pode levar à codificação de HA e NA completamente novas para o qual a população humana não tem imunidade preexistente. (66, 93, 110)

Os vírus influenza têm uma nomenclatura padrão que inclui o tipo de vírus, as espécies a partir do qual foi isolado (se não-humano), o local em que foi isolado, o número do isolamento, o ano do isolamento e, para os vírus influenza A, o subtipo de HA e NA. Assim, A/Panama/2007/1999 (H3N2) foi o isolado 2007 de gripe humana, no país do Panamá no ano de 1999, e tem o subtipo 3 de HA e o subtipo 2 de NA. (110)

Existem muitos subtipos geneticamente distintos de Influenza A, 16 subtipos de HA (H1 a H16) e 9 de NA (N1 a N9). Os 16 subtipos dos vírus influenza A foram recuperados a partir de aves aquáticas, que servem como reservatório natural do vírus e um forte potencial para novos genes de gripe pandémica. No entanto, como causadores de epidemias humanas apenas têm sido encontrados em circulação três subtipos de HA (H1, H2, H3) e dois de NA (N1 e N2). (55)

Epidemiologia

A gripe é a causa mais importante de doença respiratória aguda que leva os pacientes a procurarem o atendimento médico (41, 42, 90) Para além disso, vários estudos têm mostrado que os vírus influenza são os principais responsáveis pela hospitalização de crianças em idade pré-escolar e pessoas idosas com infeção respiratória aguda.(57, 97, 106)

O aumento da população e o aumento da densidade populacional contribuem para a propagação deste vírus a nível mundial. (40) O rápido movimento de pessoas por todo o Mundo permite que novas variantes ou subtipos se espalhem facilmente num curto espaço de tempo. (129)

Independentemente da idade, a gripe pode ser fatal com maior frequência em pessoas com doença cardíaca pré-existente, doenças crónicas pulmonares, diabetes

mellitus, doença renal crônica, doença neuromusculares, neoplasias e em pessoas com mais de 65 anos. (37)

Os vírus influenza A também podem infectar aves, suínos, cavalos, cães e mamíferos marinhos, sendo a transmissão interespecie relatada ao longo dos anos. Os vírus influenza B infectam apenas os seres humanos e os vírus influenza C parecem só infectar humanos e porcos, causando geralmente casos esporádicos de doença do trato respiratório superior. (12, 110)

O vírus também pode ser transmitido da mãe para o feto através da placenta, embora isso ocorra muito raramente. (9)

A gripe é altamente contagiosa (92), sendo facilmente transmitida através do contato direto com aerossóis/gotículas (tosse ou espirro), ou por mãos contaminadas com secreções respiratórias de indivíduos infectados. A transmissão pode efetuar-se desde um dia antes do aparecimento dos sintomas até 7 dias depois. A doença pode afetar todas as faixas etárias mas as taxas de infecção são mais elevadas nas crianças, sendo estas uma fonte potencial de infecção em grupos etários mais velhos. (152) A gripe, em primeiro lugar, espalha-se entre as crianças na escola, o que permite a introdução do vírus na família e comunidade e assim é feita a propagação na população adulta. (21, 42, 110)

Todos os anos, aproximadamente 20% da população mundial é infectada pela gripe, resultando numa significativa morbidade e mortalidade em todo o mundo. Infecções gripais ocorrem em epidemias em cada inverno, geralmente entre o final de dezembro e início de março. (130)

Embora as taxas de mortalidade mais elevadas ocorrem em adultos mais velhos, latentes e crianças jovens suportam uma carga de morbidade significativa de gripe, que ocasionalmente ultrapassa o VSR como causa de internamentos hospitalares em pediatria. (44)

✓ **Gripe sazonal**

A carga global média da epidemia anual da gripe pode ser da ordem de 1 bilhão de casos por ano, levando a 300.000-500.000 mortes em todo o mundo. Só nos EUA, o número de casos de influenza é atualmente estimada em 25-50 milhões de casos por ano (aproximadamente 20% da população), levando a 150 000-200 000 hospitalizações e 30.000-40.000 mortes. (44)

As epidemias e surtos de gripe ocorrem em diferentes padrões sazonais, dependendo da região do mundo: em zonas de clima temperado, as epidemias sazonais geralmente começam no final do outono e apresentam o seu pico máximo no meio do inverno, infectando cerca de 5-15% da população. Nas zonas tropicais, os padrões sazonais são menos pronunciados e o vírus pode ser isolado durante todo o ano. (146)

A ocorrência repetitiva de epidemias de gripe anuais é mantida através do processo contínuo de variação antigénica, o já referido *drift*, que conduz à constante emergência de novas variantes dos vírus contra os quais existe pouca ou nenhuma imunidade pré-existente na população. Por esta razão, as principais epidemias sazonais de influenza continuam a ocorrer a cada ano e as novas estirpes de vírus a serem incluídos na vacina do ano devem ser escolhidas para corresponder às variantes emergentes como já referido anteriormente. (39)

✓ **Gripe Pandémica**

Em intervalos imprevisíveis, devido à natureza segmentada do genoma do vírus influenza, as estirpes de influenza A que circulam também podem adquirir novos genes do vírus influenza aviário ou de outro animal. Este processo ocorre mais frequentemente nos porcos, uma vez que os porcos têm o conjunto completo de recetores para as estirpes do vírus da gripe nas aves e nos humanos. A co-infeção em suínos pode assim resultar no aparecimento de um vírus com uma glicoproteína diferente, *shift*, como descrito anteriormente. Se o vírus recombinante se espalhar de uma forma eficiente na população humana, uma pandemia pode ocorrer, como aconteceu em 1918, 1957, 1968 e 2009. (38, 78)

O surgimento recente de alta patogenicidade da gripe aviária H5N1 em diversos países da Ásia, de onde se espalhou para África e Europa, com transmissão aos seres humanos e com uma taxa de 60% de letalidade, reacendeu o medo de uma possível pandemia desta nova gripe, com alta mortalidade. (46) A ameaça de uma pandemia de gripe com origem aviária foi aumentada desde o surgimento em 1997, em Hong Kong, do vírus da gripe aviária H5N1, especialmente desde o reaparecimento de casos humanos em 2003-2004. A variante H5N1 é altamente patogênica para as aves e pássaros e pode infectar letalmente felinos e seres humanos. (39) O vírus não adquiriu até momento a capacidade de se espalhar de pessoa a pessoa e o surto foi controlado através do abate maciço das aves de capoeira. O vírus H5N1 reapareceu em 2003-2004 na China, Japão, e em seguida, Tailândia, Indonésia, Vietname, Camboja e Malásia, levando ao abate em massa das aves de capoeira. Mais de 60% dos pacientes em que foi diagnosticado o vírus faleceram. (19, 79)

Em abril de 2009, um novo vírus influenza A (H1N1) surgiu entre os seres humanos na Califórnia e no México, espalhando-se rapidamente por todo o mundo através da transmissão inter-humana, dando origem à primeira pandemia de gripe do século XXI. (19, 118)

O vírus encontrado não está antígenicamente relacionado com o vírus da gripe humana sazonal, mas sim geneticamente relacionado com vírus conhecidos que circulam nos porcos. Em virtude da sua provável origem suína, é muitas vezes referido como "vírus da gripe de origem suína" A/H1N1, ou vírus influenza A (H1N1) de 2009. (122, 128)

O nome "tríplice rearranjo" refere-se ao facto do vírus H1N1 apresentar genes de vírus da gripe de origem humana, de origem suína clássica e de origem aviária. Mais de 207 países e comunidades relataram casos confirmados de A/H1N1 em humanos em 2009. A maioria dos países do hemisfério sul relataram mais casos de H1N1 em 2009 do que qualquer um dos subtipos sazonais. Nas áreas temperadas do hemisfério norte, a propagação da pandemia foi mais gradual, espalhando-se inicialmente nos EUA, Espanha, Grã-Bretanha, Japão e Alemanha antes de atingir outros países..(36, 123)

O número real de casos de influenza A H1N1 em todo o mundo permanece desconhecido, uma vez que a maioria dos casos é diagnosticado clinicamente e não é confirmado laboratorialmente, mas estima-se que foi da ordem de vários milhões de casos. (22)

Uma característica da pandemia de H1N1 foi que as crianças e os jovens adultos foram os mais afetados. Um dos primeiros estudos americanos mostrou que embora a idade dos pacientes com H1N1 tenha variado entre 3 meses e 81 anos, 60% dos pacientes tinham menos de 18 anos de idade. (22, 59)

Manifestações clínicas

O período de incubação varia entre 24-72 horas. A doença é caracterizada pelo rápido início dos sintomas, em contraste com as típicas infecções do trato respiratório superior, que muitas vezes tem uma apresentação mais insidiosa. A sintomatologia inicial costuma incluir a febre alta e calafrios, associados a cefaleias, mal-estar e prostração. Conforme a doença progride, os sintomas respiratórios como a tosse, odinofagia e congestão nasal ficam mais proeminentes. Conjuntivite, vômitos e dor abdominal podem estar presentes. Mialgias significativas são muitas vezes parte da síndrome clínica. Miosite e manifestações do sistema nervoso central (SNC) podem também ocorrer. (4, 59)

Os sintomas ou sinais mais frequentemente encontrados em crianças com influenza A, são: anorexia, dor abdominal, vômitos, náuseas, adenopatias cervicais e temperaturas superiores a 38,9°C. A doença causada pelos vírus influenza B é menos severa em adultos. Estes últimos, podem causar uma epidemia em que as crianças terão uma gripe comum, com febre, mas muitos adultos na população terão a doença apenas com comprometimento do trato respiratório superior sem febre significativa. (73)

Virémia e complicações extra-respiratórias parecem ser mais comum no H5N1 em relação aos outros influenzas sazonais. Complicações pulmonares, como bronquite e pneumonia podem ocorrer particularmente em crianças imunocomprometidas e outras populações de alto risco, como em pacientes com fibrose quística, anemia falciforme,

diabetes e insuficiência renal crónica. A otite aguda é uma frequente complicação e é encontrada em 30% dos pacientes com confirmação laboratorial de doença. (46, 59, 73)

Tratamento e Prevenção

Uma vez que os vírus influenza A estão em constante mudança, os vírus a serem incluídos na vacina são atualizados anualmente, de modo a coincidir com as estirpes em circulação.(12)

1.3.3.Paramyxoviridae

A família *Paramyxoviridae* agrupa uma série de agentes heterogéneos, não só pelas suas propriedades biológicas e seu poder patogénico, assim como pela sua distribuição animal.(110)

Dentro desta família estão inseridos os principais agentes de infeção respiratória nas crianças em todo o mundo. Nesta família estão incluídos, também, dois vírus causadores de doenças altamente contagiosas predominantes nas crianças: o sarampo e a parotidite (papeira). (52)

A família *Paramyxoviridae* é distribuída por duas subfamílias:

- Subfamília *Paramyxovirinae*

- Género *Avulavirus*- sem vírus patogénicos para o homem;
- Género *Henipavirus* – vírus Hendra e vírus Nipah;
- Género *Respirovirus* - vírus parainfluenza humano (1 e 3) (HPIV-1 e HPIV-3);
- Género *Rubulavirus* - vírus parainfluenza humano (2 e 4) (HPIV-2 e HPIV-4) e vírus da parotidite;
- Género *Morbillivirus* - vírus do sarampo.

- Subfamília *Pneumovirinae*

- Género *Pneumovirus* - vírus sincicial respiratório humano (VSR);
 - Género *Metapneumovirus* - metapneumovirus humano (MPV).
- (2)

A família *Paramyxoviridae* engloba vírus com involucro e com genoma de RNA negativo. (6)

Dentro desta família são agentes respiratórios o VSR, os vírus parainfluenza e metapneumovirus. O vírus do sarampo e o vírus da parotidite epidémica são vírus de transmissão respiratória mas não são considerados vírus respiratórios, no sentido clínico do termo, uma vez que as suas manifestações clínicas são habitualmente fora do aparelho respiratório. Os vírus Nipah e Hendra também não são vírus respiratórios, sendo causadores de encefalite, pelo que não será feita a sua descrição. (110, 141)

1.3.3.1. Vírus parainfluenza humano (HPIV)

Os HPIVs apresentam uma forma esférica, com uma nucleocápside helicoidal revestida por um involucro lipídico com espículas glicoproteicas, dispostas de uma forma regular, tendo no entanto dimensões maiores que os Orthomyxovirus (150-250 nm). São vírus frágeis e rapidamente inativados pelo éter e por temperaturas superiores a 37°C. (110, 141)

Características gerais

Os HPIVs pertencem à família *Paramyxoviridae*, dividem-se em 4 serotipos (1 a 4) e dois subtipos (4a e 4b). (95)

São antigenicamente distintos dos vírus gripais, mas apresentam entre si frações antigénicas comuns. A resposta serológica primária às infeções pelos vírus parainfluenza é estritamente específica do tipo. (4)

Epidemiologia

Os HPIVs são transmitidos pessoa a pessoa pelo contacto direto com secreções infetadas através de gotículas respiratórias, superfícies ou objetos contaminados. Estes vírus podem permanecer infecciosos em gotículas no ar por mais de uma hora. O período de incubação geralmente varia entre 2 a 7 dias. (10)

Os HPIV1, HPIV2 e HPIV3, são a segunda causa mais importante de infeção do trato respiratório inferior viral em crianças jovens. O HPIV-3 causa bronquiolite e pneumonia principalmente em crianças com menos de 12 meses de idade. (52, 54)

Os HPIVs infetam a maioria dos indivíduos durante a infância. As infeções graves por estes vírus ocorrem entre as crianças. Diferentes estudos serológicos mostraram que 90 a 100% das crianças com cinco anos de idade apresentam anticorpos para HPIV-3, e cerca de 75% tem anticorpos para HPIV-1/2. Os diferentes serotipos de HPIV diferem em suas características clínicas e sazonais. (54, 110)

Os HPIVs podem causar infeções repetidas com os diferentes serotipos ao longo da vida e podem causar infeções graves do trato respiratório inferior com infeção de repetição (por exemplo, pneumonia e bronquite), particularmente entre idosos e pacientes com sistemas imunológicos comprometidos. (52)

Manifestações Clínicas

Os HPIVs são causadores comuns de doença do trato respiratório em latentes e crianças jovens. Os 4 serotipos apresentam características diferentes tanto a nível clínico como epidemiológico. A característica clínica mais marcante do HPIV-1 e HPIV-2 é o *croup*, já descrito anteriormente no ponto 1.3.2., embora o HPIV-1 seja mais frequente relativamente ao HPIV-2. (80, 110)

Por sua vez, o HPIV-3 é mais frequentemente associado a casos de bronquiolite e pneumonia, principalmente nos primeiros 6-12 meses de vida, enquanto o HPIV-4 é detetado com pouca frequência e é menos frequente como causador de doença grave. (26, 54, 95)

Prevenção e Tratamento

Atualmente ainda não está disponível nenhuma vacina para proteger das infecções causadas por qualquer serotipo de HPIVs. Alguns anticorpos maternos adquiridos passivamente podem desempenhar um papel de proteção contra os tipos 1 e 2 de HPIVs nos primeiros meses de vida. Deve ser prestada especial atenção no controlo de infecções de forma a diminuir ou prevenir a propagação da infeção nos serviços de saúde.(26, 95)

1.3.3.2.Vírus sincicial respiratório (VSR)

O VSR é uma das causas principais de infecções respiratórias do trato respiratório inferior entre crianças de todo o Mundo. (3)

O VSR é a causa mais comum de bronquiolite e pneumonia em crianças com menos de um ano de idade nos Estados Unidos. Estima-se que em cada ano, 75 000 a 125 000 crianças nesta faixa etária sejam hospitalizadas devido à infeção por VSR (96), resultando em 20 a 25% de casos de pneumonia e até 70% dos casos de bronquiolite. (49)

Características gerais

O VSR é um membro do género *Pneumovirus* e da família *Paramyxoviridae*. A organização molecular do genoma do VSR e as características gerais estruturais do vírus seguem o padrão paramixovírus. O vírus processa um envelope lipídico com duas glicoproteínas virais: uma glicoproteína (G) e uma glicoproteína de fusão (F), que mediam o anexo viral e os processos de fusão celular, respetivamente. Ao contrário de outros paramixovirus, a proteína de fusão do VSR carece da hemaglutinina ou propriedades da neuraminidase. O VSR provoca a formação de sincícios em células infetadas, e as glicoproteínas virais medeiam a entrada da fusão em pH neutro. (131)

O seu genoma é constituído por 15 222 nucleotídeos, por uma molécula de RNA que codifica para 11 proteínas virais. (6, 126)

Epidemiologia

O VSR pode causar infeções respiratórias superiores e inferiores (como bronquiolite e pneumonia). Nas crianças com menos de um ano de idade, o VSR é a causa mais importante de bronquiolite. Quando as crianças são expostas a VSR pela primeira vez, 25 a 40% delas apresentam sinais ou sintomas de bronquiolite ou pneumonia, e 0,5 a 2 % requerem hospitalização (na maioria são crianças com menos de 6 meses de idade). Latentes e crianças infetados pelo VSR normalmente apresentam sintomas dentro de 4 a 6 dias após o contacto, a maioria vai recuperar em 1-2 semanas. Indivíduos infetados normalmente são contagiosos durante 3 a 8 dias. (7)

Os surtos de VSR ocorrem com um padrão distinto sazonal. A estação do VSR começa no final do outono e continua até meados da primavera, com um pico no inverno, entre janeiro e março. 50 % das crianças nos primeiros anos de vida serão infetados com VSR no primeiro Inverno, e com 3 anos de idade, quase 100% das crianças serão infetadas pelo menos uma vez. Alguns casos apresentam manifestações mais graves e muitas vezes requer mesmo hospitalização. O tempo e a gravidade da circulação de VSR numa determinada comunidade pode variar de ano para ano. (96)

O VSR é transmitido pela inoculação direta de gotículas respiratórias e, portanto, requer contacto próximo com aerossóis e gotículas respiratórias de indivíduos infetados. As crianças infetadas podem contaminar superfícies do ambiente e a pele com partículas de aerossóis, estas podem sobreviver horas nestes locais. O vírus pode sobreviver em objetos, tais como bancadas de 4 a 7 horas, e o tempo em ambientes húmidos pode exceder as 24 horas. Havendo também um grande risco de disseminação nosocomial, uma vez que o vírus pode-se espalhar rapidamente no ambiente hospital, apesar dos procedimentos habituais de controlo de infeção. (89)

Manifestações Clínicas

O VSR replica-se inicialmente no epitélio da nasofaringe e depois propaga-se para o trato respiratório inferior. A infeção primária por VSR apresenta-se bastante severa, não estando claro se este fato se deve aos mecanismos imunopatológicos, imaturidade imunológica ou ao simples facto de que as vias aéreas das crianças são pequenas e vulneráveis. (7)

A imunologia e a imunopatogenia das infeções por VSR são complexas e não totalmente conhecidas, embora esteja claro que os componentes humorais e celulares do sistema imunológico contribuam tanto para a patogénese como para a proteção. A infeção primária por VSR não confere imunidade permanente. Infeções secundárias são geralmente mais leves, devido à proteção contra a doença grave após a infeção primária. O limitado grau de proteção oferecido pelos anticorpos maternos é ressaltado pelo facto de que o pico de incidência da doença grave por VSR é observada em latentes com idades entre 2 a 5 meses, altura em que ainda circulam anticorpos maternos no organismo do bebe. (4, 102)

Desta forma, O VSR pode incluir uma grande variedade de sintomas, tais como a rinite, otite média, pneumonia e bronquiolite, já descritos anteriormente. (7, 43, 96)

Prevenção

A lavagem frequente das mãos e a limpeza de superfícies com desinfetante pode ajudar a controlar a propagação do VSR. Deve evitar-se o contacto direto de indivíduos infetados com crianças de alto risco. O *palivizumab* está disponível para ajudar a prevenir o desenvolvimento da doença grave por infeção de VSR e é indicado em bebes prematuros e recém-nascidos, especialmente com displasia broncopulmonar. (4, 26, 96, 102)

1.3.3.3. Metapneumovirus humano (MPVh)

O MPVh é um vírus que foi descrito pela primeira vez em 2001 e que causa um largo espectro de doenças que vão desde a infecção assintomática a casos de bronquiolite grave. (133)

Tal como os outros vírus respiratórios, o MPVh pode causar infecções baixas e altas do trato respiratório habitualmente em bebés e crianças, mas também pode infetar idosos e doentes imunodeprimidos. (143)

A seguir ao VSR, é o segundo causador de bronquiolite na primeira infância. (11) Crianças com menos de 5 anos são mais suscetíveis a infecções por MPVh (134), e aquelas com menos de 2 anos de idade tem maior probabilidade de ser hospitalizadas com sintomas graves, incluindo bronquiolite, pneumonia e bronquite. (64)

Características gerais

O género metapneumovirus humano pertence à subfamília *Pneumovirinae* e à família *Paramyxoviridae*. (64)

O virião do MPVh, tal como todos os paramyxovirus, contem uma nucleocapside de cadeia única de RNA, embora este virião não contenha hemaglutinina ou neuraminidase, o que o distingue como membro da subfamília *Pneumovirinae*, tal como o VSR.

Estão descritos dois génotipos *major* no MPVh, designados de A e B, e cada um divide-se em dois subtipos (A1 e A2; B1 e B2). (105)

O genoma do MPVh tem aproximadamente 13,4 kb de comprimento. (133)

A fisiopatologia da infecção MPVh está intimamente relacionada com o outro pneumovírus humano, VSR, ou seja, tem igualmente um tropismo para o epitélio respiratório. (101, 125)

Epidemiologia

O MPVh é causador de infecções respiratórias em crianças durante todo o ano. Em climas temperados, as infecções por MPVh tem o seu pico máximo no final do inverno e primavera. (25)

A infecção por MPVh em crianças, tal como a infecção por VSR, é mais frequente em crianças com menos de 2 anos de idade, particularmente com menos de 12 meses. (134)

Na pediatria, o MPVh é geralmente o agente mais comum de infecção respiratória após o VSR. (72) (100) É descrita uma alta taxa de co-infecção com o VSR, visto os ciclos de epidemias de ambos se sobrepõem. No entanto, não é claro se a gravidade dos sintomas é mais elevada com uma única infecção de MPVh ou com a co-infecção com VSR ou outro vírus respiratório. (35)

O meio de transmissão do MPVh não é conhecido. Embora, o vírus esteja presente na nasofaringe em concentrações elevadas, é razoável concluir que a sua propagação é semelhante à de outros vírus respiratórios, inclui a transmissão por contacto direto, de superfícies contaminadas. (32)

Nas crianças, o MPVh está presente em secreções nasais por um período médio de 5 dias, uma duração mais curta que as infecções por VSR. (101, 140)

A infecção por MPVh é muito comum. As estimativas sugerem que este vírus é o agente causador de bronquiolite infantil em 5-15% dos casos. Crianças infetadas com este vírus respiratórios, são frequentemente co-infetadas com outros vírus respiratórios comuns. (101, 125)

O MPVh também pode ser causador de infecção nosocomial. (69)

A circulação de genótipos de MPVh varia anualmente e o genótipo predominante muda a cada 1-3 anos, embora a co-circulação de vários genótipos seja comum. (77)

Estudos sero-epidemiológicos sugerem que a infecção com MPVh ocorre durante os primeiros 2 anos de vida e quase todos os indivíduos foram expostos a MPVh até aos 5 anos de idade. (133)

Anticorpos contra MPVh em crianças ou adultos podem sugerir um número diferente de infecções de repetição ou uma resposta diferente com o aumento da idade. (81) A reinfeção com MPVh parece ser devida à imunidade incompleta. (27)

Manifestações clínicas

O paciente pode ser assintomático, ou os sintomas podem variar de doença leve do trato respiratório até bronquiolite grave ou mesmo pneumonia, sendo estes casos mais graves em crianças com menos de 1 ano de idade, idosos e pessoas com o sistema imunitário comprometido. (101, 125)

Prevenção

O tratamento baseia-se em medidas tomadas em crianças hospitalizadas por infecção respiratória grave, podendo em casos mais graves ser necessária a ventilação.

Boas práticas de controlo de infeção podem evitar a propagação de infeções por MPVh. Não existem ainda vacinas a serem comercializadas. (133)

1.3.4. *Coronaviridae*

A família *Coronaviridae* é constituída por dois géneros - *Coronavirus* e *Torovirus*. Os coronavirus são vírus ubiquitários que infetam uma diversidade de mamíferos e aves. Nos humanos, podem causar infeção ligeira do trato respiratório superior, sendo responsáveis por mais de 15 a 30% das vulgares “constipações”. Os torovírus são vírus responsáveis por doença entérica em certos animais, mas no homem persistem ainda dúvidas quanto à identidade viral das partículas pleomórficas, semelhantes a torovirus, que tem sido detetadas em fezes diarreicas. (110)

1.3.4.1. Coronavirus

Características gerais

Estes vírus devem o seu nome ao aspeto em coroa, quando observados em microscopia eletrónica. Os coronavirus são constituídos por um involucro e por uma nucleocapside, são esféricos e pleomórficos, apresentam-se em forma de rim ou em forma de bastonete. São vírus dotados de grande polimorfismo, devido à presença do seu involucro lipídico, apresentam, uma forma esférica e um diâmetro de cerca de 120-160 nm. (110, 141)

O genoma é não segmentado e contém uma única e longa molécula de RNA de cadeia simples, com polaridade positiva. O genoma completo é constituído por 25000-33000 nucleotídeos e codifica proteínas estruturais (5 proteínas) e proteínas não-estruturais. (110)

O seu modo particular de replicação origina uma elevada frequência de recombinações e mutações, responsáveis pela variabilidade antigénica destes vírus. (4)

Os coronavirus são comumente associados a infeção respiratória em crianças e adultos.

Os primeiros coronavirus humanos, dos quais HCoV-229E e HCoV-OC43 são os representantes, foram identificados em 1960. Recentemente foram descobertos os

vírus HCoV-HKU1 e HCoV-NL63, que são agentes importantes infecção respiratória aguda em crianças. (135) Outro coronavírus recentemente identificado é o da síndrome respiratória aguda grave (SARS), SARSCoV, que surgiu no sul da China no final de 2002 e espalhou-se na primavera de 2003 para cerca de 30 países da Ásia, Europa e América do Norte. Deste surto resultaram 8096 casos em todo o mundo e 774 pacientes morreram, uma taxa de mortalidade de 9,6%. (116)

Os coronavírus são classificados em três grupos distintos, com HCoV-229E e HCoV-NL63 incluídos no grupo 1, o HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 no grupo 2 e SARSCoV representa o Grupo 3. (47)

O HCoV-NL63 foi detetado a primeira vez em 2004 em crianças com bronquiolite na Holanda (137), enquanto que o HCoV-HKU1 foi detetado em 2005 num adulto com doença pulmonar crónica em Hong Kong. (147)

Vários estudos mostram que os coronavírus NL63 e HKU1 foram detetados em 1 a 10% de pacientes com infecção aguda do trato respiratório. A deteção destes dois vírus simultaneamente é comumente reportado. (136)

Epidemiologia

A taxa de infecção por coronavírus mostra-se relativamente uniforme em todos os grupos etários, embora a doença aguda do trato respiratório superior tenha, geralmente, uma incidência máxima em crianças dos 4-10 anos. No adulto, a infecção por coronavírus encontra-se frequentemente associada a sintomatologia ligeira das vias respiratórias superiores. (148)

A aquisição de anticorpos parece ter lugar desde o primeiro ano de vida. Aos 3 anos de idade, 50% das crianças apresentam anticorpos contra os coronavírus respiratórios, elevando-se esta taxa para 70% na população adulta. (110)

As infecções por coronavírus ocorrem, normalmente, em forma de epidemia, no fim do inverno e princípio da primavera. Durante as epidemias todos os grupos etários de ambos os sexos podem ser infetados. Tal contrasta com o que se passa com outros

vírus respiratórios (por exemplo, vírus sincicial respiratório), em que se verifica um decréscimo marcado de incidência da doença com o aumento da idade. (14, 110)

A infecção respiratória nosocomial por coronavírus parece ser frequente em unidades neonatais de cuidados intensivos.(108)

A infecção respiratória por coronavírus induz uma imunidade específica de serotipo. No entanto, a reinfeção pelo mesmo serotipo parece ocorrer frequentemente, sugerindo que os anticorpos homólogos são apenas protetores por algum tempo. (62)

Manifestações clínicas

Os coronavírus humanos causam, frequentemente, infecções discretas do trato respiratório superior. A infecção raramente se estende às vias respiratórias inferiores, mas no decurso de epidemias, podem ser detetados casos de bronquiolites e pneumopatias. A infecção assintomática é comum, ocorrendo apenas sinais clínicos em cerca de 50% dos indivíduos infetados. (108)

A importância clínica dos coronavírus poderá vir a aumentar, dado que alguns estudos sero-epidemiológicos têm sugerido a sua implicação na etiologia de doenças mais graves, tais como pneumonias, pericardites, meningites e radiculites. Por outro lado, os coronavírus também têm sido associados a certas infecções gastrointestinais graves, como diarreias e enterocolites necrosantes, sobretudo em recém-nascidos e crianças com menos de 1 ano de idade. (4)

À semelhança com os outros coronavírus, também o HCoV-NL63 foi provado ser um agente patogénico respiratório, mas deve ser realçado o seu papel como causador de *croup*. (30)

As infecções causadas pelos coronavírus HKU1 e NL63, geralmente não são graves, em pessoas saudáveis. Tal como os coronavírus 229E e OC 43, são predominantemente comuns como causa de constipações, podendo originar sintomas mais graves em crianças, idosos e imunodeprimidos. (138)

1.3.5. Picornoviridae

Os Picornavirus são membros da família *Picornaviridae*, constituída por um numeroso conjunto de pequenos vírus, ubiquitários, que circulam na Natureza.

De acordo com características, os membros da família *Picornaviridae* estão atualmente repartidos por doze géneros: *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Aphovirus*, *Cardiovirus*, *Poliovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus* e *Coxsackie*. (2)

Características gerais

Os vírus da família *Picornaviridae* são agentes de pequenas dimensões, com 20-30 nm, icosaédricos, com genoma de RNA e com uma cápside desprovida de invólucro (vírus nus). Possuem uma cápside icosaédrica, com 60 subunidades, e 12 vértices pentaméricos, composto cada um deles de 5 unidades de proteínas protoméricas. (110)

Constituem uma família numerosa, à qual pertencem cerca de 250 membros ou serotipos. Dividem-se por diversos géneros, dos quais os mais importantes são os enterovirus e rinovirus, os primeiros pela gravidade de algumas das infeções que provocam e os segundos por serem um dos mais frequentes agentes de infeção respiratória em crianças. (88)

Estes agentes apresentam uma grande polivalência, embora possam manifestar no hospedeiro síndromas idênticas. Inversamente, quadros clínicos diversos podem ser da responsabilidade de um mesmo vírus, tornando difícil, desta forma, saber o agente causal de uma dada infeção. (127)

1.3.5.1. Rinovirus

Foi em 1954 que foi descoberto o rinovirus humano (tipo A1), mas só em 1963, é que lhe foi atribuído este nome devido à associação com o tipo de doença que causava, rinorreia. (110, 132)

Os rinovirus penetram no organismo por via respiratória, tornando-se responsáveis por infecções respiratórias altas, como a vulgar constipação, sendo o mais importante agente causal. (4)

Características gerais

Embora apresentando características gerais dos *Picornaviridae*, os rinovirus podem ser distinguidos dos enterovirus pela inativação em baixo pH, ou seja a labilidade aos ácidos, o que impede a sobrevivência do rinovirus no estômago ou intestino, desta forma não infetam o hospedeiro por via digestiva. (4, 110)

Epidemiologia

As infecções causadas por rinovirus ocorrem durante todo o ano e tem uma alta incidência na primavera e no outono, com variação da área e do ano. (145, 149)

Vários tipos de rinovirus circulam na comunidade durante todo o ano, mas os picos de alta prevalência ocorrem usualmente em setembro-novembro e abril-maio. (145) Durante o outono mais de 90% das constipações são causadas pelos rinovirus. (5, 84) Nas pessoas adultas, o rinovirus é um dos agentes mais frequentes de infecção do trato respiratório, sendo assim também uma agente de infecção respiratória em crianças.(23, 74)

Cada individuo sofre, anualmente, 2 a 4 infecções por rinovirus diferentes, podendo vir mais tarde a sofrer reinfeção por um mesmo serotipo. (4)

A resposta à infecção por rinovirus é principalmente de imunidade humoral e a maioria dos indivíduos infetados produzem anticorpos neutralizantes para o serotipo infetante. Ao longo da vida de um individuo a redução destas reinfeções é, provavelmente, devida a uma expansão do repertório de anticorpos neutralizantes adquiridos. (110)

O período de incubação é curto, cerca de 2 dias, com intervalo de 1 a 6 dias. A doença normalmente dura uma semana a 10 dias, podendo o vírus permanecer no organismo de 2 a 3 semanas após a resolução dos sintomas. (104)

Manifestações clínicas

Os rinovirus humanos têm sido reconhecidos como os agentes responsáveis pela comum constipação, mas também tem sido detetados na nasofaringe de indivíduos assintomáticos. (33)

Os rinovirus humanos parecem ser capazes de se replicar também nas vias respiratórias inferiores e causar bronquiolite e pneumonia, geralmente com internamento hospitalar. (150)

As manifestações clínicas da infecção por rinovirus em indivíduos imunodeprimidos variam desde do estado assintomático a doenças mais graves como a pneumonia, passando pela vulgar constipação. (104)

1.3.5.2. Enterovirus

Características gerais

Os Enterovirus habitam transitoriamente o intestino do homem, depois de terem penetrado no seu organismo por via oral. Embora designados de entéricos, por utilizarem o intestino como local de passagem, raramente dão sintomatologia gastrointestinal. O seu primeiro local de multiplicação é o tecido linfóide da orofaringe, incluindo o das amígdalas e, posteriormente, o do intestino. A virémia não é requisito obrigatório, no entanto, num doente sem anticorpos, poderá conduzir a quadros clínicos de gravidade, caso o sistema nervoso venha a ser afetado (paralisias, meningoencefalites, etc.). A eliminação do vírus é feita pelas fezes. (4, 110)

Os enterovirus apresentam uma grande estabilidade em meio ácido (pH 3,0-5,0) durante 1 a 3 horas, enquanto que os rinovirus são lábeis aos ácidos, tal como foi dito anteriormente. Resistem bem à temperatura ambiente, durante semanas, caso estejam envolvidos em matéria orgânica, especialmente contendo proteínas, como é o caso das fezes. Sobrevivem durante meses a 4°C e durante anos a -20°C ou -70°C. (110)

Os enterovirus incluem os **Poliovírus**, os **Coxsackievirus** e os **Echovirus**. Todos estes vírus partilham as características gerais dos outros picornavirus, mas também outras importantes propriedades, como:

- Provocam infecção por via fecal-oral;
- Replicam-se ao nível da orofaringe e do trato intestinal;
- Na maioria dos casos, provocam infecções assintomáticas, levando à formação de anticorpos neutralizantes, protetores contra infecções futuras produzidas pelo mesmo vírus;
- Apresentam a capacidade de produzir virémia;
- Podem, ocasionalmente causar infecção e lesão do sistema nervoso central;
- Circulam maioritariamente durante os meses do verão e do outono;
- São mais frequentemente isolados em crianças do que em adultos. (4, 110, 141)

Epidemiologia

A transmissão dos enterovirus é de pessoa a pessoa por via fecal-oral e via oral-oral (transmissão respiratória). As piscinas são um bom meio de transmissão dos enterovirus durante o verão. (110)

Manifestações clínicas

Os Enterovirus podem ser responsáveis por infecções em vários órgãos e sistemas, com gravidade variável, mas no que se refere ao aparelho respiratório estão sobretudo associados a infecções ligeiras do sistema respiratório superior em crianças.

Na maioria destes casos, a febre é geralmente acompanhada de faringite. Nos casos mais graves, este vírus pode ser responsável por casos de bronquite e estar associado à sibilância. (58, 110)

1.3.6. *Parvoviridae*

1.3.6.1. Bocavirus humano

O bocavirus humano (HBoV) foi descrito pela primeira vez em 2005. Desde então, este vírus tem sido associado a um número significativo de infecções respiratórias em crianças por todo o Mundo. É o segundo vírus da família *Parvoviridae* descrito como patogénico para os seres humanos. (1)

Características Gerais

Os bocavirus humanos são membros da família *Parvoviridae*, sendo vírus pequenos, sem involucro, com uma cadeia única de DNA. Foram identificadas quatro variantes de Bocavirus humanos (HBoV 1-4) até à data com base na análise filogenética do genoma viral. (1, 110)

O HBoV1 é predominante no trato respiratório e causa doença no mesmo (68), enquanto o HBoV2 e HBoV3 têm sido detetados em amostras respiratórias e em amostras de fezes, ao passo que o HBoV4 tem sido apenas detetado em amostras de fezes. (65)

Embora as infecções por HBoV ocorram tanto em crianças como em adultos, as crianças com menos de 2 anos estão em maior risco de infecção. (60)

Epidemiologia

O método de transmissão do bocavirus humano ainda não está conhecido. Embora, o vírus esteja presente em altas concentrações na nasofaringe, é razoável concluir que a sua propagação seja semelhante aos de outros vírus respiratórios.

A transmissão pode envolver transmissão por gotículas e/ou através de aerossóis, e através de mãos ou superfícies contaminadas. (4)

Manifestações clínicas

O bocavirus humano foi encontrado em amostras de crianças com doença do trato respiratório superior e/ou inferior. Os sinais e sintomas da doença são idênticos aos que ocorrem em infecções por outros vírus, assim, a clínica pode incluir tosse, expectoração, febre, rinorreia, dispneia e diarreia. (48)

Uma característica única das infecções respiratórias pelo bocavirus humano é a alta frequência de infecções mistas, levando à interrogação se o bocavirus será um agente passageiro e não a causa da doença respiratória. (110, 113)

1.4. Diagnóstico dos vírus respiratórios

Como é do conhecimento geral e tal como tem sido descrito ao longo deste trabalho, grande parte das infecções respiratórias do trato respiratório são causadas por vírus respiratórios.

O diagnóstico, a detecção e a vigilância de agentes respiratórios, em especial os agentes virais emergentes, tem sido motivo de interesse na última década. Os avanços nas técnicas de biologia molecular têm permitido a identificação de alguns agentes que anteriormente não eram detetados, contribuindo desta forma para a compreensão da etiologia das infecções respiratórias virais. Durante a última década, outros vírus respiratórios ou novas estirpes de vírus respiratórios já conhecidos foram identificados, tais como o metapneumovirus humano, os coronavírus associados ao SARS e aos quadros respiratórios recentemente descritos no Médio Oriente (ECDC), os coronavírus humanos NL63 e HKU1, os bocavirus humanos, o rinovirus C, o vírus da gripe A H1N1 de 2009, bem como os potenciais agentes patogénicos respiratórios, incluindo os poliomavirus WU e K1 e os parechovirus. (101, 113)

Um diagnóstico laboratorial rápido e específico do agente causador de infeção respiratória pode diminuir o uso de antibióticos, de testes laboratoriais adicionais e, por fim está associado a períodos mais curtos de hospitalização. (107)

O diagnóstico é baseado na detecção do vírus ou em componentes virais como antígenos ou em sequências de ácido nucleico específicas em secreções respiratórias. Os testes baseados em antígenos estão amplamente disponíveis, são de fácil execução e os resultados estão disponíveis num curto espaço de tempo, mas a sua sensibilidade e especificidade são variáveis consoante o método e geralmente inferiores ao método de referência. (8, 15)

Entre os métodos disponíveis, o isolamento em cultura de células foi considerado o *gold standard* para a identificação viral. No entanto este tem sido gradualmente substituído por técnicas mais sensíveis, como a amplificação de ácidos nucleicos – técnicas de biologia molecular, e que fornecem resultados mais rápidos.

Dentro destas últimas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a mais utilizada, sendo a PCR em tempo real uma variante da metodologia, mais recente e que permite a quantificação de ácidos nucleicos virais numa amostra clínica, entre outras vantagens. A principal desvantagem destas metodologias são o elevado custo das mesmas. (113) (15, 107)

O ideal seria implementar metodologias para um diagnóstico mais sensível, rápido e de baixos custos, permitindo identificar a etiologia de todos os agentes causadores de infecção respiratória viral.

O tipo e qualidade da amostra clínica para deteção de vírus respiratórios influenciam consideravelmente a sensibilidade e especificidade de toda a deteção viral. Diversos estudos têm demonstrado que o aspirado nasofaríngeo é relativamente mais sensível que a colheita de secreções nasofaríngeas com zaragatoa. No entanto, a colheita com zaragatoa é um método mais fácil para o paciente, requer menos equipamento especializado e assim é fácil de realizar em qualquer lugar. (51, 75)

1.4.1. Cultura para isolamento de vírus

O isolamento de vírus em cultura de tecidos tem sido considerado como, dito anteriormente, o *gold standard* para confirmação da infecção viral desde os primórdios da ciência virológica. No entanto, além de ser uma técnica que necessita de experiência por parte do operador para uma eficiente recuperação viral, requer na maioria dos vírus uma média de 3 a 6 dias para se conseguir verificar o efeito citopático. A cultura *Shell vial*, que combina a centrifugação com uma revelação precoce por imunofluorescência ou por imunoperoxidase com anticorpos específicos, aumenta a sensibilidade da técnica de cultura celular e encurta o tempo de resposta para a identificação do vírus para 1 a 2 dias. (18, 63, 103, 124)

1.4.2. Detecção Antigénica

Os testes de detecção de antígenos incluem a imunofluorescência direta (IFD), ensaios imunoenzimáticos (EIA) e ensaios imunocromatográficos. Os ensaios de IFD utilizam um marcador com fluoresceína e a vantagem é que o padrão de imunofluorescência das células infetadas podem ser diretamente examinadas por microscopia que fornece uma confirmação adicional de especificidade. Nos EIA, se o antígeno do vírus a pesquisar estiver presente, é capturado por anticorpos específicos e é detetado por um anticorpo ligado à enzima. (98, 114)

Os testes comerciais de detecção de antígenos são fáceis de realizar e os resultados estão disponíveis num curto período de tempo, em minutos. Por estas razões, estes são amplamente utilizados na prática clínica. No entanto, no que diz respeito aos principais vírus respiratórios causadores de infecção respiratória em crianças, nem todos têm testes comerciais disponíveis. Apesar dos inúmeros esforços realizados para melhorar a sensibilidade e especificidade destes testes de detecção de antígenos, estes métodos são menos específicos e sensíveis que os testes de amplificação de ácidos nucleicos e de cultura celular, apresentando sensibilidades entre 72 a 94% e especificidades de 95 a 100% em amostras respiratórias pediátricas. (45, 53, 112)

1.4.3. Testes de ácidos nucleicos

Os testes que se baseiam na detecção dos ácidos nucleicos revolucionaram o diagnóstico em virologia e são os métodos mais sensíveis na identificação de vírus respiratórios, independentemente da população a ser estudada. (29)

As crianças com infecção primária excretam geralmente os vírus respiratórios por um longo período de tempo, ao contrário das reinfecções em que a excreção é menos intensa e duradoura, devido à presença de anticorpos específicos que influenciam o grau de replicação viral. (50, 86, 107)

Nos últimos dez anos, numerosas técnicas de PCR foram montadas e diversos protocolos foram publicados, assim como foram lançados no mercado numerosos testes comerciais para detecção de vírus respiratórios. (56, 67, 83)

As novas técnicas de PCR, como por exemplo a PCR em tempo real, utilizam sondas fluorescentes como as *Taqman*, *beacons* moleculares e as sondas *scorpion* que permitem a realização simultânea da amplificação e detecção e resultam num aumento considerável de velocidade da PCR em tempo real com um tempo de resposta em poucas horas. Foram desenvolvidos protocolos de PCR em formato *multiplex* que permitem a amplificação simultânea de vários vírus respiratórios, desta forma são capazes de identificar uma variedade de diferentes vírus respiratórios numa mesma amostra respiratória. A utilização da PCR *multiplex* com elevada sensibilidade resultou num aumento significativo dos casos de infecção respiratória, em que se detetaram infecções mistas com 2 ou mais vírus respiratórios. (16, 17)

Uma vantagem muito importante da PCR em tempo real é que permite a quantificação dos ácidos nucleicos virais presentes numa amostra.(28) O valor da determinação de cargas virais no que diz respeito ao diagnóstico das infecções do trato respiratório ainda é incerto, porque as amostras respiratórias são de difícil homogeneização, especialmente se tivermos em conta a quantidade de vírus ou células infetadas dentro de cada amostra e das diluições não padronizadas. No entanto, e citando um exemplo no que diz respeito às cargas virais do VSR, quando estas se

apresentam elevadas parecem corresponder com um curso clínico mais grave da doença e com uma maior probabilidade de recorrência de sibilância. (24, 91)

Em pacientes nos quais vários vírus são detetados por PCR em tempo real quantitativo, este método pode ajudar a discriminar qual o vírus que estará a ser o responsável pelo quadro clínico. (107)

2 - Material e Métodos

2.1. População estudada

No estudo desenvolvido foram utilizadas amostras de secreções da naso e orofaringe em dois grupos de crianças, com idades compreendidas entre os 5 meses e os 5 anos: um que englobava as crianças que frequentavam os infantários do distrito de Lisboa que participaram neste estudo, e o outro que incluía as crianças que se deslocaram à Urgência Pediátrica do Hospital da Luz.

Foi criado um sistema de alerta para sinalização dos casos de doença. Antes do início do funcionamento deste sistema de alerta foram realizadas ações de formação nos infantários, a fim de ser incentivados e esclarecidos os encarregados de educação e a comunidade escolar para a sua correta utilização. Para se proceder às colheitas nas crianças dos infantários os pais e educadores de infância tinham ao seu dispor uma linha verde (integrada no projeto “ENVIRH: Ambiente e Saúde de crianças de infantários”) totalmente gratuita que estes deviam utilizar para sinalizar os casos de doença. A resposta a estas chamadas, assim como a realização das colheitas foram da minha responsabilidade. Era considerado caso doença quando uma criança que apresentava pelo menos duas das seguintes manifestações clínicas: febre, tosse, congestão nasal e sibilância. Quando após a chamada se verificava que se tratava de um caso de doença, deslocava-me ao local onde se encontrava a criança e procedia à colheita. No caso das amostras das crianças da urgência do Hospital da Luz, quando os pediatras de serviço verificavam que as crianças tinham critérios de infeção respiratória, comunicavam à equipa de enfermagem e esta realizava a colheita, sendo a mesma entregue no laboratório desse mesmo Hospital, local onde desempenho funções.

2.1.1. Procedimento para colheita e armazenamento das amostras

Em cada colheita fazia-se a recolha das secreções da naso e da orofaringe, recorrendo a duas zaragatoas que eram colocadas de imediato no meio de transporte de vírus.

O procedimento de extração do ácido nucleico era efetuado até 72 horas após a colheita, sendo as amostras refrigeradas a 4°C até à extração.

2.2. Técnicas de Extração de ácido nucleico

Para extrair o DNA/RNA das amostras clínicas foi utilizado o kit “Ez1 vírus Mini kit v2.0” (Quiagen), tendo seguido o protocolo do mesmo.

O “EZ1 Vírus mini kit v2.0” foi utilizado na purificação simultânea de DNA/RNA viral das secreções respiratórias, utilizando o sistema de extração automático: BioRobot EZ1. Esta técnica consiste na utilização de uma tecnologia de purificação de sílica associada às partículas magnéticas. Por sua vez, a presença de sais caotrópicos promovem a ligação do DNA/RNA à sílica na superfície das partículas magnéticas. As partículas são isoladas dos lisados por um magneto, e o DNA/RNA é posteriormente eluído num tampão de eluição. Durante o processo de purificação é utilizado o “RNA carrier” que tem duas funções: aumenta a afinidade dos ácidos nucleicos virais para a sílica, que reveste a superfície das partículas magnéticas, especialmente se a amostra contém uma quantidade muito pequena de ácidos nucleicos; e reduz a possibilidade de degradação do RNA viral, se eventualmente as RNases não forem totalmente desnaturadas pelos sais caotrópicos e pelo reagente lise. O Processo de purificação é composto por 4 fases: lise, ligação, lavagem e eluição.

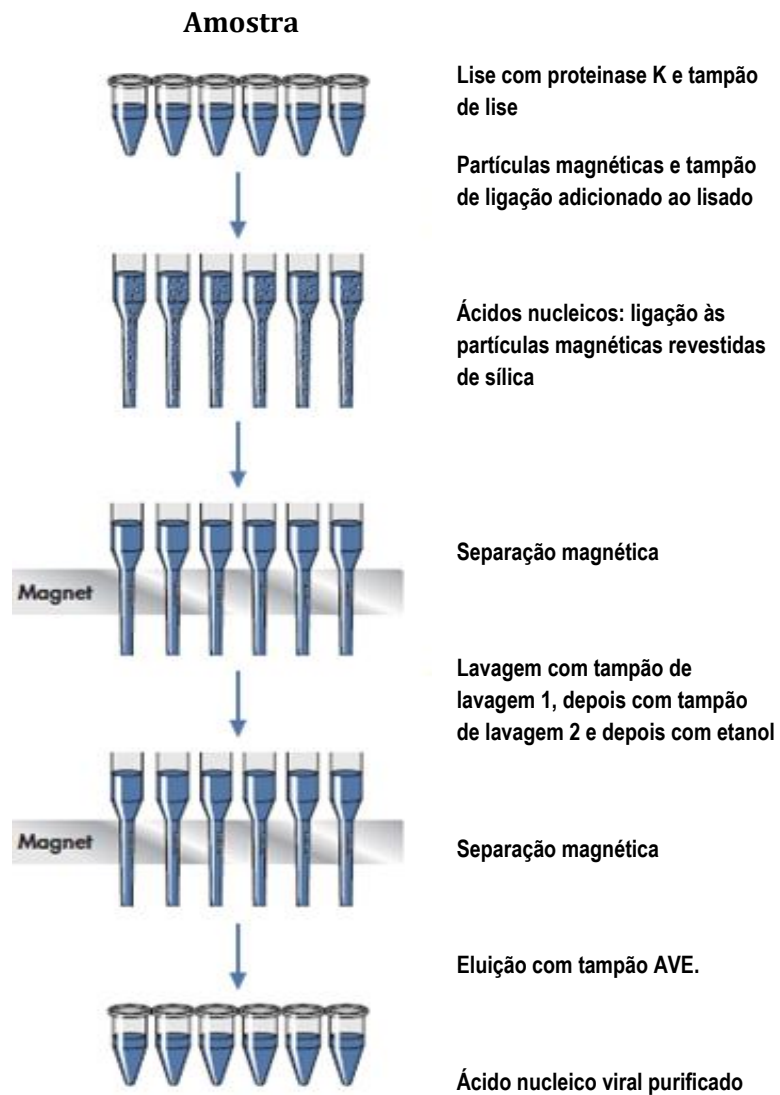


Figura 1 – Esquema ilustrativo da técnica de extração do ácido nucleico

Caso não fosse possível realizar de imediato as técnicas de amplificação, congelavam-se as amostras após o procedimento de extração.

Controlo interno

No processo de extração o controlo interno utilizado foi o MS2, sendo este adicionado em cada amostra juntamente com o “RNA *carrier*”. O MS2 é um bacteriófago, que pode ser utilizado como controlo para ensaios com vírus de RNA e DNA.

2.3. Técnica de PCR em tempo real

Após efetuado o procedimento de extração do DNA/ RNA, a amplificação foi efetuada por técnicas de PCR *multiplex* em tempo real.

A PCR é um processo cíclico em que são repetidos os seguintes passos durante um número determinado de vezes: a cadeia dupla de DNA é desnaturada por aquecimento (95°C) para separação das cadeias, obtendo-se duas cadeias simples; seguidamente dá-se a ligação aos *primers* que foram introduzidos na reação às zonas homólogas em cadeia (emparelhamento, aproximadamente 60°C); por fim, a DNA polimerase catalisa a produção de novas cadeias complementares (extensão, 72°C).(139)

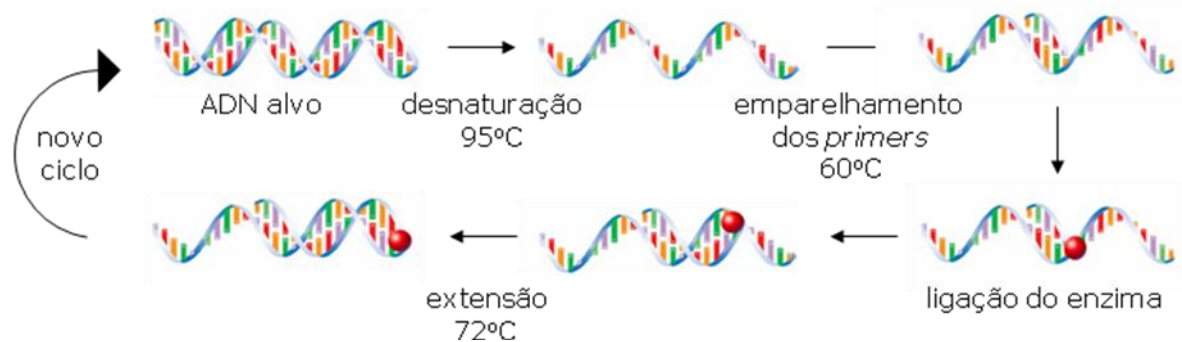


Figura 2 – Técnica de PCR

Este método utiliza uma enzima, a *Taq polimerase*, que é extraída do microrganismo *Thermus aquaticus* com um peso molecular de aproximadamente 94KDa. Esta enzima é termoestável e tem a capacidade de copiar *in vitro* uma determinada região da molécula de DNA, sendo esta região que é condicionada pelo uso de pequenas sequências iniciadoras (*primers*) que hibridam com locais individualizados das cadeias de DNA delimitando assim o fragmento a amplificar.

A enzima utilizada neste trabalho foi a “SuperScript™ Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR system”, enzima que combina a “SuperScript™ III Reverse Transcriptase (RT)” e a “Platinum® *Taq* DNA Polymerase” numa única enzima; assim, esta enzima permite combinar no mesmo passo a transcrição reversa e a amplificação.

Além da enzima, são necessários reagentes como os *primers* e as sondas específicas, água livre de RNASES e uma solução tampão “2 X reaction mix”. Esta última, consiste num sistema tampão com $MgSO_4$, nucleótidos livres (dNTPs) e estabilizadores para criar condições ótimas para a enzima. Em algumas das reações foi ainda necessário adicionar uma quantidade extra de $MgSO_4$.

As sondas utilizadas nestas técnicas são sondas *Taqman*. Estas sondas apresentam numa extremidade o fluoróforo e na outra um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detetados pela fluorescência produzida após a atividade da exonuclease de 5` para 3` da taq polimerase. Durante a PCR em tempo real as sondas *Taqman* hibridizam com a sequência da cadeia simples de DNA complementar alvo para a amplificação. Neste processo a sonda *Taqman* é degradada devido à atividade exonuclease 5` para 3` da Taq polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta num aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Este aumento de fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida.

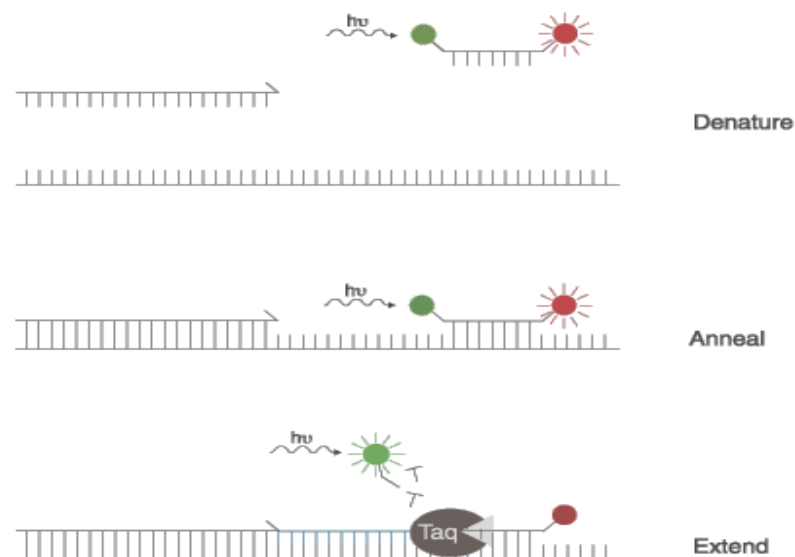


Figura 3 – Atividade da Taq polimerase

A metodologia utilizada permite a pesquisa de vários vírus respiratórios simultaneamente e é designada de PCR *multiplex* em tempo real. Para a execução destas técnicas foram desenhados quatro painéis, que foram descritos e otimizados pela equipa do Prof. Martin Curran (Cambridge), que gentilmente autorizou a sua utilização para este estudo. Estas técnicas de PCR foram efetuadas sob orientação da Dra. Madalena Almeida Santos (Hospital Curry Cabral, Lisboa).

Entende-se por painel cada uma das técnicas de PCR *multiplex* em tempo real, assim descrevo de seguida os vírus pesquisados simultaneamente em cada painel:

- **Painel 1:** “Quadriplex” para Influenza A e subtipo H1, Influenza B e MS2 (controlo interno);
- **Painel 2:** “Triplex” para vírus sincicial respiratório, vírus Parainfluenza (1 e 3) e Adenovirus;
- **Painel 3:** “Quadriplex” para Enterovirus, Rinovirus, vírus Parainfluenza (2 e 4) e Metapneumovirus;
- **Painel 4:** Duplex para Coronavirus Grupo 1 (HCoV-229E, HCoV-NL63) e Grupo 2 (HCoV-OC 43, HCoV-HKU1).

Cada painel inclui os *primers* e sondas específicas para cada vírus, enzima, água, solução tampão e MgSO₄ adicional (quando necessário). Em cada painel fez-se a respetiva mistura de reagente (*mastermix*) de acordo com a quantidade de amostras que se pretendia estudar, e de seguida pipetaram-se 20µl de cada uma das *mastermix* e 5µl de cada amostra, com o cuidado de seguir a ordem dos painéis. Cada painel apresenta as sequencias dos *primers* e sondas, e nestas últimas o respetivo Fluorocromo (ROX, Cy5, Joe, FAM).

Painel 1 - Quadriplex: Influenza A e subtipo H1N1, Influenza B e MS2

Reagentes	Volume por reação (µl)
Água de grau molecular	1.38
2 x RT buffer	12.5
Primers / Probes (P1)* (Ver sequencia primers e probes em anexo 1)	5.32
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

Tabela 1 – Painel 1 da Técnica de PCR em tempo real

Painel 2 – Triplex: VSR, Parainfluenza(1 e 3) e Adenovirus

Reagentes	Volume por reação (µl)
Água de grau molecular	1.38
2 x RT buffer	12.5
MgSO ₄ (50mM)	1.5
Primers / Probes (P2)* (Ver sequência primers e probes em anexo 2)	3.82
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

Tabela 2 – Painel 2 da Técnica de PCR em tempo real

Painel 3 –Quadriplex: Enterovirus, Rinovirus, metapneumovirus e parainfluenza (2 e 4)

Reagentes	Volume por reação (µl)
Água de grau molecular	1.6
2 x RT buffer	12.5
MgSO ₄ (50mM)	1.0
Primers / Probes (P3)* (Ver sequência primers e probes em anexo3)	4.1
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

Tabela 3 – Painel 3 da Técnica de PCR em tempo real

Painel 4 – Duplex: Coronavirus GP1 e GP2

Reagentes	Volume por reação (µl)
Água de grau molecular	2.1
2 x RT buffer	12.5
MgSO ₄ (50mM)	1.5
Primers / Probes (P4)* (Ver sequência primers e probes em anexo 4)	3.1
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

Tabela 4 – Painel 4 da Técnica de PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada no RotorGene™ 6000 (Corbett Research), sendo este um termociclador e detetor simultaneamente, permitindo assim a amplificação e detecção de DNA no mesmo processo. Este tem até seis canais que abrangem comprimentos de onda desde os UV aos infravermelhos.

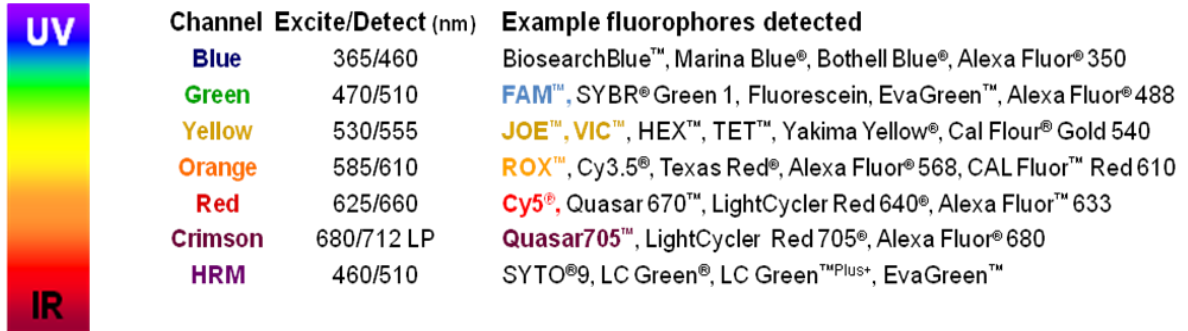


Figura 4 – Espectro de comprimento de onda desde dos UV aos infravermelhos

A detecção de DNA cumpriu o seguinte programa:

Programa	Temperatura	Duração	Número de ciclos
Incubação	50 (°C)	30 min	x 1
Desnaturação	95 (°C)	2 min	x 1
Amplificação	95 (°C)	15 seg	x 45
*(Canais: FAM e ROX)	60 (°C)	60 seg	

Tabela 5 – Programa utilizado no RotorGene

A detecção é realizada nos canais Joe, Rox, FAM e Cy5 em cada ciclo. A interpretação dos resultados é efetuada através da análise das curvas obtidas e do valor do *ct* (*Cycle Threshold*) nos diferentes canais, como mostra a figura seguinte. A tabela 6 serve de complemento na interpretação dos gráficos obtidos nos respetivos canais, assim sabemos em cada canal e painel qual o vírus respiratório correspondente.

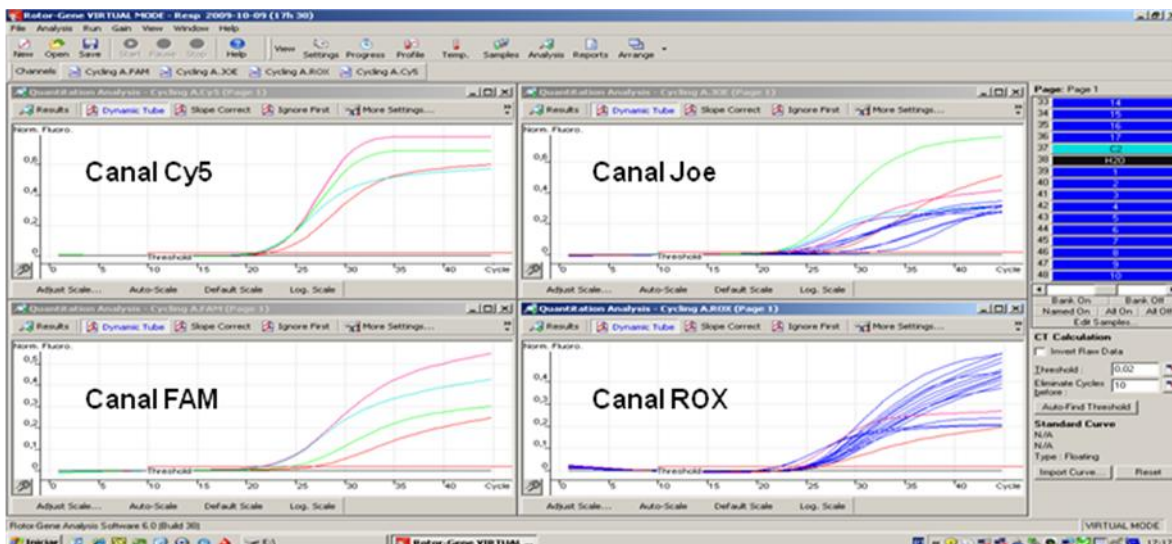


Figura 5 – Gráfico das curvas obtidas nos diferentes canais de deteção

Canal/ Painel	FAM	JOE	Cy5	ROX
Painel 1	Gripe A H1	Gripe A	Gripe B	CI MS2
Painel 2	VSR	Parainfluenza 1-3	Adenovirus	
Painel 3	Enterovirus	Rinovirus	Metapneumovirus	Parainfluenza 2-4
Painel 4	Cor GP1	Cor GP2	SARS	

Tabela 6 – Interpretação dos 4 painéis na mesma corrida

Controlo Interno

Juntamente com as amostras foi sempre processado o respetivo controlo negativo e positivo. O controlo negativo utilizado foi a água, sendo que este controlo permite verificar se existiam quaisquer contaminações que pudessem interferir com a reação.

O MS2 utilizado como controlo interno da extração é posteriormente detetado no painel 1; a deteção do MS2 no processo de amplificação permite, assim, validar o processamento de extração.

Os controlos positivos para todos os painéis foram realizados a partir de combinação de plasmídeos recombinantes e a partir de amostras positivas conhecidas, diluídas para se detetarem entre 20 a 25 ciclos.

3 - Resultados

3- Resultados

Participaram neste estudo 100 crianças, 64 dos diferentes infantários da região de Lisboa e 36 que recorreram à urgência Pediátrica do hospital da Luz.

3.1. Prevalência da infecção viral

Das 100 amostras estudadas, a frequência de amostras positivas foi de 79%, o que corresponde a 79 amostras positivas e 21 negativas.

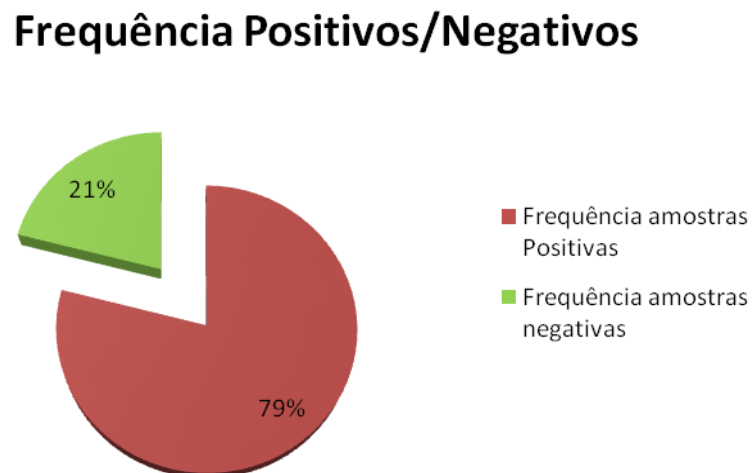


Gráfico 1 – Frequências das amostras positivas e negativas na população estudada.

Das amostras positivas, 61% apresentavam apenas um agente viral e 18% dois ou mais agentes virais (ver gráfico seguinte).

Frequência Negativos/1Virus/2+Virus

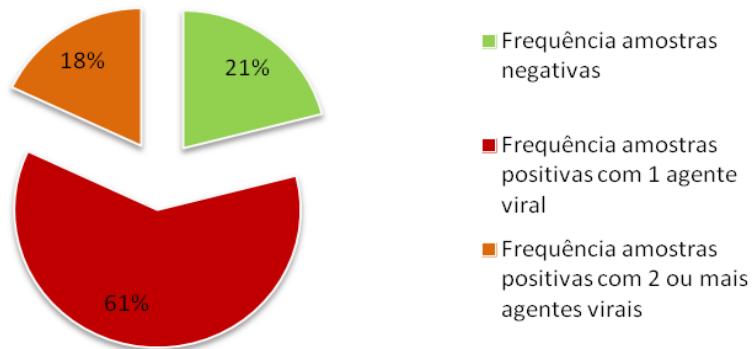


Gráfico 2 – Das 79 amostras positivas, 61 são positivas apenas para um agente e 18 são positivas para dois ou mais vírus.

3.2. Frequência por agente viral

3.2.1. Resultados globais

O agente viral mais frequente nas duas populações estudadas foi o vírus da Gripe A, seguido, por ordem decrescente de frequência, dos metapneumovirus, rinovirus, adenovirus, enterovirus, bocavirus, parainfluenza (1,3), VSR, coronavirus grupo 1 (NL63, 229E), coronavirus grupo 2 (OC43, HKU1), gripe B e parainfluenza (2,4). Apresentam-se no gráfico seguinte os resultados globais do estudo.

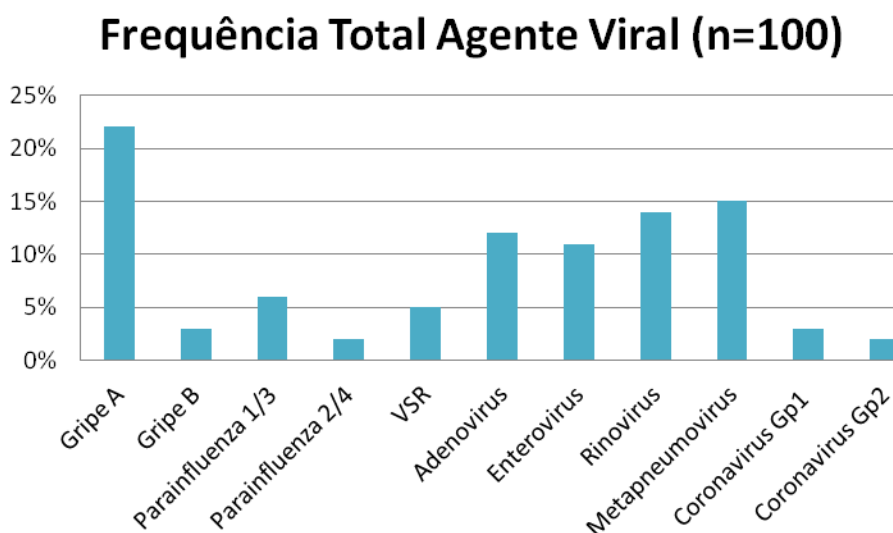


Gráfico 3 – Frequência total dos diferentes agentes virais no número total de amostras (100).

No gráfico seguinte, está representada a comparação dos resultados totais das duas populações. É de referir que os resultados dos infantários são correspondentes a dois períodos diferentes (2011 e 2012) e os resultados do hospital referem-se apenas ao ano de 2012.

Frequência Infantilários/Hospital

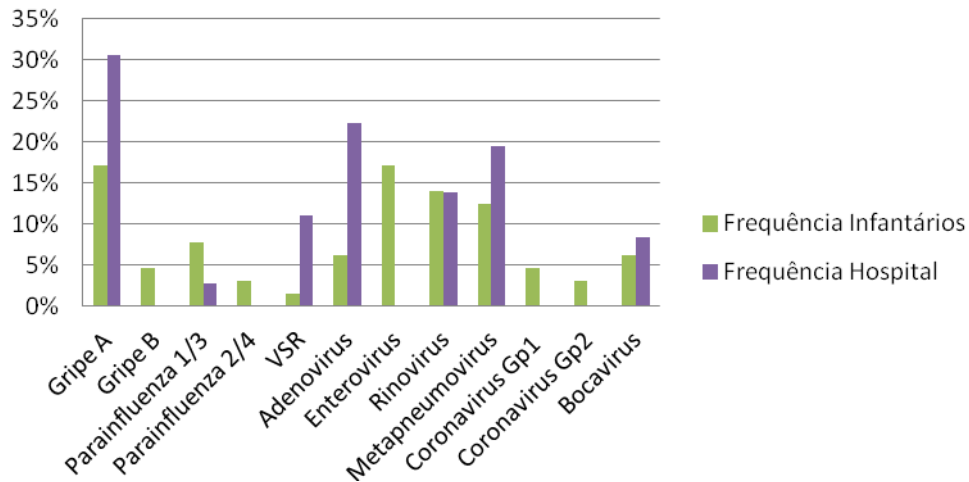


Gráfico 4 – Comparação das frequências dos diferentes vírus respiratórios nas duas populações estudadas (creches e hospital)

3.2.2. Resultados obtidos no ano 2011

Os resultados deste ano referem-se exclusivamente às amostras dos infantários, uma vez que nesse ano apenas essas foram incluídas no estudo. Num total de 28 amostras, observou-se uma taxa de amostras positivas de 64%, que corresponde a um número absoluto de 18 amostras positivas.

Frequência Negativos/ Positivos Infantilários 2011

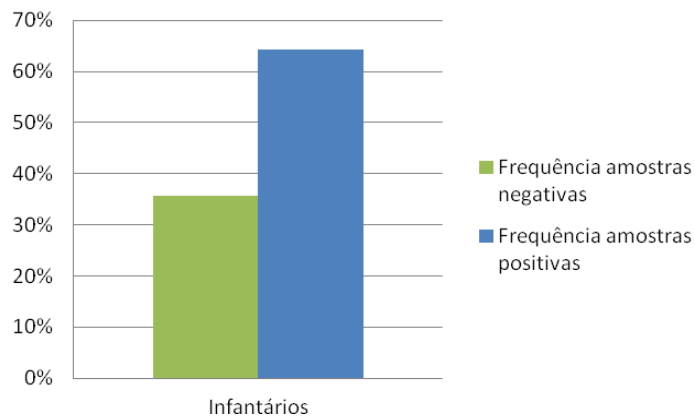


Gráfico 5 – Frequência de amostras negativas e positivas do ano de 2011.

Nas amostras positivas os vírus que tiveram maior destaque foram os enterovirus, seguidos dos parainfluenza (1,3), dos adenovirus, dos rinovirus, dos metapneumovirus, dos coronavirus grupo 2, do VSR, do bocavirus e dos parainfluenza (2,4). Não foram encontradas amostras positivas para a gripe A, para a gripe B e para os coronavirus grupo 1, como se pode verificar na tabela e gráfico seguinte.

Vírus Respiratórios	Ano 2011		Total
	Inverno	Primavera	
Gripe A	0	0	0
Gripe B	0	0	0
Parainfluenza 1/3	2	2	4
Parainfluenza 2/4	1	0	1
VSR	1	0	1
Adenovirus	2	2	4
Enterovirus	8	1	9
Rinovirus	0	2	2
Metapneumovirus	1	2	3
Coronavirus Gp1	0	0	0
Coronavirus Gp2	2	0	2
Bocavirus	1	0	1

Tabela 7 – Número de amostras positivas por cada vírus pesquisado. De referir que o número total de amostras pode ser menor que o número total de vírus respiratórios, uma vez, que em cada amostra pode ser encontrado mais que um vírus respiratório.

Frequência Total 2011 (Infantários)

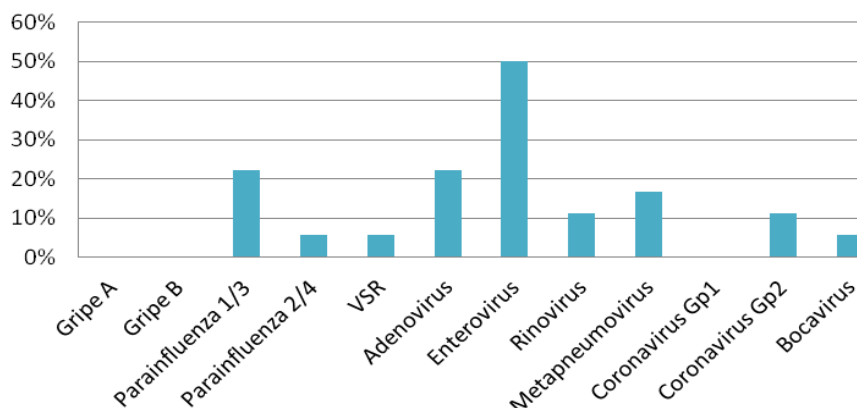


Gráfico 6 – Frequência dos diferentes vírus respiratórios na população estudada no ano 2011.

No gráfico seguinte, podemos ver a comparação dos diferentes vírus respiratórios nos dois períodos, primavera e inverno no ano 2011. Das 10 amostras negativas deste ano, 7 foram no inverno e 3 na primavera.

Frequência Inverno/Primavera 2011 (Infantários)

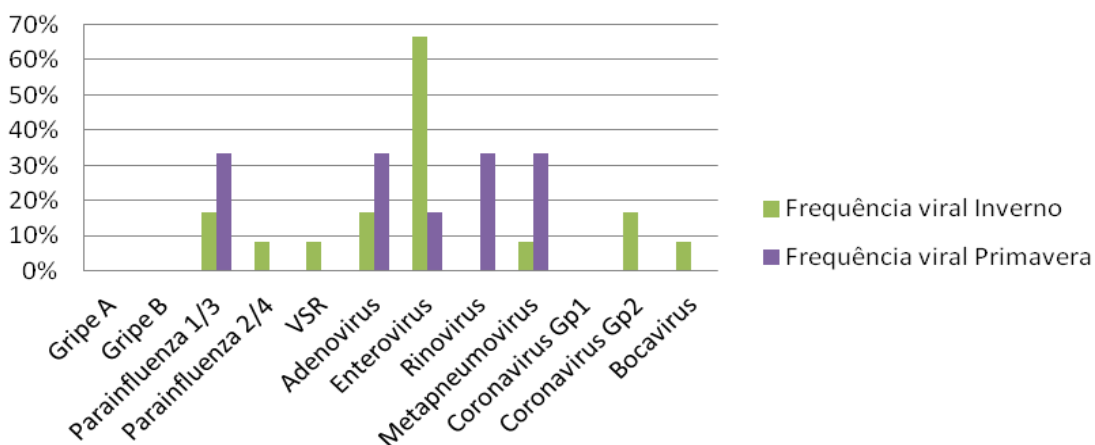


Gráfico 7 – Frequência dos diferentes vírus respiratórios nos dois períodos do ano 2011, inverno e primavera.

Na análise do gráfico verificamos que a maior diferença é a nível dos enterovirus. No entanto, dada a baixa amostragem, esta diferença não é estatisticamente significativa.

3.2.3. Resultados obtidos no ano 2012

Os resultados deste ano referem-se às amostras dos infantários e da urgência Pediátrica do Hospital da Luz. Nos infantários foram incluídas no estudo 35 amostras e da urgência Pediátrica do Hospital da Luz foram incluídas 36 amostras. Das 35 amostras dos infantários, 7 foram negativas e 28 positivas. Das 36 amostras do hospital, 4 foram negativas e 32 positivas.

Frequência de amostras negativas/positivas Infantários e Hospitais 2012

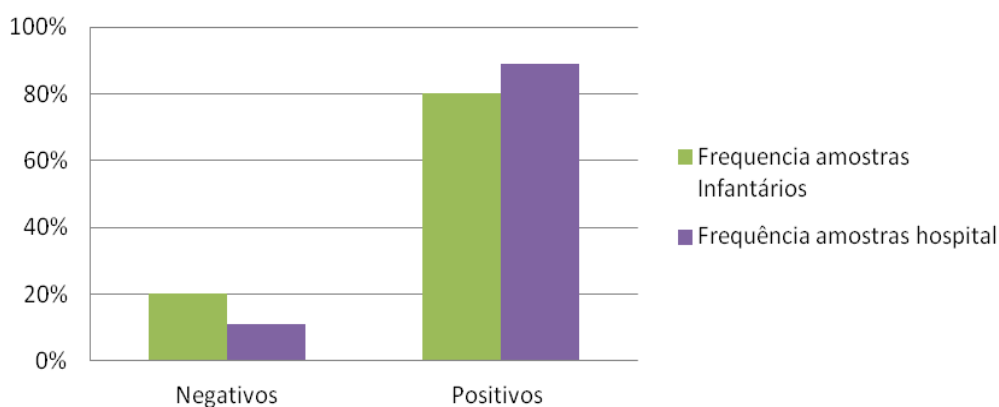


Gráfico 8 – Frequência de amostras positivas e negativas nas duas populações no ano 2012.

Na tabela e no gráfico seguinte, pode-se verificar a comparação dos diferentes vírus nas duas populações estudadas.

Vírus Respiratórios	Ano 2012		Total
	Infantários	Hospital	
Gripe A	11	11	22
Gripe B	3	0	3
Parainfluenza 1/3	1	1	2
Parainfluenza 2/4	1	0	1
VSR	0	4	4
Adenovirus	0	8	8
Enterovirus	2	0	2
Rinovirus	6	5	11
Metapneumovirus	5	7	12
Coronavirus Gp1	3	0	3
Coronavirus Gp2	0	0	0
Bocavirus	3	3	6

Tabela 8 - Número de amostras positivas por cada vírus pesquisado nas duas populações estudadas no ano de 2012. Tal como foi dito anteriormente, é de referir que o número total de amostras pode ser menor que o número total de vírus respiratórios, uma vez, que em cada amostra pode ser encontrado mais que um vírus respiratório.

Frequência Infantários/Hospital (2012)

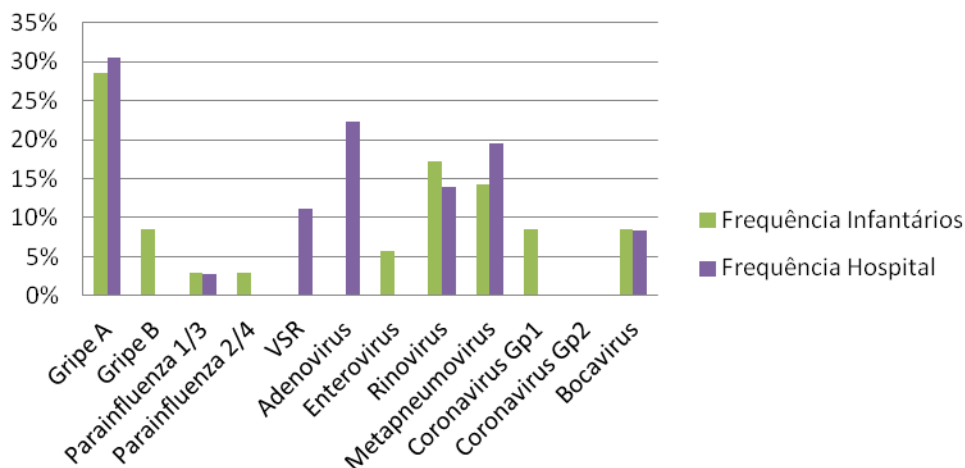


Gráfico 9 – Distribuição das frequências dos diferentes virus respiratorios nas duas populações.

Neste ano, o vírus predominante foi o da gripe A em ambas as populações. De referir que os adenovirus e o VSR apenas foram encontrados em amostras de crianças que se deslocaram à urgência Pediátrica. Por outro lado, o vírus da gripe B, os enterovirus e o vírus parainfluenza 2 e 4 apenas foram encontrados na população das creches. No entanto, apenas com os adenovirus foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ($p= 0,007$, teste exato de *Fisher*) entre as duas populações.

3.3. Relação com gravidade do quadro

Das 67 colheitas realizadas nos infantários/domicílios, obteve-se a informação da evolução do quadro clínico em 44 das crianças intervenientes no estudo. Além da evolução do quadro clínico, obteve-se também a informação se a criança recorreu ou não à urgência, o que aconteceu com 8 crianças. Dessas 8, 4 tiveram amostras positivas para Gripe A (H3), 1 para Gripe B, 1 para Rinovirus e 2 foram negativas para os vírus respiratórios pesquisados.

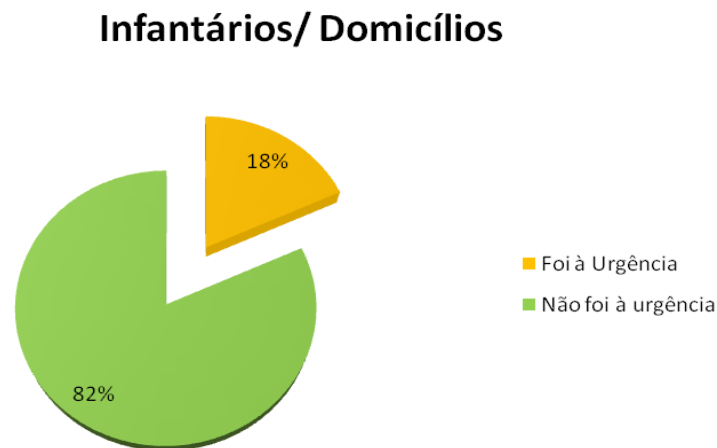


Gráfico 10 – Frequência das crianças das creches que se deslocaram à urgência com as que não se deslocaram

Das 36 colheitas realizadas na urgência pediátrica do Hospital da Luz, 6 necessitaram de internamento. Dessas 6, 2 tiveram amostras positivas para adenovirus, 1 para metapneumovirus, 1 para Rinovirus, 1 para Gripe A (H3) e uma foi negativa para os vírus respiratórios pesquisados.

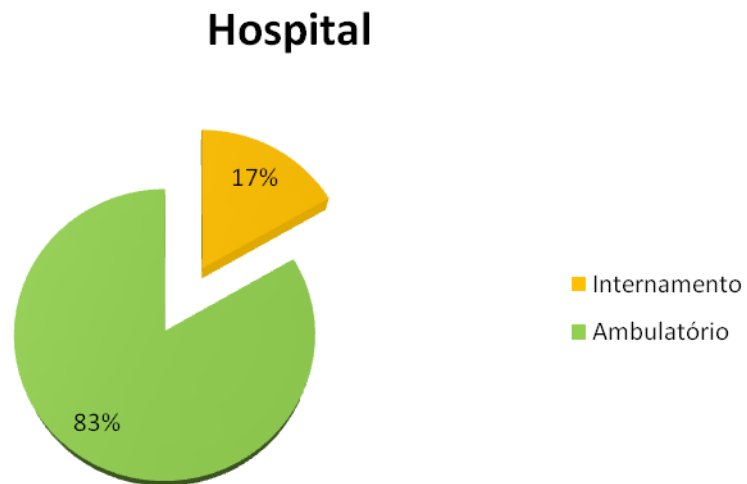


Gráfico 11 – Frequência das crianças que se deslocaram ao Hospital da Luz e ficaram internadas com as que tiveram alta imediata

3.4. Comparação do quadro clínico dos diferentes agentes virais

POSITIVOS COM 1 VÍRUS	F	F + T	F + CN	T + CN	F + T + CN	F + CN + S	T + CN + S	F + T + S	F + T + S + CN
Gripe A	4	3	1	1	10				
Gripe B	1	1							
Adenovirus		1		2	3			1	1
Parainfluenza (1 e 3)		1	2	1					
RSV		1			1			1	
Enterovirus				4	3				
Parainfluenza (2 e 4)				1				1	
Rinovirus	1		1	3	1			1	
Metapneumovirus		1		1	3	1	1		2
Coronavirus Gp1		1		1					
Coronavirus Gp2						1			
POSITIVOS COM 2 VÍRUS									
Adenovirus + Rinovirus					1				
VSR + Enterovirus									1
Enterovirus + Coronavirus Gp2				1					
Metapneumovirus + Coronavirus Gp2									1
Adenovirus + Parainfluenza (1 e 3)				1					
Coronavirus Gp1 + Bocavirus					1				
Coronavirus Gp1 + Gripe B	1								
Rinovirus + Bocavirus									1
Gripe A + Adenovirus		1							
Adenovirus + Metapneumovirus								1	
Adenovirus + VSR			1						
Metapneumovirus + Bocavirus				1					
POSITIVOS COM 3 VÍRUS									
Parainfluenza (1 e 3) + Enterovirus + Bocavirus					1				
Adenovirus + Rinovirus + Metapneumovirus			1						
Gripe A + Rinovirus + Bocavirus			1		1				
Parainfluenza (1 e 3) + Enterovirus + Metapneumovirus		1							

F – Febre T- Tosse C- Congestão nasal S- Sibilância

Tabela 9 – Descrição pormenorizada dos diferentes vírus ou conjuntos de vírus com os sintomas presentes

O conjunto de sintomas mais frequentes é a “febre + tosse + congestão nasal”. Sendo o sintoma menos frequente a sibilância. Relativamente à sibilância fez-se a comparação com os outros vírus respiratórios, tendo-se verificado que apenas os metapneumovirus e os VSR tinham uma associação estatisticamente significativa com a sibilância (respetivamente $p = 0,005$ e $p = 0,04$, Teste exato de *Fisher*).

3.5. Vacinação

Obteve-se informação do estado vacinal de 44 das 67 crianças dos infantários. Destas, apenas três foram vacinadas para a gripe sazonal. Nestes três casos, dois detetou-se um rinovirus e noutro um metapneumovirus.

3.6. Distribuição dos agentes virais pelas diferentes creches e respetivas salas

Nas duas tabelas seguintes são descritos os agentes virais detetados nos diferentes infantários e a sua distribuição por salas, respetivamente no ano 2011 e 2012.

ANO 2011 – INVERNO	
Obra das Crianças da Freguesia da Lapa	
Berçário	Adenovirus + Enterovirus = 1
	Parainfluenza (1,3) = 1
	Enterovirus + Bocavirus = 1
Sala - 1 Ano	Parainfluenza (1,3) = 1;
	Metapneumovirus + Coronavirus Gp2 = 1
	Adenovirus = 1
	Negativo = 1
Sala - 3 Anos	Enterovirus = 1
	Negativos = 2
Sala 4-5 Anos	Enterovirus = 1
Infantário Nossa Senhora da Purificação – Alvalade	
Sala BP	Parainfluenza (2,4) = 1
	Negativo = 1
Sala BC1	Enterovirus = 2
	Enterovirus + Coronavirus Gp2 = 1
Sala BC2	Negativos = 2
Sala 3	VSR + Enterovirus = 1
Associação Ester Janz	
Sala Pintainho	Negativo = 1
ANO 2011 – PRIMAVERA	
Centro Paroquial de Assistência da Freguesia de Santa Maria de Belém	
Sala 4	Metapneumovirus = 1
	Rinovirus = 1
	Negativo = 1
Assistência Paroquial de Santos-o-Velho	
Bebés	Adenovirus + Parainfluenza (1,3) = 1
Menino Jesus	Adenovirus + Rinovirus + Metapneumovirus = 1
	Parainfluenza (1, 3) = 1
Santa Teresinha	Negativo = 1
Sala - 2 anos	Enterovirus = 1
	Rinovirus = 1
	Negativo = 1

Etiologia das infecções respiratórias virais em crianças em idade pré-escolar

ANO 2012 - INVERNO	
Associação de Proteção à Infância da Ajuda	
Berçário	Rinovirus = 1
	Gripe A H3 = 1
Sala Azul	Gripe A H3 = 1
Centro Paroquial de Assistência da Freguesia de Santa Maria de Belém	
Sala 4	Metapneumovirus = 1
	Negativo = 1
Sala 7	Rinovirus = 1
	Negativo = 1
Assistência Paroquial de Santos-o-Velho	
Menino Jesus	Enterovirus = 1
Sociedade de Instrução e Beneficência a Voz do Operário	
Creche	Coronavirus Gp1 + Bocavirus = 1
Pré-escolar	Negativo = 1
Associação de Desenvolvimento Comunitário da Freguesia das Mercês	
Sala da São	Parainfluenza (1,3) + Enterovirus + Metapneumovirus = 1
Sala da Orlanda	Gripe A H3 = 1
	Rinovirus = 1
Sala Patrícia	Rinovirus = 1
	Gripe A H3 = 1
	Metapneumovirus = 1
Associação Ester Janz	
Sala Pintainho	Gripe A H3 = 1
Sala Pavão	Gripe A H3 = 1
Sala Golfinho	Gripe A H3 = 1
Sala Girafa	Gripe A H3 = 1
	Negativo = 1
Sala Papagaio	Coronavirus Gp1 = 1
	Metapneumovirus = 1
Sala Mocho	Gripe A H3 = 1
	Rinovirus + Bocavirus = 1
Sala Joanhina	Metapneumovirus = 1
	Rinovirus + Bocavirus = 1
	Negativo = 1
Sala sapinho	Gripe A H3 = 1
Sala 1	Negativo = 1
Sala 3	Gripe B = 2
	Gripe B + Coronavirus Gp1 = 1

Tabela 10 e 11 – Distribuição dos diferentes agentes virais distribuídos pelas creches e respetivas salas do ano de 2011 e 2012, respetivamente.

3.7. Distribuição dos diferentes agentes virais com a idade das crianças

Agentes virais	Idades							
	≤ 1 ano	1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos	6 anos	7 anos
Gripe A	4	6	4	1	5	1	1	
Gripe B								3
PVI (1,3)	2	2	1					
PVI (2,4)		1						
Adenovirus	8	1	1	2				
Enterovirus	2	4	2	2	1			
Rinovirus	5	1	3	1		1	1	
Coronavirus Gp1			1		1			
Coronavirus Gp2		2						
Metapneumovirus	7	3	3		2			
VSR	4			1				
Bocavirus	3	2	1				1	
Negativos	3	6	3	2	5	1		

Tabela 12 – Distribuição dos diferentes agentes virais com a idade

Neste estudo, os vírus mais frequentes em crianças com menos de um ano foram o adenovirus e o metapneumovirus. Em crianças com um e dois anos de idade o vírus mais frequente foi o vírus da gripe A (H3). Em crianças com três anos de idade a distribuição dos agentes virais é homogênea não havendo prevalência de nenhum vírus, assim foram encontrados em igual número os seguintes vírus: adenovirus e enterovirus. Em crianças com quatro anos de idade o vírus mais prevalente foi o vírus da gripe A (H3). Nas crianças com cinco e seis anos o vírus da gripe A (H3) e os rinovirus foram os vírus encontrados. Por ultimo, nas colheitas realizadas nas três crianças com sete anos de idade, o único vírus encontrado foi a da gripe B.

4 - Discussão dos resultados

Tal como foi referido na introdução, os objetivos deste trabalho relacionavam-se com o estudo da etiologia viral das infecções respiratórias em crianças com idade pré-escolar e com a avaliação de um sistema de sinalização de casos de infeção respiratória. Relativamente ao sistema de alerta, este permitiu o rápido diagnóstico virológico em crianças com infeção respiratória que não recorreram a uma urgência hospitalar e permaneceram nos infantários e/ou nos domicílios. De referir, no entanto, que a adesão dos pais foi abaixo do esperado no primeiro ano, mesmo tendo em conta que não comportava qualquer custo para estes, uma vez que o número verde era gratuito e a colheita era realizada por mim no local onde se encontrava a criança, sem nenhum transtorno para os pais.

Assim, não havendo uma boa adesão por parte dos encarregados de educação, procurou-se melhorar a mesma, realizando uma campanha de sensibilização no outono de 2011, através da realização de sessões formativas, abertas para os profissionais dos infantários e para os encarregados de educação, onde se abordava a temática da importância das infecções respiratórias nas crianças e do interesse do presente estudo, e também através da distribuição de folhetos informativos a todos os encarregados de educação dos infantários participantes. No entanto, a situação não se alterou significativamente no inverno de 2011-2012, exceto no período de atividade gripal, altura em que a adesão ao estudo teve um incremento substancial. Claramente a gripe teve um impacto diferente nos encarregados de educação, relativamente às outras infecções respiratórias causadas pelos outros agentes, pelo que este sistema de vigilância parece promissor em surtos de gripe. No entanto, antes de se concluir sobre a real utilidade deste mecanismo de vigilância, este deverá ser testado em novo estudo especificamente direcionado para este objetivo, utilizando como comparação os sistemas tradicionais de vigilância da gripe. De referir ainda que o surto descrito já foi detetado no final do nosso estudo e assim não foi possível continuar as colheitas. Em suma, embora o número de colheitas não tenha sido aquele que ambicionávamos, a boa adesão por parte dos pais ao estudo durante o surto de gripe A em 2012 enriqueceu significativamente os nossos resultados.

Embora existam muitos trabalhos publicados com estudos de crianças com infeções respiratórias, a maioria dos trabalhos são referentes a crianças que recorreram a serviços de urgência hospitalares. Este trabalho permitiu fazer o estudo da etiologia das infeções respiratórias virais em que se mantiveram no domicílio e/ou infantários. Devido aos factos referidos anteriormente e com o intuito de enriquecer os resultados e permitir assim a comparação entre duas populações, o nosso estudo foi igualmente alargado a uma urgência hospitalar, a Urgência Pediátrica do Hospital da Luz.

Assim, foram estudados dois grupos de crianças com infeção respiratória alta e/ou baixa: as que permaneceram nos infantários e/ou domicílio, e as que se deslocaram à urgência do Hospital da Luz. No primeiro período que decorreu, fevereiro a maio de 2011, tivemos colheitas tanto no inverno como na primavera, enquanto que no segundo período, outubro de 2011 a abril de 2012 tivemos apenas colheitas na época de inverno, outubro de 2011 a abril de 2012, não podendo assim ser feita a comparação entre as duas estações do ano (inverno e primavera) em 2012.

Relativamente aos dados obtidos, é relevante citar, mais uma vez, o baixo número de amostras obtidas. Desta forma, não se conseguiram as diferenças estatisticamente significativas relativamente aos diferentes agentes virais encontrados, com exceção dos adenovirus.

No total foram estudadas 100 amostras de crianças com infeção respiratória, com uma frequência de amostras positivas de 79%. Das amostras positivas 61% apresentava apenas um agente viral e 21% dois ou mais agentes virais. O facto de uma criança apresentar mais de um agente viral, está de acordo com o descrito na literatura, nas quais as infeções virais mistas são relativamente comuns, quando utilizadas técnicas de biologia molecular, dado a elevada sensibilidade das mesmas. Uma eventual desvantagem desta elevada sensibilidade poderá ser a deteção de agentes virais responsáveis por infeções respiratórias anteriores, que podem ainda permanecer nas secreções respiratórias e não serem responsáveis pela infeção respiratória do momento. Aparentemente, as infeções mistas não se traduziram num aumento de gravidade, se consideramos como critérios destas a ida a uma urgência (no caso das crianças que permaneceram nos infantários/domicílios) ou o internamento (no caso das crianças que recorreram à urgência do hospital da luz).

Numa visão global, o agente viral mais frequente nos dois períodos do estudo nas duas populações estudadas foi o vírus da gripe A subtipo H3, sendo este subtipo o responsável pelos casos de gripe sazonal no ano de 2012 em Portugal. No entanto, apesar de ser o vírus mais frequente no que diz respeito ao número de vezes que foi encontrado nas amostras estudadas, este apenas foi encontrado no ano de 2012. Comparando a proveniência das amostras, verificamos que o vírus da gripe B, os vírus parainfluenza (2,4), os enterovirus e os coronavirus grupo 1 e 2 apenas foram encontrados nas amostras colhidas nos infantários/domicílios.

No que diz respeito à análise pormenorizada dos dados obtidos em 2011, exclusivamente dos infantários, como já foi referido, foram obtidas 28 amostras em 64% foram positivas. O agente viral que merece maior destaque são os enterovirus, tendo sido encontrados em nove amostras. No que diz respeito às diferenças entre os agentes virais encontrados no inverno e na primavera, apenas de referir que os enterovirus foram detetados em oito amostras no inverno e em apenas uma no verão.

No âmbito da discussão dos resultados relativamente ao ano de 2012, obtiveram-se 35 amostras das crianças que permaneceram nos infantários/domicílios e 36 amostras de crianças que se deslocaram à urgência do hospital da Luz. Em ambas as populações tivemos uma frequência elevada de amostras positivas, 80 e 89% respetivamente nos infantários e na urgência, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa. Estes dados estão de acordo com o descrito na literatura no que diz respeito às infecções respiratórias em idade pré-escolar serem na sua maioria de origem viral. Tal como foi citado anteriormente obtivemos um número significativo de amostras positivas para a gripe A subtipo H3, dados estes que estão de acordo com os obtidos pelo sistema nacional de vigilância de gripe.

O número de casos encontrados de gripe A foram semelhantes nas duas populações estudadas. Estes dados corroboram o conceito comum de que a gravidade do quadro clínico causado pela gripe sazonal pode apresentar uma variabilidade significativa, desde situações ligeiras e tratadas em casa, sem necessidade de deslocação ao hospital, a situações mais graves que obrigam muitas vezes à necessidade de procura dos serviços de saúde e até mesmo o internamento. Estas situações mais graves podem ser complicações diretas da infeção viral ou infeções secundárias bacterianas.

O VSR e os adenovirus foram detetados com mais frequência em crianças que se deslocaram à urgência do hospital da luz. No entanto, somente os adenovirus apresentaram uma diferença estatisticamente significativa (teste exato de *Fisher*), entre as duas populações, o que sugere que estes vírus poderão estar mais associados a quadros mais graves, o que só poderá ser confirmado com uma amostragem maior.

Relativamente aos sintomas e sinais avaliados, os mais frequentemente encontrados foram a febre, a tosse e a congestão nasal, sendo o menos frequente a sibilância.

A febre esteve presente em todos os casos de gripe A e B, estando este facto de acordo com o descrito na literatura, em que os quadros de gripe apresentam normalmente febre, muitas vezes alta.

A tosse juntamente com a congestão nasal foram os sintomas mais frequentes nas infecções por enterovirus e rinovirus, estando este facto de acordo com o esperado, uma vez que os quadros clínicos descritos nestes agentes virais são habitualmente quadros ligeiros, descritos como as vulgares constipações.

A sibilância não foi encontrada em nenhum dos 25 casos de gripe (22 gripe A e 3 gripe B). Também aqui os nossos dados estão de acordo com a literatura, uma vez que embora a sibilância possa ser uma consequência da infeção gripal, não é uma situação habitual. Comparando a frequência da sibilância na gripe (A e B) com os outros vírus respiratórios identificados, verificou-se uma diferença significativa com o VSR e o metapneumovirus, estes últimos associados à sibilância, o que está igualmente de acordo com o descrito.

Das 67 colheitas efetuadas nas crianças dos infantários obtivemos a informação do estado vacinal de 44 dessas crianças, tendo-se constatado que apenas três tinham sido vacinadas para a gripe sazonal, e em nenhuma dessas foi detetada infeção por vírus influenza.

Com os dados obtidos das colheitas dos infantários no ano 2011 tentou-se relacionar os agentes virais com as diferentes creches e respetivas salas (tabela 10). No entanto, devido ao baixo número de amostras e à sua distribuição por diferentes

infantários e salas, não foi possível obter qualquer associação estatisticamente significativa. A mesma associação foi tentada com as colheitas obtidas em 2012; neste ano, verificou-se um surto de gripe A subtipo H3 a nível nacional, e em três dos infantários em que foram realizadas colheitas neste período foram encontrados casos de gripe. Na “Associação Ester Janz” foi encontrado um número elevado de casos de gripe, mas deve ser referido que isso pode ser explicado por ter sido o infantário onde foram realizadas mais colheitas neste período de surto de gripe, pelo que a amostragem foi maior e, conseqüentemente, a probabilidade de encontrarmos casos de gripe foi superior. Ainda de salientar que a distribuição por salas foi homogênea, havendo casos de gripe identificados em 10 salas deste infantário.

No que diz respeito aos casos de gripe B, os três casos encontrados foram em três crianças com sete anos de idade que frequentavam a mesma sala. Tal como foi descrito ao longo do trabalho, a idade alvo das crianças a incluir no estudo seriam crianças com idade pré-escolar, ou seja, até aos cinco anos de idade. No entanto, ao nos ser referido que estas três crianças eram da mesma sala e apresentavam sintomas de gripe, achámos pertinente fazer as colheitas, tendo sido estes os únicos casos positivos para gripe B detetados em todo o estudo, que aparentemente constituíram um pequeno foco dentro de uma única sala, sem propagação para as outras salas com crianças mais pequenas. De salientar que, em todo o estudo, apenas seis colheitas foram efetuadas em crianças acima dos cinco anos. Os motivos para estas exceções foram os acima referidos, para as crianças com gripe B, e as três crianças com seis anos porque se encontravam ainda em salas pré-escolares.

A distribuição dos agentes virais pelas diferentes idades (tabela 12) está de acordo com o esperado, ou seja, todos os vírus pesquisados neste trabalho podem ser causadores de infecção respiratória em crianças em idade pré-escolar, havendo pelo menos dois casos positivos em cada um dos vírus pesquisados. Nota-se uma tendência para um maior número de infecções nas idades mais baixas, particularmente nos dois primeiros anos.

5 - Conclusões

Este trabalho permitiu-nos retirar algumas conclusões que se poderão resumir da seguinte forma:

Neste estudo foi ensaiado um sistema de alerta para a equipa de investigação que permitiu o rápido diagnóstico virológico em crianças com infeção respiratória que não recorreram a urgência hospitalar, tendo a adesão dos pais sido abaixo do esperado, exceto no período de atividade gripal, o que contribui decisivamente para a elevada prevalência de gripe A (H3) neste estudo. Este sistema de alerta parece promissor para uma eventual utilização futura em períodos de atividade gripal.

A inclusão no estudo da urgência pediátrica do Hospital da Luz permitiu a comparação entre as duas populações e enriqueceu os resultados deste trabalho. No entanto, o baixo número de amostras obtidas nas duas populações dificultou a interpretação dos resultados e as referidas conclusões.

Este estudo reforça ainda a importância de se utilizarem técnicas de biologia molecular para o diagnóstico etiológico das infecções respiratórias, devido à elevada sensibilidade das mesmas, o que se reflete na elevada percentagem de amostras positivas, algumas delas com mais que um agente. O facto de se utilizarem técnicas *multiplex*, que permitem a pesquisa simultânea de vários vírus, facilitou a deteção de um maior espetro destes agentes.

Verificou-se que a percentagem de amostras positivas foi mais elevada nas crianças que recorreram à urgência, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. A circulação de algum vírus que possa causar sintomatologia respiratória ligeira e que não seja detetado pela metodologia utilizada, é uma possibilidade para explicar a percentagem de negativos (superior a 30% no primeiro ano) nas crianças que não recorreram à urgência. No entanto, a hipótese dos quadros clínicos terem uma origem não viral (bacteriana? Não infecciosa?) não pode ser descartada.

A presença de uma infeção mista por 2 ou 3 agentes aparentemente não agravou o quadro clínico.

Aspetos mais relevantes da deteção viral específica:

- Gripe: o subtipo da gripe A detetado foi sempre o H3 e apenas em 2012. Os vírus da gripe nunca estiveram associados a sibilância;
- Os adenovirus e o VSR foram mais frequentes nas crianças que recorreram à urgência, embora a diferença seja estatisticamente significativa apenas para os adenovirus;
- Pelo contrário, os enterovirus não foram detetados a nível hospitalar, apenas nos infantários, tendo inclusivamente sido os vírus mais detetados em 2011;
- Os bocavirus nunca foram detetados isoladamente, o que está de acordo com as interrogações que outros autores levantam sobre o papel patogénico deste vírus.

Em suma, as técnicas de biologia molecular são essenciais para se alargar o espectro de deteção dos agentes virais responsáveis pelas infecções respiratórias em pediatria. A deteção dos vírus da gripe em crianças em idade pré-escolar pode ser um contributo importante na vigilância epidemiológica desta infeção.

6 – Referências bibliográficas

1. **Allander, T., M. T. Tammi, M. Eriksson, A. Bjerkner, A. Tiveljung-Lindell, and B. Andersson.** 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:12891-12896.
2. **American Society of Virology, S. o. G. M., Virology divisions of IUMS** 2003, posting date. *International Committee of Taxonomy of Viruses*
3. **Anderson, L. J., R. A. Parker, and R. L. Strikas.** 1990. Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. *The Journal of infectious diseases* **161**:640-646.
4. **Anne A. Gershon, P. J. H., Samuel L. Katz.** 2004. *Krugman's Infectious Diseases of Children*, Eleventh Edition ed.
5. **Arruda, E., A. Pitkaranta, T. J. Wittek, Jr., C. A. Doyle, and F. G. Hayden.** 1997. Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn. *Journal of clinical microbiology* **35**:2864-2868.
6. **B., V. M. R. G.** 2003. Establishment of Respiratory Syncytial Virus Persistence in Cell Lines: Association with Defective Interfering Particles. *Medical and Scientific Publishers.*
7. **Baker, K. A., and M. E. Ryan.** 1999. RSV infection in infants and young children. What's new in diagnosis, treatment, and prevention? *Postgraduate medicine* **106**:97-99, 103-104, 107-108 passim.
8. **Barenfanger, J., C. Drake, N. Leon, T. Mueller, and T. Troutt.** 2000. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *Journal of clinical microbiology* **38**:2824-2828.
9. **Bhat, N., J. G. Wright, K. R. Broder, E. L. Murray, M. E. Greenberg, M. J. Glover, A. M. Likos, D. L. Posey, A. Klimov, S. E. Lindstrom, A. Balish, M. J. Medina, T. R. Wallis, J. Guarner, C. D. Paddock, W. J. Shieh, S. R. Zaki, J. J. Sejvar, D. K. Shay, S. A. Harper, N. J. Cox, K. Fukuda, and T. M. Uyeki.** 2005. Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003-2004. *The New England journal of medicine* **353**:2559-2567.
10. **Bicer, S., T. Giray, D. Col, G. C. Erdag, A. Vitrinel, Y. Gurol, G. Celik, C. Kaspar, and O. Kucuk.** 2013. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Italian journal of pediatrics* **39**:22.
11. **Boivin, G., Y. Abed, G. Pelletier, L. Ruel, D. Moisan, S. Cote, T. C. Peret, D. D. Erdman, and L. J. Anderson.** 2002. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *The Journal of infectious diseases* **186**:1330-1334.
12. **Bouvier, N. M., and P. Palese.** 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**:D49-53.
13. **Braciale, T. J., J. Sun, and T. S. Kim.** 2012. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nature reviews. Immunology* **12**:295-305.
14. **Brittain-Long, R., L. M. Andersson, S. Olofsson, M. Lindh, and J. Westin.** 2012. Seasonal variations of 15 respiratory agents illustrated by the application of a multiplex polymerase chain reaction assay. *Scandinavian journal of infectious diseases* **44**:9-17.
15. **Byington, C. L., H. Castillo, K. Gerber, J. A. Daly, L. A. Brimley, S. Adams, J. C. Christenson, and A. T. Pavia.** 2002. The effect of rapid respiratory viral diagnostic testing on antibiotic use in a children's hospital. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* **156**:1230-1234.
16. **Calvo, C., M. L. Garcia-Garcia, C. Blanco, M. C. Vazquez, M. E. Frias, P. Perez-Brena, and I. Casas.** 2008. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **42**:268-272.

17. **Canducci, F., M. Debiaggi, M. Sampaolo, M. C. Marinozzi, S. Berre, C. Terulla, G. Gargantini, P. Cambieri, E. Romero, and M. Clementi.** 2008. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *Journal of medical virology* **80**:716-723.
18. **Chan, K. H., J. S. Peiris, W. Lim, J. M. Nicholls, and S. S. Chiu.** 2008. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **42**:65-69.
19. **Chen, H., G. J. Smith, S. Y. Zhang, K. Qin, J. Wang, K. S. Li, R. G. Webster, J. S. Peiris, and Y. Guan.** 2005. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* **436**:191-192.
20. **Cheng, V. C., S. K. Lau, P. C. Woo, and K. Y. Yuen.** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clinical microbiology reviews* **20**:660-694.
21. **Chin, T. D., W. H. Mosley, J. D. Poland, D. Rush, E. A. Belden, and O. Johnson.** 1963. Epidemiologic studies of type B influenza in 1961-1962. *American journal of public health and the nation's health* **53**:1068-1074.
22. **Dawood, F. S., S. Jain, L. Finelli, M. W. Shaw, S. Lindstrom, R. J. Garten, L. V. Gubareva, X. Xu, C. B. Bridges, and T. M. Uyeki.** 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *The New England journal of medicine* **360**:2605-2615.
23. **de Arruda, E., F. G. Hayden, J. F. McAuliffe, M. A. de Sousa, S. B. Mota, M. I. McAuliffe, F. C. Geist, E. P. Carvalho, M. C. Fernandes, R. L. Guerrant, and et al.** 1991. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. *The Journal of infectious diseases* **164**:252-258.
24. **DeVincenzo, J. P., C. M. El Saleeby, and A. J. Bush.** 2005. Respiratory syncytial virus load predicts disease severity in previously healthy infants. *The Journal of infectious diseases* **191**:1861-1868.
25. **Edwards, K. M., Y. Zhu, M. R. Griffin, G. A. Weinberg, C. B. Hall, P. G. Szilagyi, M. A. Staat, M. Iwane, M. M. Prill, and J. V. Williams.** 2013. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *The New England journal of medicine* **368**:633-643.
26. **Englund, J. A., P. A. Piedra, and E. Whimbey.** 1997. Prevention and treatment of respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses in immunocompromised patients. *The American journal of medicine* **102**:61-70; discussion 75-66.
27. **Falsey, A. R.** 2008. Human metapneumovirus infection in adults. *The Pediatric infectious disease journal* **27**:S80-83.
28. **Falsey, A. R., M. A. Formica, J. J. Treanor, and E. E. Walsh.** 2003. Comparison of quantitative reverse transcription-PCR to viral culture for assessment of respiratory syncytial virus shedding. *Journal of clinical microbiology* **41**:4160-4165.
29. **Falsey, A. R., M. A. Formica, and E. E. Walsh.** 2002. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. *Journal of clinical microbiology* **40**:817-820.
30. **Forster, J., G. Ihorst, C. H. Rieger, V. Stephan, H. D. Frank, H. Gurth, R. Berner, A. Rohwedder, H. Werchau, M. Schumacher, T. Tsai, and G. Petersen.** 2004. Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infections in children under 3 years of age (the PRIDE study). *European journal of pediatrics* **163**:709-716.
31. **Franz, A., O. Adams, R. Willems, L. Bonzel, N. Neuhausen, S. Schweizer-Krantz, J. U. Rüggeberg, R. Willers, B. Henrich, H. Schrotten, and T. Tenenbaum.** 2010. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *Journal of clinical*

- virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology **48**:239-245.
32. **Frey-muth, F., A. Vabret, J. Dina, D. Cu-villon-Nimal, C. Lubin, A. Vaudecrane, B. Guillois, S. Gouarin, J. Petitjean, F. Lafaix-Delaire, and J. Brouard.** 2010. [Bronchiolitis viruses]. Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie **17**:1192-1201.
 33. **Fry, A. M., X. Lu, S. J. Olsen, M. Chittaganpitch, P. Sawatwong, S. Chantra, H. C. Baggett, and D. Erdman.** 2011. Human rhinovirus infections in rural Thailand: epidemiological evidence for rhinovirus as both pathogen and bystander. PloS one **6**:e17780.
 34. **Gamblin, S. J., and J. J. Skehel.** 2010. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. The Journal of biological chemistry **285**:28403-28409.
 35. **Garcia-Garcia, M. L., C. Calvo, F. Martin, P. Perez-Brena, B. Acosta, and I. Casas.** 2006. Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain. Archives of disease in childhood **91**:290-295.
 36. **Garten, R. J., C. T. Davis, C. A. Russell, B. Shu, S. Lindstrom, A. Balish, W. M. Sessions, X. Xu, E. Skepner, V. Deyde, M. Okomo-Adhiambo, L. Gubareva, J. Barnes, C. B. Smith, S. L. Emery, M. J. Hillman, P. Rivaller, J. Smagala, M. de Graaf, D. F. Burke, R. A. Fouchier, C. Pappas, C. M. Alpuche-Aranda, H. Lopez-Gatell, H. Olivera, I. Lopez, C. A. Myers, D. Faix, P. J. Blair, C. Yu, K. M. Keene, P. D. Dotson, Jr., D. Boxrud, A. R. Sambol, S. H. Abid, K. St George, T. Bannerman, A. L. Moore, D. J. Stringer, P. Blevins, G. J. Demmler-Harrison, M. Ginsberg, P. Kriner, S. Waterman, S. Smole, H. F. Guevara, E. A. Belongia, P. A. Clark, S. T. Beatrice, R. Donis, J. Katz, L. Finelli, C. B. Bridges, M. Shaw, D. B. Jernigan, T. M. Uyeki, D. J. Smith, A. I. Klimov, and N. J. Cox.** 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science (New York, N.Y.) **325**:197-201.
 37. **Ghendon, Y. Z., A. N. Kaira, and G. A. Elshina.** 2006. The effect of mass influenza immunization in children on the morbidity of the unvaccinated elderly. Epidemiology and infection **134**:71-78.
 38. **Girard, M., L. Palkonyay, and M. P. Kiény.** 2008. Report of the 4th meeting on the "Evaluation of pandemic influenza prototype vaccines in clinical trials." World Health Organization, Geneva, Switzerland, 14-15 February 2008. Vaccine **26**:4975-4977.
 39. **Girard, M. P., T. Cherian, Y. Pervikov, and M. P. Kiény.** 2005. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. Vaccine **23**:5708-5724.
 40. **Glezen, W. P.** 2004. The changing epidemiology of respiratory syncytial virus and influenza: impetus for new control measures. The Pediatric infectious disease journal **23**:S202-206.
 41. **Glezen, W. P.** 1980. Considerations of the risk of influenza in children and indications for prophylaxis. Reviews of infectious diseases **2**:408-420.
 42. **Glezen, W. P.** 1996. Emerging infections: pandemic influenza. Epidemiologic reviews **18**:64-76.
 43. **Glezen, W. P., L. H. Taber, A. L. Frank, and J. A. Kasel.** 1986. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. American journal of diseases of children (1960) **140**:543-546.
 44. **Grijalva, C. G., A. S. Craig, W. D. Dupont, C. B. Bridges, S. J. Schrag, M. K. Iwane, W. Schaffner, K. M. Edwards, and M. R. Griffin.** 2006. Estimating influenza hospitalizations among children. Emerging infectious diseases **12**:103-109.
 45. **Grondahl, B., W. Puppe, J. Weigl, and H. J. Schmitt.** 2005. Comparison of the BD Directigen Flu A+B Kit and the Abbott TestPack RSV with a multiplex RT-PCR ELISA for rapid detection of influenza viruses and respiratory syncytial virus. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **11**:848-850.

46. **Guan, Y., L. L. Poon, C. Y. Cheung, T. M. Ellis, W. Lim, A. S. Lipatov, K. H. Chan, K. M. Sturm-Ramirez, C. L. Cheung, Y. H. Leung, K. Y. Yuen, R. G. Webster, and J. S. Peiris.** 2004. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:8156-8161.
47. **Guan, Y., B. J. Zheng, Y. Q. He, X. L. Liu, Z. X. Zhuang, C. L. Cheung, S. W. Luo, P. H. Li, L. J. Zhang, Y. J. Guan, K. M. Butt, K. L. Wong, K. W. Chan, W. Lim, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, J. S. Peiris, and L. L. Poon.** 2003. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science (New York, N.Y.)* **302**:276-278.
48. **Guo, L., R. Gonzalez, Z. Xie, H. Zhou, C. Liu, C. Wu, G. Paranhos-Baccala, G. Vernet, K. Shen, Q. Jin, and J. Wang.** 2011. Bocavirus in children with respiratory tract infections. *Emerging infectious diseases* **17**:1775-1777.
49. **Hall, C. B.** 2001. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *The New England journal of medicine* **344**:1917-1928.
50. **Hall, C. B., E. E. Walsh, C. E. Long, and K. C. Schnabel.** 1991. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases* **163**:693-698.
51. **Heikkinen, T., J. Marttila, A. A. Salmi, and O. Ruuskanen.** 2002. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *Journal of clinical microbiology* **40**:4337-4339.
52. **Heilman, C. A.** 1990. From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases and the World Health Organization. Respiratory syncytial and parainfluenza viruses. *The Journal of infectious diseases* **161**:402-406.
53. **Henrickson, K. J.** 2004. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *The Pediatric infectious disease journal* **23**:S6-10.
54. **Henrickson, K. J.** 2003. Parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews* **16**:242-264.
55. **Holmes, E. C., E. Ghedin, N. Miller, J. Taylor, Y. Bao, K. St George, B. T. Grenfell, S. L. Salzberg, C. M. Fraser, D. J. Lipman, and J. K. Taubenberger.** 2005. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS biology* **3**:e300.
56. **Ieven, M.** 2007. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **40**:259-276.
57. **Izurieta, H. S., W. W. Thompson, P. Kramarz, D. K. Shay, R. L. Davis, F. DeStefano, S. Black, H. Shinefield, and K. Fukuda.** 2000. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. *The New England journal of medicine* **342**:232-239.
58. **Jacques, J., H. Moret, D. Minette, N. Leveque, N. Jovenin, G. Deslee, F. Lebargy, J. Motte, and L. Andreoletti.** 2008. Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *Journal of clinical microbiology* **46**:206-213.
59. **Jain, R., and R. D. Goldman.** 2009. Novel influenza A(H1N1): clinical presentation, diagnosis, and management. *Pediatric emergency care* **25**:791-796.
60. **Jartti, T., K. Hedman, L. Jartti, O. Ruuskanen, T. Allander, and M. Soderlund-Venermo.** 2012. Human bocavirus-the first 5 years. *Reviews in medical virology* **22**:46-64.
61. **Jartti, T., L. Jartti, O. Ruuskanen, and M. Soderlund-Venermo.** 2012. New respiratory viral infections. *Current opinion in pulmonary medicine* **18**:271-278.
62. **Jevsnik, M., T. Ursic, N. Zigon, L. Lusa, U. Krivec, and M. Petrovec.** 2012. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC infectious diseases* **12**:365.

63. **Johnston, S. L., and C. S. Siegel.** 1990. Evaluation of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, centrifugation culture, and conventional culture for the detection of respiratory syncytial virus. *Journal of clinical microbiology* **28**:2394-2397.
64. **Kahn, J. S.** 2006. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clinical microbiology reviews* **19**:546-557.
65. **Kapoor, A., P. Simmonds, E. Slikas, L. Li, L. Bodhidatta, O. Sethabutr, H. Triki, O. Bahri, B. S. Oderinde, M. M. Baba, D. N. Bukbuk, J. Besser, J. Bartkus, and E. Delwart.** 2010. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *The Journal of infectious diseases* **201**:1633-1643.
66. **Kaverin, N. V.** 1980. [Genome of influenza virus: organization, function, evolution]. *Molekuliarnaia biologii* **14**:245-260.
67. **Kehl, S. C., and S. Kumar.** 2009. Utilization of nucleic acid amplification assays for the detection of respiratory viruses. *Clinics in laboratory medicine* **29**:661-671.
68. **Kesebir, D., M. Vazquez, C. Weibel, E. D. Shapiro, D. Ferguson, M. L. Landry, and J. S. Kahn.** 2006. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *The Journal of infectious diseases* **194**:1276-1282.
69. **Kim, S., H. Sung, H. J. Im, S. J. Hong, and M. N. Kim.** 2009. Molecular epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of human metapneumovirus infection in a pediatric hemato-oncology patient population. *Journal of clinical microbiology* **47**:1221-1224.
70. **Kohlmeier, J. E., and D. L. Woodland.** 2009. Immunity to respiratory viruses. *Annual review of immunology* **27**:61-82.
71. **Korppi, M.** 2002. Mixed microbial aetiology of community-acquired pneumonia in children. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **110**:515-522.
72. **Kroll, J. L., and A. Weinberg.** 2011. Human metapneumovirus. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **32**:447-453.
73. **Kuiken, T., and J. K. Taubenberger.** 2008. Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* **26 Suppl 4**:D59-66.
74. **Kusel, M. M., N. H. de Klerk, P. G. Holt, T. Keadze, S. L. Johnston, and P. D. Sly.** 2006. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *The Pediatric infectious disease journal* **25**:680-686.
75. **Lambert, S. B., D. M. Whiley, N. T. O'Neill, E. C. Andrews, F. M. Canavan, C. Bletchly, D. J. Siebert, T. P. Sloots, and M. D. Nissen.** 2008. Comparing nose-throat swabs and nasopharyngeal aspirates collected from children with symptoms for respiratory virus identification using real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics* **122**:e615-620.
76. **Leung, A. K., J. D. Kellner, and D. W. Johnson.** 2004. Viral croup: a current perspective. *Journal of pediatric health care : official publication of National Association of Pediatric Nurse Associates & Practitioners* **18**:297-301.
77. **Li, J., Z. Wang, R. Gonzalez, Y. Xiao, H. Zhou, J. Zhang, G. Paranhos-Baccala, G. Vernet, Q. Jin, J. Wang, and T. Hung.** 2012. Prevalence of human metapneumovirus in adults with acute respiratory tract infection in Beijing, China. *The Journal of infection* **64**:96-103.
78. **Lipatov, A. S., E. A. Govorkova, R. J. Webby, H. Ozaki, M. Peiris, Y. Guan, L. Poon, and R. G. Webster.** 2004. Influenza: emergence and control. *Journal of virology* **78**:8951-8959.
79. **Liu, J., H. Xiao, F. Lei, Q. Zhu, K. Qin, X. W. Zhang, X. L. Zhang, D. Zhao, G. Wang, Y. Feng, J. Ma, W. Liu, J. Wang, and G. F. Gao.** 2005. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science (New York, N.Y.)* **309**:1206.

80. **Liu, W. K., Q. Liu, D. H. Chen, H. X. Liang, X. K. Chen, W. B. Huang, S. Qin, Z. F. Yang, and R. Zhou.** 2013. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC infectious diseases* **13**:28.
81. **Lu, G., R. Gonzalez, L. Guo, C. Wu, J. Wu, G. Vernet, G. Paranhos-Baccala, J. Wang, and T. Hung.** 2011. Large-scale seroprevalence analysis of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections in Beijing, China. *Virology journal* **8**:62.
82. **Lynch, J. P., 3rd, M. Fishbein, and M. Echavarría.** 2011. Adenovirus. *Seminars in respiratory and critical care medicine* **32**:494-511.
83. **Mahony, J. B.** 2008. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clinical microbiology reviews* **21**:716-747.
84. **Makela, M. J., T. Puhakka, O. Ruuskanen, M. Leinonen, P. Saikku, M. Kimpimäki, S. Blomqvist, T. Hyypia, and P. Arstila.** 1998. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *Journal of clinical microbiology* **36**:539-542.
85. **Mazumdar, J., M. Chawla-Sarkar, K. Rajendran, A. Ganguly, U. K. Sarkar, S. Ghosh, M. D. Sarkar, and S. Maulik.** 2013. Burden of respiratory tract infections among paediatric in and out-patient units during 2010-11. *European review for medical and pharmacological sciences* **17**:802-808.
86. **Mills, J. t., J. E. Van Kirk, P. F. Wright, and R. M. Chanock.** 1971. Experimental respiratory syncytial virus infection of adults. Possible mechanisms of resistance to infection and illness. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **107**:123-130.
87. **Mizgerd, J. P.** 2006. Lung infection--a public health priority. *PLoS medicine* **3**:e76.
88. **Monto, A. S., A. M. Fendrick, and M. W. Sarnes.** 2001. Respiratory illness caused by picornavirus infection: a review of clinical outcomes. *Clinical therapeutics* **23**:1615-1627.
89. **Mullins, J. A., A. C. Lamonte, J. S. Bresee, and L. J. Anderson.** 2003. Substantial variability in community respiratory syncytial virus season timing. *The Pediatric infectious disease journal* **22**:857-862.
90. **Munoz, F. M.** 2002. The impact of influenza in children. *Seminars in pediatric infectious diseases* **13**:72-78.
91. **Murphy, B. R., D. W. Alling, M. H. Snyder, E. E. Walsh, G. A. Prince, R. M. Chanock, V. G. Hemming, W. J. Rodriguez, H. W. Kim, B. S. Graham, and et al.** 1986. Effect of age and preexisting antibody on serum antibody response of infants and children to the F and G glycoproteins during respiratory syncytial virus infection. *Journal of clinical microbiology* **24**:894-898.
92. **Musher, D. M.** 2003. How contagious are common respiratory tract infections? *The New England journal of medicine* **348**:1256-1266.
93. **Nakajima, K.** 2003. [The mechanism of antigenic shift and drift of human influenza virus]. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* **61**:1897-1903.
94. **National Centers for Immunization and Respiratory Diseases, D. o. v. D.** 2011, posting date. Centers for Disease Control and Prevention
95. **National Centers for Immunization and Respiratory Diseases, D. o. v. D.** 2012, posting date. Centers for diseases control and prevention
96. **National Centers for Immunization and Respiratory Diseases, D. o. v. D.** 2010. Centers for Diseases Control and Prevention.
97. **Neuzil, K. M., B. G. Mellen, P. F. Wright, E. F. Mitchel, Jr., and M. R. Griffin.** 2000. The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. *The New England journal of medicine* **342**:225-231.
98. **Ohm-Smith, M. J., P. S. Nassos, and B. L. Haller.** 2004. Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen, and BD Directigen EZ assays for detection of respiratory syncytial virus. *Journal of clinical microbiology* **42**:2996-2999.
99. **Organization, W. H.** 2004. *The World Health Report 2004.*

100. **Papenburg, J., and G. Boivin.** 2010. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Reviews in medical virology* **20**:245-260.
101. **Paranhos-Baccala, G., F. Komurian-Pradel, N. Richard, G. Vernet, B. Lina, and D. Floret.** 2008. Mixed respiratory virus infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **43**:407-410.
102. **Pediatrics, A. A. o.** 2009. Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases, Respiratory Syncytial Virus.
103. **Pedneault, L., L. Robillard, and J. P. Turgeon.** 1994. Validation of respiratory syncytial virus enzyme immunoassay and shell vial assay results. *Journal of clinical microbiology* **32**:2861-2864.
104. **Peltola, V., M. Waris, R. Osterback, P. Susi, T. Hyypia, and O. Ruuskanen.** 2008. Clinical effects of rhinovirus infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **43**:411-414.
105. **Peret, T. C., G. Boivin, Y. Li, M. Couillard, C. Humphrey, A. D. Osterhaus, D. D. Erdman, and L. J. Anderson.** 2002. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *The Journal of infectious diseases* **185**:1660-1663.
106. **Poehling, K. A., K. M. Edwards, G. A. Weinberg, P. Szilagyi, M. A. Staat, M. K. Iwane, C. B. Bridges, C. G. Grijalva, Y. Zhu, D. I. Bernstein, G. Herrera, D. Erdman, C. B. Hall, R. Seither, and M. R. Griffin.** 2006. The underrecognized burden of influenza in young children. *The New England journal of medicine* **355**:31-40.
107. **Popow-Kraupp, T., and J. H. Aberle.** 2011. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *The open microbiology journal* **5**:128-134.
108. **Prill, M. M., M. K. Iwane, K. M. Edwards, J. V. Williams, G. A. Weinberg, M. A. Staat, M. J. Wilby, H. K. Talbot, C. B. Hall, P. G. Szilagyi, M. R. Griffin, A. T. Curns, and D. D. Erdman.** 2012. Human coronavirus in young children hospitalized for acute respiratory illness and asymptomatic controls. *The Pediatric infectious disease journal* **31**:235-240.
109. **Putto, A.** 1987. Febrile exudative tonsillitis: viral or streptococcal? *Pediatrics* **80**:6-12.
110. **Ralph D. Feigin, G. J. D.-H., Sheldon L. Kaplan; James D. Cherry.** 2009. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 6 th edition ed, vol. 2.
111. **Ralph D. Feigin, G. J. D.-H., Sheldon L. Kaplan; James D. Cherry.** 2009. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, vol. 1.
112. **Reina, J., M. Gonzalez Gardenas, E. Ruiz de Gopegui, E. Padilla, F. Ballesteros, M. Mari, and M. Munar.** 2004. Prospective evaluation of a dot-blot enzyme immunoassay (Directigen RSV) for the antigenic detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates of paediatric patients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **10**:967-971.
113. **Ren, L., Z. Xiang, L. Guo, and J. Wang.** 2012. Viral infections of the lower respiratory tract. *Current infectious disease reports* **14**:284-291.
114. **Ribes, J. A., J. P. Seabolt, and S. B. Overman.** 2002. Performance characteristics of VIDAS and directigen respiratory syncytial virus (RSV) antigen detection assays and culture for the identification of RSV in respiratory specimens. *Journal of clinical microbiology* **40**:1818-1820.
115. **Rosekrans, J. A.** 1998. Viral croup: current diagnosis and treatment. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* **73**:1102-1106; discussion 1107.
116. **Rota, P. A., M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K.**

- McCausland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. D. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, and W. J. Bellini. 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science (New York, N.Y.)* **300**:1394-1399.
117. Ruuskanen, O., E. Lahti, L. C. Jennings, and D. R. Murdoch. 2011. Viral pneumonia. *Lancet* **377**:1264-1275.
118. Scalera, N. M., and S. B. Mossad. 2009. The first pandemic of the 21st century: a review of the 2009 pandemic variant influenza A (H1N1) virus. *Postgraduate medicine* **121**:43-47.
119. Schomacker, H., A. Schaap-Nutt, P. L. Collins, and A. C. Schmidt. 2012. Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Current opinion in virology* **2**:294-299.
120. Scott, J. A., W. A. Brooks, J. S. Peiris, D. Holtzman, and E. K. Mulholland. 2008. Pneumonia research to reduce childhood mortality in the developing world. *The Journal of clinical investigation* **118**:1291-1300.
121. Shay, D. K., R. C. Holman, R. D. Newman, L. L. Liu, J. W. Stout, and L. J. Anderson. 1999. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **282**:1440-1446.
122. Smith, D. J., A. S. Lapedes, J. C. de Jong, T. M. Bestebroer, G. F. Rimmelzwaan, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2004. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science (New York, N.Y.)* **305**:371-376.
123. Smith, G. J., D. Vijaykrishna, J. Bahl, S. J. Lycett, M. Worobey, O. G. Pybus, S. K. Ma, C. L. Cheung, J. Raghwani, S. Bhatt, J. S. Peiris, Y. Guan, and A. Rambaut. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**:1122-1125.
124. Smith, M. C., C. Creutz, and Y. T. Huang. 1991. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by shell vial technique. *Journal of clinical microbiology* **29**:463-465.
125. Stempel, H. E., E. T. Martin, J. Kuypers, J. A. Englund, and D. M. Zerr. 2009. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* **98**:123-126.
126. Sullender, W. M. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clinical microbiology reviews* **13**:1-15, table of contents.
127. Tapparel, C., F. Siegrist, T. J. Petty, and L. Kaiser. 2013. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **14**:282-293.
128. Taubenberger, J. K., and D. M. Morens. 2006. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging infectious diseases* **12**:15-22.
129. Tellier, R. 2009. Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **6 Suppl 6**:S783-790.
130. Thompson, W. W., D. K. Shay, E. Weintraub, L. Brammer, N. Cox, L. J. Anderson, and K. Fukuda. 2003. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **289**:179-186.
131. Tripp, R. A., L. P. Jones, L. M. Haynes, H. Zheng, P. M. Murphy, and L. J. Anderson. 2001. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nature immunology* **2**:732-738.
132. Tyrrell, D. A., and R. M. Chanock. 1963. Rhinoviruses: a description. *Science (New York, N.Y.)* **141**:152-153.
133. van den Hoogen, B. G., J. C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus. 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature medicine* **7**:719-724.

134. **van den Hoogen, B. G., D. M. Osterhaus, and R. A. Fouchier.** 2004. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *The Pediatric infectious disease journal* **23**:S25-32.
135. **van der Hoek, L.** 2007. Human coronaviruses: what do they cause? *Antiviral therapy* **12**:651-658.
136. **van der Hoek, L., K. Pyrc, and B. Berkhout.** 2006. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS microbiology reviews* **30**:760-773.
137. **van der Hoek, L., K. Pyrc, M. F. Jebbink, W. Vermeulen-Oost, R. J. Berkhout, K. C. Wolthers, P. M. Wertheim-van Dillen, J. Kaandorp, J. Spaargaren, and B. Berkhout.** 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nature medicine* **10**:368-373.
138. **van Elden, L. J., A. M. van Loon, F. van Alphen, K. A. Hendriksen, A. I. Hoepelman, M. G. van Kraaij, J. J. Oosterheert, P. Schipper, R. Schuurman, and M. Nijhuis.** 2004. Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases* **189**:652-657.
139. **Videira, A.** 2001. Engenharia genética - Princípios e aplicações.
140. **von Linstow, M. L., J. Eugen-Olsen, A. Koch, T. N. Winther, H. Westh, and B. Hogh.** 2006. Excretion patterns of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus among young children. *European journal of medical research* **11**:329-335.
141. **Wanda F. Canas Ferreira, J. C. F. d. S.** 2002. *Microbiologia*, vol. 3.
142. **Williams, B. G., E. Gouws, C. Boschi-Pinto, J. Bryce, and C. Dye.** 2002. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *The Lancet infectious diseases* **2**:25-32.
143. **Williams, J. V., P. A. Harris, S. J. Tollefson, L. L. Halburnt-Rush, J. M. Pingsterhaus, K. M. Edwards, P. F. Wright, and J. E. Crowe, Jr.** 2004. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *The New England journal of medicine* **350**:443-450.
144. **Winther, B., J. M. Gwaltney, Jr., N. Mygind, R. B. Turner, and J. O. Hendley.** 1986. Sites of rhinovirus recovery after point inoculation of the upper airway. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **256**:1763-1767.
145. **Wisdom, A., E. C. Leitch, E. Gaunt, H. Harvala, and P. Simmonds.** 2009. Screening respiratory samples for detection of human rhinoviruses (HRVs) and enteroviruses: comprehensive VP4-VP2 typing reveals high incidence and genetic diversity of HRV species C. *Journal of clinical microbiology* **47**:3958-3967.
146. **Wong, C. M., L. Yang, K. P. Chan, G. M. Leung, K. H. Chan, Y. Guan, T. H. Lam, A. J. Hedley, and J. S. Peiris.** 2006. Influenza-associated hospitalization in a subtropical city. *PLoS medicine* **3**:e121.
147. **Woo, P. C., S. K. Lau, C. M. Chu, K. H. Chan, H. W. Tsoi, Y. Huang, B. H. Wong, R. W. Poon, J. J. Cai, W. K. Luk, L. L. Poon, S. S. Wong, Y. Guan, J. S. Peiris, and K. Y. Yuen.** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of virology* **79**:884-895.
148. **Woo, P. C., K. Y. Yuen, and S. K. Lau.** 2012. Epidemiology of coronavirus-associated respiratory tract infections and the role of rapid diagnostic tests: a prospective study. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi / Hong Kong Academy of Medicine* **18 Suppl 2**:22-24.
149. **Xiang, Z., R. Gonzalez, Z. Wang, Y. Xiao, L. Chen, T. Li, G. Vernet, G. Paranhos-Baccala, Q. Jin, and J. Wang.** 2010. Human rhinoviruses in Chinese adults with acute respiratory tract infection. *The Journal of infection* **61**:289-298.
150. **Xiang, Z., R. Gonzalez, Z. Xie, Y. Xiao, J. Liu, L. Chen, C. Liu, J. Zhang, L. Ren, G. Vernet, G. Paranhos-Baccala, K. Shen, Q. Jin, and J. Wang.** 2010. Human

- rhinovirus C infections mirror those of human rhinovirus A in children with community-acquired pneumonia. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **49**:94-99.
151. **Xie, Y., J. Gong, M. Li, H. Fang, and W. Xu.** 2011. The medicinal potential of influenza virus surface proteins: hemagglutinin and neuraminidase. *Current medicinal chemistry* **18**:1050-1066.
152. **Zangwill, K. M., and R. B. Belshe.** 2004. Safety and efficacy of trivalent inactivated influenza vaccine in young children: a summary for the new era of routine vaccination. *The Pediatric infectious disease journal* **23**:189-197.

7-Anexos

ANEXO I

Painel 1 -H1 (N1) 2009 , Influenza A, Influenza B e Controlo Interno MS2

Reagentes para 1 reação	Volume (µl)	Nº Amostras+2
2 x RT buffer (Invitrogen)	12,5	
H1 Sw For (20pmol/ul) 5'- TCA ACA GAC ACT GTA GAC ACA GTA CT -3'	0,5	
H1 Sw Rev (20pmol/ul) 5'- GTT TCC CGT TAT GCT TGT CTT CTA G -3'	0,5	
H1 Sw Probe (10 pmol/ul) 5'- FAM- ACA GAG TGT GTY ACT GT- MGBNFQ -3'	0,3	
AM-F (20pmol/ul) 5'-GAG TCT TCT AAC MGA GGT CGA AAC GTA-3'	0,5	
AM-R (20pmol/ul) 5'-GGG CAC GGT GAG CGT RAA-3'	1,0	
AM Probe (10pmol/ul) 5' VIC-TCC TGT CAC CTC TGA C-MGBNFQ-3'	0,4	
BNP-F (20pmol/ul) 5'- GCA GCT CTG ATG TCC ATC AAG CT-3'	0,16	
BNP-R (20pmol/ul) 5'- CAG CTT GCT TGC TTA RAG CAA TAG GTC T-3'	0,16	
BNP Probe (3,3pmol/ul) 5'-Cy5-CCA GAT CTG GTC ATT GGR GCC CAR AAC TG-BHQ3 -3'	0,2	
MS2 F1 (20 pmol/ul) 5'-TGG CAC TAC CCC TCT CCG TAT TCA CG- 3'	0,1	
MS2 R1 (20 pmol/ul) 5'- GTA CGG GCG ACC CCA CGA TGA C- 3'	0,1	
MS2 Taq (10 pmol/ul) 5' Rox- CAC ATC GAT AGA TCA AGG TGC CTA CAA GC-BHQ2 3'	0,2	
Superscript III Platinum One-step qRT-PCR Enzyme (Invitrogen)	0,8	
RNase Free Water	2,58	
Total Volume	20,0	

ANEXO II**Painel 2- VSR, Vírus Parainfluenza (PIV 1 e 3) e Adenovirus**

Reagentes para 1 reação	Volume (µl)	Nº amostras +2
2x RT Buffer	12.5	
Mg So4 (50mM)	1.5	
RSV For (20 pmol/µl) 5'-GGG WGG WGA AGC WGG ATT CTA CC- 3'	0.5	
RSV Rev (20 pmol/µl) 5'-ACC TCT RTA CTC TCC CAT TAT GCC TAG- 3'	0.5	
RSV Probe (10 pmol/µl) 5'- FAM- TAG GCA ATG CWG C- MGB -3'	0.2	
NP1 For (20 pmol/µl) 5'-GCYCCTTTYATATGTATACTCAGAGACCCA-3'	0.5	
NP1 Rev (20 pmol/µl) 5'-TGTTCTTCCAGTTACATAYTGTTGCATAGC-3'	0.5	
NP3 For (20 pmol/µl) 5'-GCTCCTTTYATCTGTATCCTCAGAGATCC-3'	0.5	
NP3 Rev (20 pmol/µl) 5'-TGATCTTCCCGTCACATACTGTTGCATG-3'	0.5	
NP13 Probe (10 pmol/µl) 5'Joe-TGGAGYTAYGCAATGGG-MGB-3'	0.2	
Ad For (20 pmol/µl) 5'-GCC CCA RTG GKC NTA CAT GCA CAT C-3'	0.16	
Ad Rev (20 pmol/µl) 5'- GCC ACX GTG GGR TTY CTR AAC TT-3' /X=Inosin	0.16	
Ad Probe (10 pmol/µl) 5'-CY5- TGC ACC AGA CCC GGR CTC AGR TAC TCC GA- BHQ3-3'	0.1	
RT Enzyme	0.8	
Rnase Free Water	1.38	
Total Volume	20.0	

ANEXO III**Painel 3- Enterovirus, Rinovirus, Metapneumovirus e Parainfluenza (2 e 4)**

Reagentes para 1 reação	Volume (µl)	Nº amostras +2
2x RT Buffer	12.5	
Mg So4 (50mM)	1.0	
Ent / Rhino For (20 pmol/µl) 5'- CGG CCC CTG AAT GYG GCT AA - 3'	0.5	
Ent / Rhino Rev (20 pmol/µl) 5'- GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA- 3'	0.5	
Rhino Probe (10 pmol/µl) 5'- JOE-TCY GGG AYG GGA CCR ACT A- MGB -3'	0.3	
Entero Probe (10 pmol/µl) 5' FAM -TCT GYR GCG GAA CCG ACT - MGB-3'	0.3	
hMPV For (20 pmol/µl) 5'- CAT CAG GTA AYA TCC CAC AAA AYC AG- 3'	0.5	
hMPV Rev (20 pmol/µl) 5'-GTG AAT ATT AAR GCA CCT ACA CAT AAT AAR A- 3'	0.5	
hMPV Probe (10 pmol/µl) 5' CY5 –CCY TCA GCA CCA GAC ACA CC- BHQ3 -3'	0.3	
NP2 for (20 pmol/µl) 5'-AAGTGYATGACTGCTCCTGATCARCC-3'	0.25	
NP2 rev (20 pmol/µl) 5'-TTGCCAATRTCTCCCACCATRGCATA-3'	0.25	
NP4 for (20 pmol/µl) 5'-AAATGYATGACAGCTTATGATCAACCCA-3'	0.25	
NP4 rev (20 pmol/µl) 5'-TTTGCAATRTCTCCCACCATRGCATA-3'	0.25	

NP2 probe (10 pmol/μl) 5'ROX-TCAGAATGCCATCCGCAAGTCAATGG-BHQ2-3	0.1	
NP4 probe (10 pmol/μl) 5'ROX-CAGCTGATAARGTAGGTGCTTATACTAACAG-BHQ2-3	0.1	
RT Enzyme	0.8	
Rnase Free Water	1.6	
Total Volume	20,0	

ANEXO IV**Painel 4 - Coronavirus Gp1 e Gp2**

Reagentes para 1 reação	Volume (µl)	Nº amostras +2
2x RT Buffer	12.5	
Mg So4 (50mM)	1.5	
Cor For (20 pmol/µl) ATG GGT TGG GAY TAT CCI AAR TGT GA	0.5	
Cor R1 (20 pmol/µl) GCA GTA GTT GCA TCA CCA CTR CTA GT	0.5	
Cor R2 (20 pmol/µl) GCT GTA CTA GCR TCA CCA GAA GT	0.5	
Cor R3 (20 pmol/µl) GCT GTA GTT GCR(A) TCA CCA GAA GT	0.5	
Cor R4 (20 pmol/µl) AGC AGT TGT AGC ATC ACC GGA TGA T	0.5	
GP1 Probe (10 pmol/µl) 5'- FAM- TTR GGY TCT AAG CAT GTY A - MGB -3'	0.2	
Gp2 Probe (10 pmol/µl) 5'VIC- CTT GCG AAT GAA TGY GC -MGB-3'	0.2	
RT Enzyme	0.8	
RNase Free Water	2.3	
Total Volume	20.0	

ADENDA 1

2.3. Material e Métodos

Para a pesquisa do bocavirus utilizou-se a técnica de PCR *multiplex* em tempo real descrita seguidamente:

Painel 5 – Bocavirus

Reagentes	Volume por reação (µl)
Água de grau molecular	6,2
Primers / Probes (P5)* (Ver sequência primers e probes em anexo 5)	3.1
Enzima SuperScript III RT-PCR	0.8
Total	20.0

Tabela 5 – Painel 5 da Técnica de PCR em tempo real

ANEXO V

Painel 5 - Bocavirus

Reagentes para 1 reação	Volume (µl)	Nº amostras +2
Enzima SuperScript III RT-PCR	12,5	
Boca For (20 pmol/µl) 5` - CAC KCC CAG GAA RTG ACG TAT - 3´	0.5	
Boca Reverse (20 pmol/µl) 5` - CCA GAG ATG TTC ACT CGC CGG A- 3´	0.5	
Boca Probe (10 pmol/µl) 5` - FAM - TCA GAC TGC ATC CGG TCT - MGB-3`	0.3	
RNase Free Water	6,2	
Total Volume	20.0	