



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE F DOS
METAPNEUMOVIRUS HUMANOS DETECTADOS A PARTIR DE CASOS DE
INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA NA REGIÃO NORTE DO BRASIL**

LUÍS EDILSON DE AZEVEDO FERREIRA

**Belém – Pará
2012**

LUÍS EDILSON DE AZEVEDO FERREIRA

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE F DOS
METAPNEUMOVIRUS HUMANOS DETECTADOS A PARTIR DE CASOS DE
INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA NA REGIÃO NORTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa

Co-Orientador: Dr. Wyller Alencar de Mello

**Belém – Pará
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

LUÍS EDILSON DE AZEVEDO FERREIRA

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE F DOS
METAPNEUMOVIRUS HUMANOS DETECTADOS A PARTIR DE CASOS DE
INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA NA REGIÃO NORTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA

Aprovado em: ___/___/___

Conceito:

Banca Examinadora

Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa
Orientadora – NMT/UFPA

Dr. Rodrigo Vellasco Duarte Silvestre
Membro – IEC/SVS/MS

Dr. Tulio Machado Fumian
Membro – IEC/SVS/MS

Dra Ana Cecília Ribeiro Cruz
Membro – IEC/SVS/MS

Dra. Luisa Caricio Martins
Suplente – NMT/UFPA

**Dados Internacionais de Catalogação -na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Ferreira, Luís Edilson de Azevedo Ferreira.

Análise epidemiológica e caracterização parcial do gene F dos *Metapneumovirus Humano* detectados a partir de casos de infecção respiratória aguda na Região Norte do Brasil / Luís Edilson de Azevedo ferreira; orientadora, Rita Catarina Medeiros Sousa, co-orientador, Wyller Alencar de Mello – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Metapneumovirus Humano. 2. IRA. 3. Epidemiologia Molecular. 4. Brasil. I. Sousa, Rita Catarina Medeiros, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.91

Dedico este trabalho aos meus pais, que me ensinaram o valor e a importância dos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por ter me dado o dom da vida e a oportunidade de ter bons familiares e amigos que me ajudaram consideravelmente em toda essa caminhada.

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa de sua diretora Dr^a Elisabeth C. de Oliveira Santos.

A seção de Virologia do IEC, representada pelo seu chefe Dr. Alexandre da Costa Linhares.

À FAPESPA por fomentar e acreditar neste projeto.

Aos meus familiares que sempre acreditaram em mim e me impulsionaram em busca do saber, o meu muito obrigado.

À Dr^a. Rita Medeiros por sua orientação, companheirismo e compreensão. Obrigado por tudo, cada dia conviver foi um aprendizado diferente, sua competência me estimulou a buscar cada vez mais e ir sempre à busca dos meus objetivos. Espero que nossa “parceria” perdure por muitos anos.

Ao Dr. Wyller Mello, por me acolher em seu laboratório, me co-orientar neste trabalho, por toda sua dedicação e atenção.

À amiga, conselheira e também orientadora Milla, muito obrigado por tudo, desde que eu entrei no LVR você tem sido muito especial pra mim, sempre me incentivou, e me instigou a buscar sempre mais. Sou grato pela sua amizade, carinho, e companheirismo.

À amiga Edna Acunã, que nos proporcionou bons risos no *Lab*, um grande beijo.

Ao amigo Edivaldo por sua amizade e pela ajuda na reta final deste trabalho, sua contribuição foi de fundamental importância para o término deste projeto.

Ao amigo Tulio Fumian, pelo seu companheirismo e ajuda na reta final deste trabalho.

Às amigas de Laboratório Luana e Jessy, obrigado pela excelente companhia em todos estes anos, sempre me espelhei em seus bons exemplos de profissionais e pessoas.

Aos *Brothers* Akim e Pacheco foram muitos bons momentos de amizade. Com cada um de vocês aprendi como ser um profissional melhor e uma pessoa ereta. Sou grato por tudo, pelas advertências, pelos risos e pelo companheirismo. Vocês são um exemplo pra mim, cada um com sua caminhada me ensinou o sentido da amizade, espero que continuemos juntos, trabalhando e crescendo juntos.

Ao amigo Kaio, que sempre esteve comigo. Podemos não ser irmãos de mesmo pai, porém você é um dos irmãos que a vida nos dá. Agradeço-lhe por tudo, caminhamos juntos desde a graduação, um ajudando o outro, me erguendo quando eu caia e comemorando quando vencia. Muitas coisas aprendi com você, e por isso sou grato. Que nossa amizade e parceria, fazendo ciência perdurem por muitos anos. Abraços.

Ao amigo James, que não mediu esforços para a conclusão deste projeto. Obrigado por me ajudar e me acompanhar em horas intermináveis de PCRs e sequenciamentos. Durante este tempo você demonstrou ser um amigo/irmão, me apoiou nos momentos mais difíceis que passei, sempre esteve ao meu lado pra me reerguer e mostrar que eu tinha potencial mesmo quando eu cambaleava. Sei que será só o início de uma grande amizade. A você o meu muito obrigado!

Por fim quero agradecer a uma das pessoas mais importantes em minha vida, e quando eu digo isso não estou sendo exagerado. Ela chegou na minha vida de “mansinho” com aquele jeito de menina-mulher, com aquele olhar literalmente pequeno porém muito cativante, e com seu jeito me conquistou por completo. Sem dúvidas foram os melhores anos até agora vividos, não tenho palavras pra descrever

tudo que aprendi e vivi ao lado dela. Uma pessoa de uma índole incomparável e de efusivo carinho fez o meu cotidiano ser mais colorido e gostoso de viver. Você que me apoiou em todos os momentos, sempre acreditou em mim, você acreditou até mesmo quando eu não acreditava e assim me mostrou que eu era capaz. Sempre serei eternamente grato a você, sempre estarei torcendo e te apoiando em todas as suas escolhas, sempre acreditei na força de nossa amizade, sempre fui apaixonado por você. Hoje traçamos caminhos paralelos, e o que fica de aprendizado são todos os momentos que convivemos e que eu pude aprender como ser mais homem e autoconfiante. Guardarei em meu coração as melhores lembranças de tudo o que vivemos e todos os sorrisos, que hoje fazem falta, mas ainda sim são doces pelo simples fato de um dia terem existido. Mesmo depois de tanto tempo tenho a convicção de poder falar *Anata wo Aishiteru Sayaka!*

Muito Obrigado!

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê

Arthur Schopenhauer

RESUMO

As doenças do trato respiratório são as principais queixas nos serviços de atendimento médico, sendo as infecções respiratórias agudas (IRA) as manifestações mais comuns, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade. Em países em desenvolvimento, as IRA constituem um sério problema de saúde pública. Em todo mundo estima-se que ocorram cerca de 2 milhões de mortes devido as IRA a cada ano. Dentre os agentes causais de IRA, destaca-se o *Metapneumovírus Humano* (HMPV), especialmente por causar doença grave em crianças menores de 5 anos. Com o objetivo de gerar dados sobre a epidemiologia molecular deste vírus, foram analisadas amostras colhidas de pacientes com IRA no período de Janeiro de 2009 a Dezembro de 2011 oriundas da Região Norte (Pará, Amazonas, Acre, Amapá e Roraima). Foi utilizado a técnica de RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR) para a detecção do vírus através da amplificação do gene N e RT-PCR para o gene codificador da proteína F, que foi em seguida parcialmente sequenciado. Dentro do período de estudo, foram testadas 2966 amostras, das quais 129 positivas para HMPV. A faixa etária de 0-4 anos foi a que concentrou maior número de casos (n=84; 65,89%) em toda a região Norte. Na identificação viral, constatou-se a co-circulação dos subgrupos A2 e B2 durante os três anos do estudo. Os subgrupos A1 e B1 não circularam na região durante o período estudado. Este estudo representa o primeiro relato sobre dados da epidemiologia molecular do *Metapneumovírus Humano* na região Norte do Brasil.

Palavras-chave: *Metapneumovírus Humano*, IRA, epidemiologia molecular.

ABSTRACT

Diseases of the respiratory tract are the main complaints in health care services, and acute respiratory infections (ARI) the most common manifestations, especially in children under five years of age. In developing countries the ARI are a serious public health problem. Throughout the world is estimated to occur in approximately 2 million deaths each year by ARI. Among the causative agents of ARI, we highlight the human metapneumovirus (HMPV), especially by causing severe illness in children under 5 years. Aiming to generate data on the molecular epidemiology of this virus, we analyzed samples taken from patients with ARI in the period January 2009 to December 2011 arising from the Northern Region (Pará, Amazonas, Acre, Amapá and Roraima). It was used the technique of real time PCR (qRT-PCR) to detect the virus by the N gene and RT-PCR for the gene encoding the F protein, which was then partially sequenced. Within the study period, were tested in 2966 samples, 129 of which were positive for HMPV. The age group of 0-4 years was the one that focused more cases (n = 84, 65.89%) across the North. The identification of viruses was found to co-circulation of subgroups A2 and B2 during the three years of the study. Subgroups A1 and B1 not circulated in the region during the study period. This study represents the first report of data on molecular epidemiology of Human Metapneumovirus in northern Brazil.

Key Words: Human Metapneumovirus, ARI, Molecular Epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Classificação taxonômica dos principais vírus respiratórios causadores de IRA em humanos.

Figura 2: Representação esquemática do mapa genômico de HMPV e do VRS, mostrando a diferença na ordem dos genes. O genoma do VRS codifica duas proteínas não estruturais NS1 e NS2, que não estão no genoma do HMPV. O gene M2 de ambos os vírus carregam duas ORF's (M2-1 e M2-2).

Figura 3: Representação esquemática da partícula viral do HMPV mostrando as principais estruturas e proteínas virais.

Figura 4: Figura esquemática dos segmentos gênicos com os seus referidos números de nucleotídeos e os números de aminoácidos que irão formar as proteínas virais. Valores numéricos baseados na cepa CAN 97-83, 13,335 nt.

Figura 5: Representação esquemática mostrando as principais etapas do ciclo replicativo do *Metapneumovirus humano*; entrada do vírus na célula, replicação e transcrição viral

Figura 6: Figura esquemática mostrando a coleta por *Swab* combinado (Nasal e Oral) e por aspirado Nasofaringe – ANF.

Figura 7: Detecção do RNA do HMPV por qRT-PCR.

Figura 8: Distribuição anual dos casos positivos de infecção pelo HMPV, durante os anos de 2009, 2010 e 2011 na região norte do Brasil.

Figura 9: Árvore Filogenética construída a partir da sequência parcial do gene codificador da proteína F do HMPV. A árvore foi gerada pelo método de neighbor-joining,(NJ) utilizando o programa MEGA v. 5.0 e parâmetro Kimura 2. Foram incluídos na análise os nucleotídeos 3069 a 3844 do gene F. Valores de Bootstrap iguais a (X2000).

Figura 10: O alinhamento aminoacídico foi realizado com o auxílio do software Bioedit Version 7.1.1 mostrando as diferenças encontradas nas sequências parciais do gene F do subtipo A2 e B2 do HMPV.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Descrição das principais funções biológicas de cada proteína do HMPV.

Quadro 2: : Oligonucleotídeos e sonda utilizados no qRT-PCR.

Quadro 3: Condições para amplificação do gene N de HMPV pela técnica do qRT-PCR.

Quadro 4: : Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR e reamplificação da PCR.

Quadro 5: Número de habitantes dos estados da região Norte, com suas respectivas populações acometidas e os impactos do HMPV na mesma.

Quadro 6: Descrição sucinta da incidência de HMPV por estados da região Norte.

Quadro 7: Distribuição dos subtipos de HMPV por ano, cepa e estado.

Tabela 1: Distribuição por faixa etária de amostras positivas para HMPV nos estados da região norte do Brasil, entre os anos de 2009 a 2011.

Tabela 2: Variabilidade nucleotídica entre as amostras sequenciadas em relação as cepas protótipos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
AdV	Adenovirus
ANF	Aspirado Nasofaríngeo
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisas
dDNTP	Didesoxirribonucleotídeos
Flu	Influenza
GAG	Glicosaminoglicano
HBoV	Bocavirus Humano
HMPV	Metapneumovirus Humano
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	Imunofluorescência Indireta
IRA	Infecção Respiratória Aguda
Kb	Kilobases
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LLC-MK2	Linhagem de células oriundas de rins de macacos <i>Rhesus</i> adultos
LVR	Laboratório de Vírus Respiratório
MS	Ministério da Saúde
ng	Nanogramas
nt	Nucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde

ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	Solução Salina Tamponada
PIN-ER-t	Teste de Impacto Populacional
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAc	RNA Complementar
RNAm	RNA mensageiro
RNAv	RNA viral
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa
qRT-PCR	Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa em Tempo Real
SC	<i>Swab</i> Combinado
SIVEP-GRIPE	Sistema Nacional de Vigilância da Gripe
TA	Temperatura Ambiente
tMK	<i>tertiary Monkey kidney</i>
UEPA	Universidade do Estado do Pará
UFPA	Universidade Federal do Pará
VRS	Vírus Respiratório Sincicial

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	JUSTIFICATIVA	19
3.	OBJETIVOS	20
3.1.	OBJETIVO GERAL	20
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4.	REFERENCIAL TEÓRICO	21
4.1.	METAPNEUMOVIRUS HUMANO	21
4.2.	A DESCOBERTA DO METAPNEUMOVIRUS HUMANO	21
4.3.	CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA VIRAL	22
4.4.	GENOMA VIRAL	25
4.5.	PROTEÍNAS VIRAIS	27
4.6.	CICLO REPLICATIVO	30
4.6.1.	Entrada do vírus nas células	30
4.6.2.	Transcrição e Replicação viral	30
4.7.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	32
4.8.	EPIDEMIOLOGIA	33
4.9.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	35
5.	METODOLOGIA	36
5.1.	MATERIAL	36
5.1.1.	Tipo de Estudo	36
5.1.2.	População de Estudo	36
5.1.3.	Amostras	37
5.1.4.	Critérios de Inclusão	37
5.1.5.	Critério de Exclusão	37
5.2.	MÉTODOS	38
5.2.1.	Colheita de espécimes clínicos	38
5.2.2.	Processamento das amostras	40
5.2.3.	Detecção e caracterização genética do HMPV	40
5.2.3.1.	Extração do RNA viral	40
5.2.3.2.	Detecção do RNA viral via Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa em Tempo Real (qRT-PCR)	41
5.2.3.3.	Amplificação do gene F por RT-PCR	43
5.2.3.4.	Eletroforese em gel de agarose	43
5.2.3.5.	Purificação e quantificação dos produtos da RT-PCR	44
5.2.3.6.	Reação de sequenciamento	44
5.2.3.7.	Purificação do produto da reação de sequenciamento	45
5.2.3.8.	Eletroforese em sequenciador automático	45
5.2.3.9.	Análise das sequências	45
5.3.	ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	46
6.	RESULTADOS	47
7.	DISCUSSÃO	57
8.	CONCLUSÕES	62
9.	ANEXOS	63
ANEXO A	ANEXO A	63
ANEXO B	ANEXO B	64
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas do trato respiratório estão entre as mais frequentes causadoras de hospitalizações e procura dos serviços médico-ambulatoriais em todo o mundo, sendo as infecções respiratórias agudas (IRA) as maiores causadoras de morbidade e mortalidade em todas as idades, porém com um foco principal em crianças menores de cinco anos de idade, idosos e imunocomprometidos (GARENNE et al., 1992; CAMPBELL, 1995; DUARTE et al., 2000).

Em pacientes menores de cinco anos de idade acometidos por IRA, observa-se que os sintomas mais comuns são coriza, tosse, obstrução nasal, febre, podendo evoluir para casos graves como bronquiolite severa, exacerbação asmática e pneumonias tanto de etiologia viral como bacteriana. Diversos estudos associam esses quadros graves à imaturidade do sistema imunológico de crianças (BOIVIN et al., 2003; SEMPLE et al., 2005; KAHN, 2006; DULEK & PEEBLES Jr, 2011).

Em crianças, as doenças do trato respiratório são a segunda maior causa de morte independente da área geográfica (KAHN, 2006).

As IRA em pacientes idosos e em imunocomprometidos estão relacionadas à depleção do sistema imunológico. Os quadros clínicos não são muito diferentes dos vistos em crianças, porém nestes grupos observam-se frequentes neutropenias, infiltrados pulmonares, exacerbação de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e pneumonia atípica, sendo os vírus, muitas vezes, determinantes para a morbidade destes indivíduos (BOIVIN et al., 2003; PELLETIER et al., 2002; FALSEY et al., 2003; 2006; HAMELIN et al., 2005; EVASHUK et al., 2008; KAMBOJ et al., 2008; WALSH et al., 2008; MULLER et al., 2009; OMURA et al., 2011).

Nos países desenvolvidos, assim como nos países em desenvolvimento, a morbidade da IRA é bastante divergente. A mortalidade, entretanto, é claramente

superior nos países em desenvolvimento, quando comparados aos países desenvolvidos, chegando a alcançar picos 30 vezes maiores (WHO 1984; DENNY & LODA, 1986; DUARTE et al., 2000).

O Brasil apresenta os mesmo agravos e índices de incidência de IRA que os demais países emergentes, onde vale ressaltar que fatores sociais como local de moradia (meio urbano ou rural), nível de escolaridade e densidade de moradores no domicílio têm contribuído para a morbimortalidade da IRA. Estima-se que em zona urbana, cada criança apresente de 5-8 casos de IRA/ano nos primeiros cinco anos de vida e em áreas rurais, de 1-4 episódios de IRA/ano (WALLIA et al., 1988; PAIVA, 1990; BERMAN, 1991; CHABRA et al., 1993; SUTMOLLER et al., 1995; DUARTE et al., 2000).

Estudos demonstram a ocorrência de diversos patógenos, e destacam o importante papel dos vírus como agentes causadores de tais infecções. Neste contexto investigações conduzidas por MELLO et al, 1986 iniciaram na região, o estudo sobre os possíveis vírus que estavam relacionados com quadros de doenças respiratórias agudas na região Amazônica. Dentre os agentes virais causadores de IRA, vale ressaltar a importância do Bocavírus Humano (HBoV), Influenza (Flu), Parainfluenzavírus tipos 1, 2 e 3, Adenovírus (AdV), Vírus Respiratório Sincicial (VRS) e Metapneumovírus humano (HMPV). Sendo estes dois últimos, os principais agentes virais associados aos casos de pneumonia e bronquiolite na infância (MOURA et al., 2003; CHUNG et al., 2006; HARA et al., 2008; CARNEIRO et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

As infecções respiratórias são uma das principais causas de hospitalizações em crianças menores de dois anos de idade, em idosos e em imunocomprometidos em todo o mundo e estão associadas a altas taxas de mortalidade entre estes indivíduos. Grande parte dessas infecções tem como agente etiológico os vírus.

Neste contexto, o HMPV vem sendo considerado um dos principais agentes virais causadores de IRA, contribuindo para elevação do número de hospitalizações e de mortes em diversos países. No Brasil, ainda são restritos os trabalhos publicados sobre o padrão de circulação deste agente, o que implica na realização de estudos que avaliem a ocorrência do HMPV em pacientes com IRA, contribuindo para um melhor conhecimento do perfil sazonal deste patógeno nos trópicos, bem como, gerando dados epidemiológicos úteis na elaboração de medidas preventivas e de controle desta virose. Em diversas regiões do Brasil tem-se relatado a circulação do HMPV, exceto na região Norte, onde ainda não há registro de estudos que descrevam a circulação deste vírus. Assim, este trabalho é pioneiro na descrição do HMPV na região Norte e tem como objetivo gerar dados sobre a epidemiologia molecular viral, que contribuirão para melhor conhecimento e vigilância da infecção pelo HMPV.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Detectar geneticamente, através de ferramentas moleculares, a ocorrência de HMPV associado a casos de IRA na região norte do Brasil no período de Janeiro de 2009 à Dezembro de 2011.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever através de técnicas de biologia molecular (PCR e Sequenciamento) os tipos de HMPV mais prevalentes na região norte do Brasil.
- Caracterizar, através do gene codificador da proteína viral F, a relação filogenética das cepas detectadas.
- Verificar uma possível distribuição sazonal e epidemiológica do HMPV

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. METAPNEUMOVIRUS HUMANO

4.2. A DESCOBERTA DO METAPNEUMOVIRUS HUMANO

O Metapneumovírus Humano foi primeiramente descrito por Van den Hoogen et al. em 2001 após a análise de espécimes clínicos oriundos de infantes e crianças holandesas com sintomatologia sugestiva de IRA (COLLINS & CROWE Jr., 2007; van den HOOGEN et al., 2001). Desde então, estudos comprovam que o HMPV é um vírus cosmopolita, sendo associado principalmente em casos de doenças do trato respiratório superior e inferior tais como faringite, laringite, bronquiolite e pneumonia severa, quadros estes semelhantes aos causados por infecções pelo vírus respiratório sincicial (BOIVIN et al., 2003; STOCKTON et al., 2002; BASTIEN et al., 2004; GALIANO et al., 2004; PERET et al., 2004; GRAY et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2009; ALI et al., 2010; GIOULA et al., 2010; KIM et al., 2010; MAZZONCINI Jr et al., 2010; DITT et al., 2011; DULEK & PEEBLES Jr., 2011).

4.3. CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA VIRAL

Nas subfamílias *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae* da família *Paramyxoviridae* encontram-se diversos vírus causadores de IRA em humanos (**Figura1**). A subfamília *Pneumovirinae* é taxonomicamente dividida em dois gêneros, o *Pneumovirus* que tem como maior representante o *Vírus Respiratório Sincicial* (VRS) e o *Metapneumovirus*, o qual se destaca o *Metapneumovirus Humano* (van den HOOGEN et al., 2001; 2004; GRAY et al., 2006; HUCK et al., 2006; COLLINS & CROWE Jr., 2007; CARNEIRO et al., 2009; DEBUR et al., 2010).

Ordem: *Mononegavirales*

Família: *Paramyxviridae*

Subfamília: *Paramyxovirinae*

Gênero: *Respirovirus*

Espécie: *Parainfluenza Humana 1 e 3*

Gênero: *Rubulavirus*

Espécie: *Parainfluenza Humana 2 e 4*

Subfamília: *Pneumovirinae*

Gênero: *Pneumovirus*

Espécie: *Vírus Respiratório Sincicial*

Subgrupo: A e B

Gênero: *Metapneumovirus*

Espécie: *Metapneumovirus Humano*

Subgrupo: A e B

Subtipos: A1, A2 e B1, B2

Figura 1: Classificação taxonômica dos principais vírus respiratórios causadores de IRA em humanos. Fonte: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

A classificação dos dois gêneros está baseada principalmente na sua composição genética; o gênero *Metapneumovirus* não possui as proteínas não-estruturais NS1 e NS2 e a ordem dos genes é diferente dos vírus, do gênero *Pneumovirus* (**Figura 2**) (van den HOOGEN et al., 2001; KAHN, 2006).

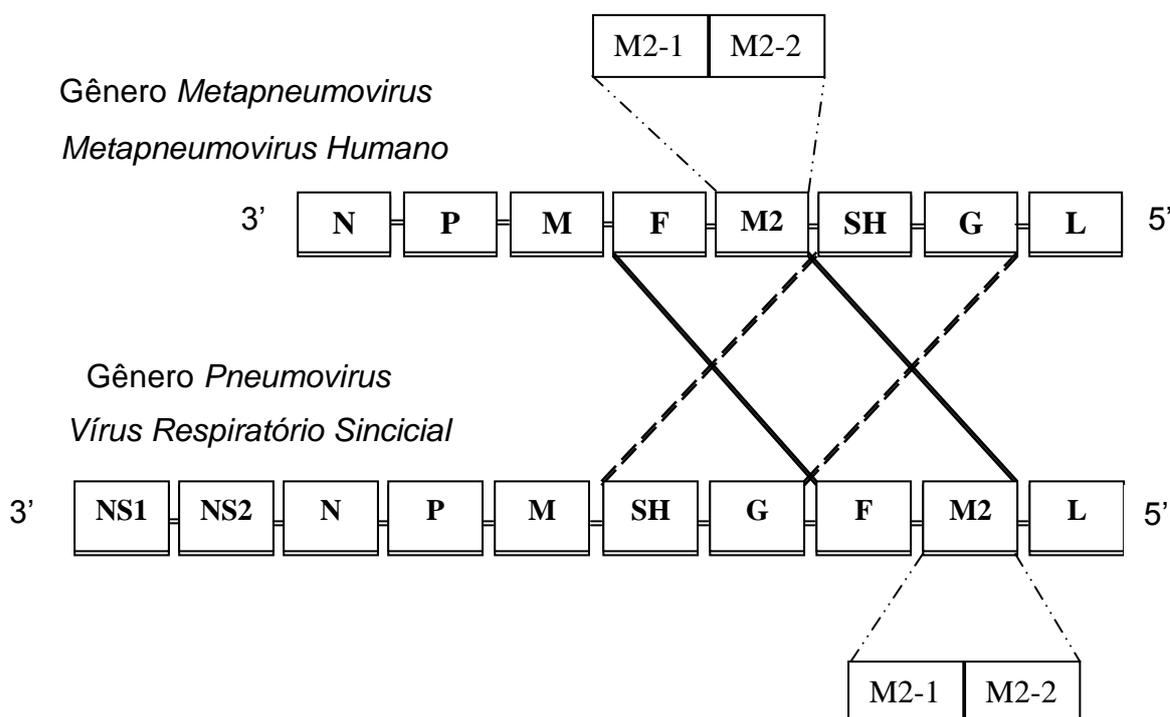


Figura 2: Representação esquemática do mapa genômico de HMPV e do VRS, mostrando a diferença na ordem dos genes. O genoma do VRS codifica duas proteínas não estruturais NS1 e NS2, que não estão no genoma do HMPV. O gene M2 de ambos os vírus carregam duas ORF's (M2-1 e M2-2). Fonte: Adaptado de Kahn, 2006, in *Epidemiology of Human Metapneumovirus*.

Baseado nas diferenças antigênicas das proteínas de superfície, o HMPV é classificado em dois subgrupos denominados A e B, que por sua vez são subdivididos em A1, A2 e B1 e B2, respectivamente (van den HOOGEN et al., 2001; DEBUR et al., 2010). Quando comparado com seu vírus ancestral, o Metapneumovirus Aviário, o HMPV apresenta uma homologia de 56% a 88% para as ORFs (*Open Reading Frame*) dos genes N, P, M, F, M2-1, M2-2 e L (van den HOOGEN et al., 2002; GRAAF et al., 2008).

Filogeneticamente, o HMPV está relacionado ao VRS, assim como as partículas virais quando visualizadas por microscopia eletrônica apresentam similaridades entre esses dois vírus (FREYMUTH et al., 2003; CUEVAS et al., 2003; KIM et al., 2010).

As partículas de HMPV são pleomórficas e quando em forma esférica possuem diâmetro de aproximadamente 150 nm. Apresentam-se envelopadas por dupla camada lipídica originada da membrana plasmática da célula hospedeira. Inseridas no envelope, verificam-se projeções (espículas) que medem de 13 a 17 nm, as quais representam as glicoproteínas virais transmembranares F, G e SH. Fazem parte da estrutura viral também as proteínas M, na face interna do envelope, e no interior do vírion estão inseridas as proteínas P, L e N que formam o complexo ribonucleoprotéico (van den HOOGEN et al., 2001; BIACCHESI et al., 2003). (**Figura 3**)

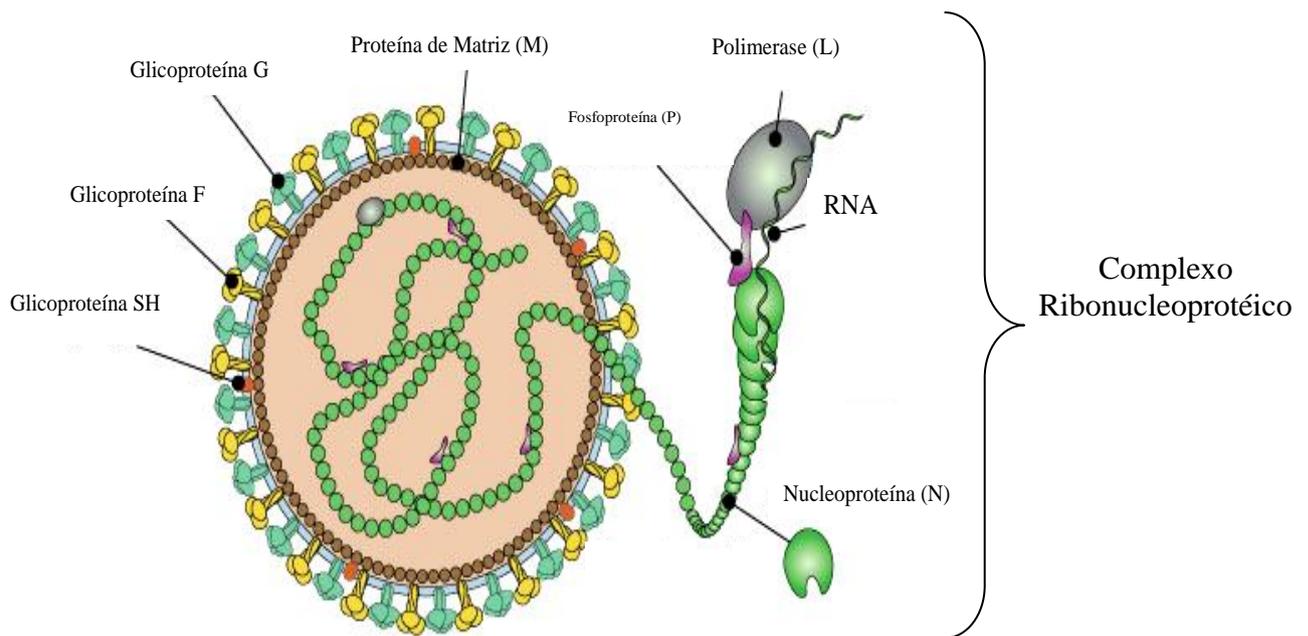


Figura 3: Representação esquemática da partícula viral do HMPV mostrando as principais estruturas e proteínas virais. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/01.048.2.htm>

4.4. GENOMA VIRAL

O genoma do HMPV é composto por ácido ribonucléico (RNA) de fita simples, não segmentada, de polaridade negativa, com tamanho aproximado de 13,3 Kb, que em associação com a proteína viral M forma o nucleocapsídeo. Os oito genes codificam nove proteínas e os RNA mensageiros formados a partir do RNA viral são poliadenilados (BIACCHESI et al., 2003; COLLINS & CROWE Jr., 2007).

Cada gene inicia sua região de leitura aberta (*Open Reading Frame – ORF*) com uma sequência altamente conservada, que serve de sinal para o início da transcrição. Essa conservação é ausente somente no gene L, que possui um sinal de início um pouco diferente. Por fim, ao final de cada gene encontra-se uma região com 12 -13 nucleotídeos que atuam como sinal de parada para a transcrição, esta

região é dita semiconservada. O tamanho médio dos genes codificantes e suas proteínas são mostrados na imagem abaixo (**Figura 4**).

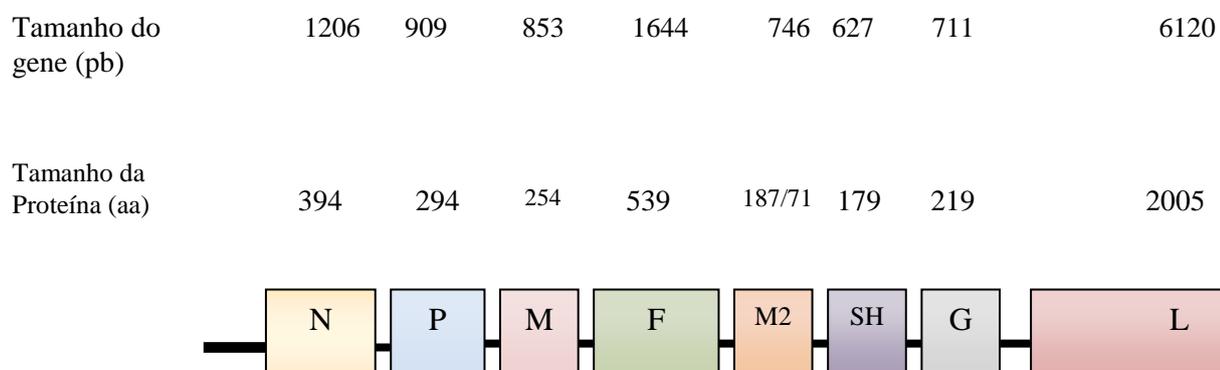


Figura 4: Figura esquemática dos segmentos gênicos com os seus referidos números de nucleotídeos e os números de aminoácidos que irão formar as proteínas virais. Valores numéricos baseados na cepa CAN 97-83, 13,335 nt. Fonte: Adaptado de Collins et al., 2010 *in Recombinant human metapneumovirus and its use*.

4.5. PROTEÍNAS VIRAIS

O HMPV possui três glicoproteínas (F, G e SH) do tipo transmembrana de superfície celular. A proteína F está envolvida no processo de penetração do vírus na célula hospedeira mediando a fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula hospedeira. Essa proteína é sintetizada como um precursor inativo (F₀) contendo somente um simples sítio de clivagem para tornar-se ativa (F₁). *In vivo*, a clivagem da proteína F depende da secreção de proteases presentes no lúmen do trato respiratório, fato este que é determinante para a restrição do vírus neste local e para o tropismo no hospedeiro. Estudo conduzido por Schowalter et al., (2009) mostrou que ao contrário do que se observa nas proteínas de fusão (F) de outros *Paramyxovirus*, a exposição ao pH ácido faz com que a proteína de fusão do HMPV promova o contato do envelope viral-célula proporcionando a entrada do vírus e aumentando a infectividade viral (COLLINS & CROWE Jr., 2007; GRAAF et al., 2009).

Semelhante a outros *Pneumovirus* a diversidade genética do gene que codifica a proteína G é observada também para o HMPV e, embora existam poucos trabalhos que relatem esta diversidade, considera-se que o gene G é o mais variável no HMPV. A proteína G também possui a função de ligação do vírus à célula, a forma secretada de G não está muito bem descrita na literatura, porém sabe-se que a adesão celular do HMPV é mediada por uma interação Glicosaminoglicano-proteína G (GAG-proteína G) (BAO et al., 2008; THAMMAWAT et al., 2008).

A proteína SH também participa da entrada da partícula viral na célula, formando junto com a F e G a tríade protéica responsável pela penetração do vírus na célula do hospedeiro (BASTIEN et al., 2004; COLLINS & CROWE Jr., 2007; BAO et al., 2008; THAMMAWAT et al., 2008).

A proteína de matriz (M), que se encontra na face interna do envelope viral, possui duas funções principais: restituir o nucleocapsídeo inativo após o empacotamento das nucleoproteínas e mediar associação do nucleocapsídeo com o envelope recém-formado (BASTIEN et al., 2003; COLLINS & CROWE Jr., 2007).

Quatro outras proteínas também participam da formação do nucleocapsídeo: A nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a subunidade da polimerase (L) e o fator de alongação de transcrição (M2-1), que anteriormente acreditava-se que seria uma segunda proteína de matriz. A proteína M2-2 tem função regulatória (BASTIEN et al., 2003; COLLINS & CROWE Jr., 2007). As principais propriedades de cada proteína estão simplificadas no **Quadro 1**.

PROTEÍNA	FUNÇÃO
F	Proteína transmembrana do envelope; medeia a fusão/penetração viral com as células do hospedeiro.
G	Proteína transmembrana do envelope; maior proteína acessória (fusão); não é essencial para a replicação viral; Frequentemente observam-se deleções em seu gene (nt).
SH	Proteína transmembrana do envelope; função ainda é discutida, porém acredita-se que auxilia na entrada do vírus nas células hospedeiras.
M2-1 (ORF1)	Medeia a associação do nucleocapsídeo com o envelope; é um fator de alongação essencial na transcrição.
M2-2 (ORF2)	Restitui o nucleocapsídeo; gerencia o número de RNA transcrito e traduzido.
N	Maior e mais abundante proteína do nucleocapsídeo.
P	Associa-se ao nucleocapsídeo; co-fator da polimerase (auxilia no processo replicação/transcrição do RNA viral).
L	Associa-se ao nucleocapsídeo; Principal componente do complexo polimerase viral.

Quadro 1: Descrição das principais funções biológicas de cada proteína do HMPV. Fonte: Bastien et al., 2003 *in* Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian *human metapneumovirus strains*.

4.6. CICLO REPLICATIVO

4.6.1. Entrada do vírus nas células

O ciclo replicativo do HMPV, não está totalmente elucidado, mas sabe-se que inicia quando ocorre a adsorção do vírus na superfície da célula, devido a ligação da proteína G aos glicosaminoglicanos (GAGs). A entrada do vírus se faz por meio da fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira, sendo esta etapa, mediada pela glicoproteína F. A partir disso, o nucleocapsídeo é liberado e todos os eventos do ciclo replicativo ocorrem no citoplasma da célula hospedeira (COLLINS & CROWE Jr., 2007; THAMMAWAT et al., 2008).

4.6.2. Transcrição e Replicação viral

A partir do RNA viral são transcritos RNA mensageiros, que servirão de molde para a tradução das proteínas virais, e também um RNA complementar (RNAc) a partir do qual será produzido o RNA viral (**Figura 5**).

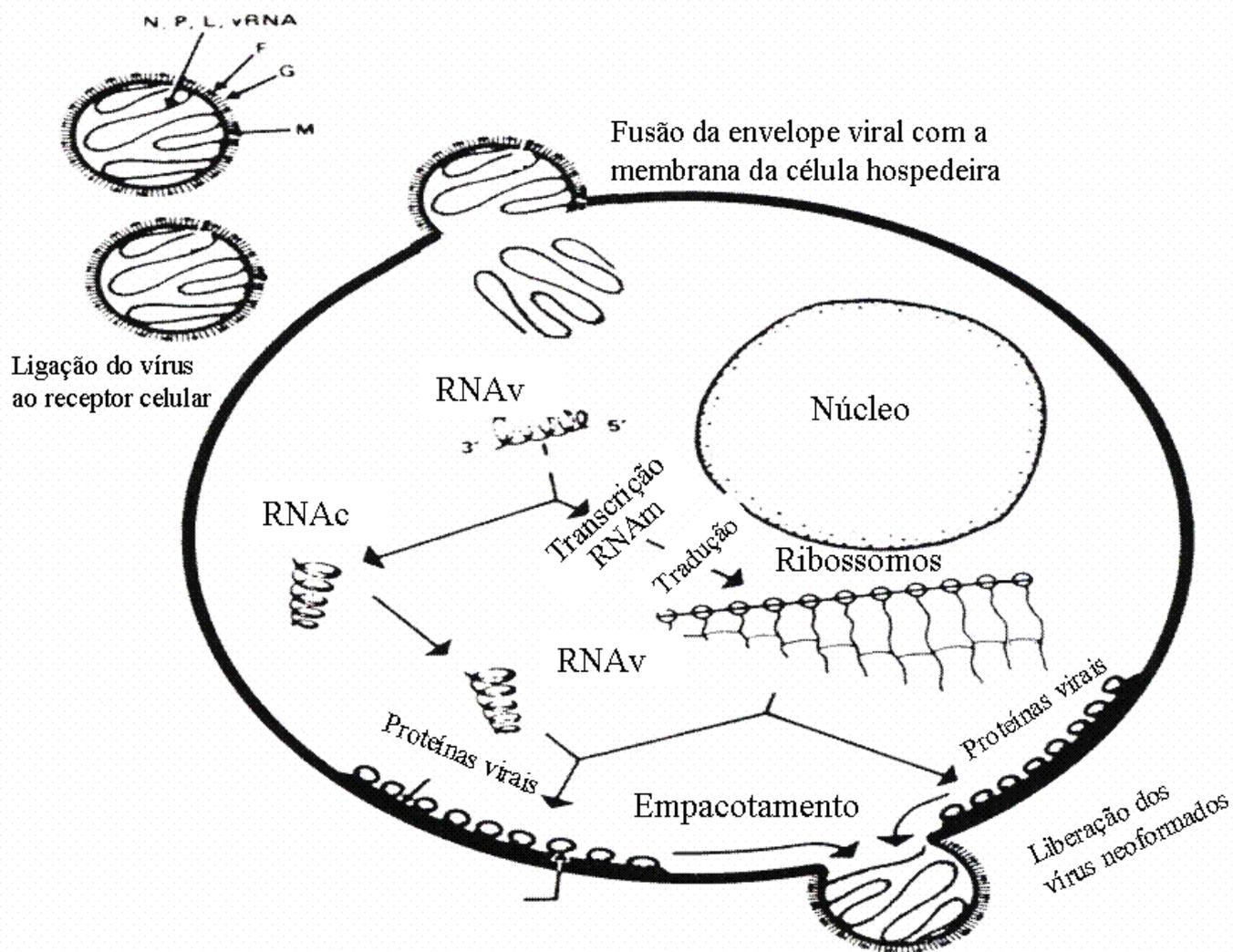


Figura 5: Representação esquemática mostrando as principais etapas do ciclo replicativo do *Metapneumovirus humano*; entrada do vírus na célula, replicação e transcrição viral. Fonte: (Adaptado de RUUSKANEN & OGRA, 1993 in *Currents Problems in Pediatrics*)

A cinética da replicação do HMPV se faz de maneira lenta, com um pico de expressão protéica intracelular ocorrendo por volta de 48 a 72 horas após a infecção (COLLINS & CROWE Jr., 2007).

4.7. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS

A transmissão de vírus respiratórios geralmente se faz pelo contato com indivíduos infectados que eliminam partículas virais durante a fala, tosse ou espirro. É comum também a veiculação da infecção através do contato direto com secreções infecciosas presente nas mãos contaminadas, mucosa nasal (auto-infecção) e em superfícies e objetos tais como bancadas, estetoscópios, teclados e *mouses* de computadores, maçanetas e vestuário (BOIVIN et al., 2002; COLLINS & CROWE Jr., 2007).

O período de incubação da doença varia de 2 a 6 dias após o contato inicial. E os sinais e sintomas apresentados são principalmente tosse, rinorréia e febre, sendo as complicações mais comumente apresentadas em crianças bronquiolite, pneumonia, bronquite, e exacerbação asmática (DUARTE, et al., 2000; VIAZOV et al., 2003; ESPER et al., 2003; FREYMOUTH et al., 2003; WILLIAMS et al., 2004; CHUNG et al., 2006; DULEK & PEEBLES Jr, 2011; OMURA, et al., 2011). Em adultos o HMPV ocasiona mais comumente doença moderada caracterizada por tosse, dor de garganta, rinorréia, rouquidão e obstrução nasal, sendo a febre pouco relatada (FALSEY et al., 2003; 2010; HAMELIN, et al., 2005; WALSH, et al., 2009).

O HMPV vem sendo apontado como um dos principais agentes virais associados a infecções do trato respiratório inferior em todo o mundo (van den HOOGEN et al., 2001; VIAZOV et al., 2003; FREYMOUTH et al., 2003; WILLIAMS et al., 2004; SEMPLE, et al., 2005; CHUNG et al., 2006; ARABPOUR et al, 2008; OMURA, et al., 2011). Estudos também relatam a ocorrência do HMPV como agente etiológico de infecções do trato respiratório superior (WILLIAMS et al., 2004; KAHN, 2006).

Assim como em infecções causadas por outros vírus respiratórios, o risco de complicações e hospitalizações devido à infecção por HMPV eleva-se entre pacientes menores de dois anos de idade e indivíduos considerados de alto risco tais como, pacientes com doenças cardíacas e pulmonares crônicas e imunodeprimidos (PELLETIER et al., 2002; BOIVIN et al., 2002; FALSEY et al., 2003; VICENTE et al., 2004; ROHDE et al., 2005; KAMBOJ, et al., 2008).

4.8. EPIDEMIOLOGIA

Desde o seu descobrimento na Holanda em 2001, a detecção de HMPV vem sendo relatada em diversos países, com taxas de incidência que variam de 2 a 54% (van den HOOGEN et al., 2001; VIAZOV et al., 2003; FREYMOUTH et al., 2003; ESPER et al., 2003; LUCHSINGER et al., 2005; GRAY et al., 2006; CHUNG et al., 2006; LOO et al., 2007; ARABPOUR et al., 2008; GIOULA, et al., 2010; LU, et al., 2011).

Na América do Sul investigações já foram conduzidas na Argentina, Chile Peru e Uruguai demonstrando a importância do HMPV como patógeno associado aos casos de infecção respiratória, principalmente em crianças (GALLIANO et al., 2004; MIRAZO et al., 2005; LUCHSINGER et al., 2005; GRAY et al., 2006; ESCOBAR, et al., 2009).

Os estudos feitos no Brasil envolveram crianças menores de cinco anos de idade nas regiões Nordeste e Sudeste onde as taxas de incidência foram de 17% e 11,4%, respectivamente (CUEVAS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009). Na região Nordeste o estudo foi conduzido em Sergipe e avaliou a ocorrência de HMPV em crianças com idade entre 1 e 30 meses, atendidas ambulatorialmente em unidades

de saúde e hospitais (CUEVAS et al., 2003). Em São Paulo (região Sudeste) a investigação envolveu crianças de até cinco anos de idade hospitalizadas (THOMAZELLI et al., 2007).

Estudos conduzidos por Debur et al., (2010), mostrou que na região sul há circulação dos quatro subtipos do HMPV (A1, A2 e B1, B2) acometendo adultos jovens, idosos e principalmente crianças menores de cinco anos de idade.

Nos diversos estudos conduzidos em todo o mundo o HMPV tem mostrado uma variação sazonal, com ocorrência de epidemias esporádicas. Em países de clima temperado a circulação de HMPV ocorre com picos de atividade nos meses de inverno. A maior atividade também tem sido vista na primavera em investigações conduzidas na Argentina, Chile e Coréia do Sul (GALIANO et al., 2004; LUCHSINGER et al., 2005; CHUNG et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

No Brasil a atividade do HMPV esteve associada a primavera na região Sudeste. E nas regiões Nordeste e Sul, semelhante ao que é visto para o VRS, o período de maior incidência coincidiu com o inverno nestas regiões (CUEVAS et al., 2003; THOMAZELLI et al., 2007; DEBUR, et al., 2010).

Até o momento não existem dados disponíveis na literatura sobre os padrões de circulação de HMPV na região Amazônica, porém investigações feitas em diversos Estados desta região demonstram a forte associação que há entre os casos de IRA e outros agentes virais como o *Vírus Respiratório Sincicial* (VRS) e *Bocavirus Humano* (HBoV) (MELLO et al., 1986; 1992; SANTOS et al, 2006; SILVA et al., 2009).

4.9. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico do HMPV é realizado por diversas técnicas como ensaios sorológicos, isolamento viral e detecção de antígenos ou ácidos nucleicos. Este vírus tem um melhor crescimento em células tMK ou LLC-MK2, porém, devido seu crescimento lento o processo de cultura em células é dispendioso e demanda muito tempo até o isolamento viral, além de necessitar de suplementação de tripsina para sua propagação (van den HOOGEN et al., 2001; MAHONY, J.B., 2008). Ebihara, et al, (2004) detectou por RT-PCR, 57 amostras positivas para HMPV de um total de 637 (8,9%) espécimes clínicos coletados por Aspirado Nasofaringe (ANF) e/ou Swab Combinado (SC), comparado com apenas 7 cepas isoladas em cultura de células a partir de 268 amostras (2,6%). Em um estudo conduzido na Itália foi avaliada a sensibilidade (73,9%), especificidade (94,1%) e valores preditivos positivos (94,4%) e negativos (72,7%) de um teste de Imunofluorescência Direta contra anticorpos de HMPV, tendo sido validado como um teste que pode ser usado para a detecção e diagnóstico rápido do referido vírus (PERCIVALLE et al., 2005; MAHONY, J.B., 2008).

Os testes moleculares são os mais sensíveis para a detecção de HMPV, com vários genes que servem de alvo para amplificação de seu material genético como os genes L, M, F e N, os mais utilizados para este fim. Alguns estudos mostraram que o gene G é o mais variável do genoma viral, o que restringe sua utilização para fins diagnósticos através da RT-PCR (LUDEWICK et al., 2005; AGRAWAL et al., 2011; GAUNT et al., 2011).

5. METODOLOGIA

5.1. MATERIAL

5.1.1. Tipo de Estudo

O estudo caracteriza-se como descritivo, parte retrospectivo, parte prospectivo, do tipo transversal.

5.1.2. População de Estudo

Foram eleitos para o estudo, todos os espécimes clínicos (secreções respiratórias – ANF e SC) provenientes de pacientes com sinais e sintomas de IRA proveniente dos estados do Pará, Amazonas, Amapá, Roraima, Rondônia e Acre na região Norte do Brasil, selecionados pelo Sistema Nacional de Vigilância da Gripe (SIVEP-GRIPE/MS), o qual o Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Evandro Chagas atua como Laboratório de referência.

5.1.3. Amostras

Foram utilizadas amostras de secreções respiratórias obtidas através de Aspirado Nasofaríngeo (ANF) ou *swab* Combinado Nasal/Oral (SC), os quais são rotineiramente colhidas de pacientes que apresentam quadro clínico de IRA com até cinco dias de evolução, atendidos em nível ambulatorial e hospitalar.

Foi realizado o teste de impacto populacional (PIN-ER-t) para saber a parcela da população acometida pelo HMPV durante o período estudado. O teste foi realizado utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

5.1.4. Critérios de Inclusão

Foram eleitas para o estudo todas as amostra clínicas provenientes de pacientes de ambos os sexos, e todas as idades com até cinco dias de doença, durante o período de Janeiro de 2009 à Dezembro de 2011, que tiveram resultado negativo por PCR ou RT-PCR para outros vírus respiratórios.

5.1.5. Critério de Exclusão

Amostras provenientes de pacientes com IRA com mais de cinco dias de evolução.

Amostras positivas para outros vírus respiratórios (Flu, VRS, AdV, HBoV e entre outros).

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Colheita de espécimes clínicos

Aspirado Nasofaríngeo: A coleta de ANF é um processo indolor podendo apenas provocar lacrimejamento reflexo. Coletores de muco descartáveis ou equipo de soro acoplado a uma sonda são preferencialmente recomendados para obtenção de espécime. A sonda preconizada é a uretral nº 6 com apenas um orifício na ponta. O calibre da sonda é variável segundo o fabricante, devendo ser dada à preferência a de maior flexibilidade. A aspiração pode ser realizada com bomba aspiradora portátil a vácuo acoplada a um tubo coletor contendo meio de transporte (Hanks e gelatina a 0,5%), ou vácuo de parede do hospital. Não se deve utilizar uma pressão de vácuo muito forte. Durante a coleta, a sonda é inserida através da narina até atingir a região da nasofaringe quando então o vácuo é aplicado aspirando à secreção para o interior do coletor ou equipo. O vácuo deve ser acionado após a sonda se localizar na nasofaringe, uma vez que, se no momento da introdução da sonda houver vácuo, poderá ocorrer lesão da mucosa. Este procedimento deve ser realizado em ambas as narinas, mantendo movimentação da sonda para evitar que haja pressão diretamente sobre a mucosa o que provocaria sangramento. Deve-se alternar a coleta nas duas fossas nasais até obter um volume suficiente, de aproximadamente 1 ml.

Swab Combinado (Sc): O *swab* nasal complementa o material aspirado. Utiliza-se uma haste de madeira ou de plástico, que tem a extremidade revestida de algodão umedecida em solução salina tamponada (PBS) estéril. Esta é introduzida a 1,5 cm da narina, próxima à região das coanas do paciente, com movimento circular, delicado e firme, mantendo leve pressão sobre a mucosa nasal por alguns

segundos. Após a retirada da haste, esta é quebrada, sendo a parte distal mantida em PBS estéril. Para a coleta do *swab* oral deve ser introduzida na região da orofaringe do paciente uma haste que contenha algodão em uma de suas extremidades, até proximamente a região do palato mole, e com movimentos circulares deve-se friccionar a mucosa oral por alguns segundos. Após a retirada da haste, esta é quebrada, sendo a parte distal mantida em PBS estéril. **(Figura 6).**

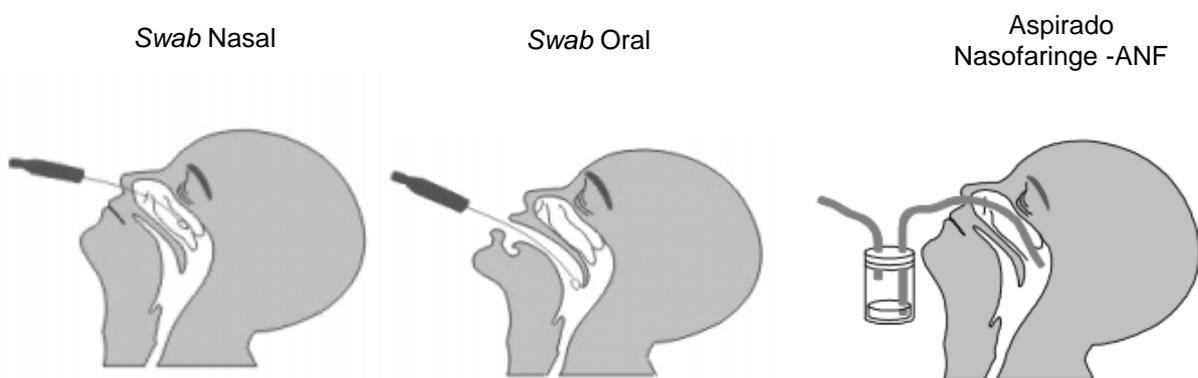


Figura 6: Figura esquemática mostrando a coleta por *Swab* combinado (Nasal e Oral) e por aspirado Nasofaringe – ANF. Fonte: Adaptado de http://virus.med.puc.cl/virus_respiratorios/influenza/diagnostico.htm, acesso em 23/02/2011.

Todas as hastes coletoras são colocadas em um tubo contendo meio de transporte, devidamente rotulado com o nome do paciente e a data de colheita. Após a coleta, os espécimes são encaminhados, sob refrigeração (4°C), ao laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Evandro Chagas (IEC) para processamento.

5.2.2. Processamento das amostras

As amostras são oriundas de demanda espontânea em nível ambulatorial e hospitalar, da rede sentinela, onde a maioria das amostras (cerca de 80%) são provenientes do período da pandemia de Influenza A H1N1 de 2009 - 2010.

No laboratório de Vírus Respiratório, as amostras foram inicialmente homogeneizadas e transferidas para um tubo cônico de polipropileno de 15 ml, devidamente identificadas com o registro do paciente. As amostras foram então centrifugadas a 1300 rpm por 10 minutos, a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi dividido em duas alíquotas e estocado a – 70°C até seu processamento. O sedimento celular resultante da centrifugação foi utilizado na preparação de lâminas para detecção de antígenos virais de diferentes vírus respiratórios através da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI). O seu sobrenadante foi utilizado para detecção de HMPV por meio de técnicas de Biologia Molecular.

5.2.3. Detecção e caracterização genética do HMPV

5.2.3.1. Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído a partir da secreção respiratória, utilizando-se o kit comercial – *PureLink*[™] (Invitrogen Life Technologies) – seguindo as orientações do fabricante, onde resumidamente, consiste em quatro etapas principais: Lise, ligação, lavagem e eluição.

5.2.3.2. Detecção do RNA viral via Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa em Tempo Real (qRT-PCR)

A detecção de HMPV foi baseada na amplificação do gene N por meio de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase em tempo real (qRT-PCR) por meio do sistema TaqMan. A técnica de qRT-PCR foi realizada utilizando-se o kit comercial *SuperScript™ One-step qRT-PCR with Platinum Taq™* (Invitrogen Life Technologies) junto aos oligonucleotídeos e sondas especificados no **quadro 2**. As reações de qRT-PCR foram feitas para um volume final de 25µL contendo 5µL de RNA viral, 5,1µL de H₂O, 12.5 µL de 2X *Reaction Mix* (contendo 0,4mM de cada dNTP, 2,4mM de MgSO₄), 0.3µM de cada *primer* (50 pmol/µL) e 0.25µM (20 pmol/µL) da sonda para HMPV específicos, 0,5µL de Rox e 0,5µL de SSIIRT/Taq mix. As condições para amplificação do gene podem ser visualizadas no **quadro 3**. As amostras foram testadas em agrupamentos, composto por cinco espécimes clínicos diferentes. Quando um agrupamento foi positivo para HMPV, as amostras que compõem a mistura foram testadas individualmente, a fim de se identificar qual o espécime positivo. Cada conjunto de amostras submetido à amplificação foi acompanhado de um controle negativo, composto por todos os reagentes da mistura e água livre de DNase e RNase e um controle positivo (cepa CAN 97-83).

IDENTIFICAÇÃO	SEQUÊNCIA (5'→3')	TAMANHO DO AMPLICON
HMPV/+540	CAAGTGYGACATTGCTGACCTGAA	59 pb
HMPV/-598	ACTGCCGCACAACATTTAGAAA	
HMPV1	FAMTGGCYGTYAGCTTCAGTCAATTCAACAGATAMRA	--

Quadro 2: Oligonucleotídeos e sonda utilizados no qRT-PCR.

NÚMERO DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	MINUTOS
1	48	30
	95	10
45	95	0,25*
	60	1

* 0,25 minutos é equivalente a 15 segundos

Quadro 3: Condições para amplificação do gene N de HMPV pela técnica do qRT-PCR

5.2.3.3. Amplificação do gene F por RT-PCR

A amplificação de segmentos dos genes F foi feita por RT-PCR em um único tubo utilizando o kit comercial *SuperScript™ One-step RT-PCR with Platinum Taq™* (Invitrogen Life Technologies), com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene F, mostrado no **quadro 4**. As reações de RT-PCR foram feitas para um volume final de 25µL contendo, 5 µL de RNA_v, 6,5 µL de H₂O, 12.5 µL de 2X Reaction Mix, 0,2µL de cada Oligonucleotídeo iniciador específico para o gene F do *Metapneumovirus Humano* (50 pmol/µL) e 0,5µL de mix RT/Taq (*SuperScript™ RT/Platinum Taq*).

IDENTIFICAÇÃO	SEQUÊNCIA (5'→ 3')	TAMANHO DO AMPLICON
HMPV F1 /+/3069	ATGTCTTGGAAAGTGGTG	775 pb
HMPV F1 /-/ 3844	CCATGTAAATTACGGAGCT	

Quadro 4: Oligonucleotídeos utilizados na RT-PCR e reamplificação da PCR.

5.2.3.4. Eletroforese em gel de agarose

Ao término da amplificação, os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado por *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium Inc.) com tampão tris-acetato-EDTA (1x TAE), inicialmente por 5 minutos 80 volts (V), seguido de 25 minutos a 110V. O marcador de peso molecular - 200 *lines SmartLadder* (EUROGENTEC) foi aplicado em cada gel e a visualização dos amplicons impregnados pelo *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* foi realizada em

transilumidor com luz UV e fotografado com auxílio do sistema de fotodocumentação *Vilber Loumart*.

5.2.3.5. Purificação e quantificação dos produtos da RT-PCR

Nas amostras que apresentaram a banda de interesse foi realizada a purificação do produto da RT-PCR, utilizando o kit comercial *MEGAquick-spin PCR & AGAROSE GEL DNA EXTRACTION (Bioeasy)*, seguindo as instruções do fabricante. Depois de purificadas as amostras foram armazenadas a -20°C. A quantificação do DNA para a determinação da concentração do mesmo foi realizada seguindo instruções do fabricante do marcador de peso molecular *Low Mass Ladder (Invitrogen)*. Resumidamente, consistirá em eletroforese em gel de agarose 2% das amostras previamente purificadas, que serão visualizados em transilumidor com luz UV e fotografadas com auxílio do sistema de fotodocumentação *Vilber Loumart*. A concentração de cada amostra será determinada comparando-se a intensidade das bandas do marcador com as bandas das amostras, sendo o resultado expresso em nanogramas (ng).

5.2.3.6. Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit comercial *Big Dye Terminator* (Applied Biosystem), conforme especificações do fabricante e utilizando os mesmos iniciadores usados na geração do amplicon.

5.2.3.7. Purificação do produto da reação de sequenciamento

A purificação foi feita pelo método de precipitação em isopropanol/etanol (65%/70% respectivamente), com finalidade de retirar o excesso de didesoxirribonucleotídeos (dDNTP) não incorporados na reação de sequenciamento. Este método consiste em 3 etapas: precipitação, lavagem e eluição. Em seguida os produtos foram armazenados a - 20° C.

5.2.3.8. Eletroforese em sequenciador automático

Esta etapa foi realizada em sequenciador automático ABIPrism 3130xl (Applied Biosystem), e consiste no emprego do método de terminação de cadeia por didesoxirribonucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes, que ao contato com raios laser, emitem fluorescência de diferentes comprimentos de ondas correspondentes a cada um dos quatro nucleotídeos que compõem basicamente a molécula de DNA (A,C,T,G) localizados na extremidade 3' (SANGER et. al., 1977).

5.2.3.9. Análise das sequências

As sequências nucleotídicas obtidas para o gene F foram analisadas, editadas e alinhadas utilizando-se o programa *BioEdit v 7.1.1*, e comparadas com sequências de outros vírus isolados e disponíveis no banco de dados do *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa *Clustal W* (Kumar et al., 2000) e MEGA 5.0. A árvore filogenética foi construída usando o método de *neighbor joining* (NJ), implementados no programa *Mega 5.0*. A análise de *bootstrap* usando 2000

replicons foi utilizada para gerar maior confiança aos valores dos grupamentos (FELSENSTEIN, 1985).

5.3. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

Quanto aos aspectos éticos, o projeto seguiu todas as orientações contidas na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas CEP/IEC e tendo parecer favorável a sua realização. Quanto aos aspectos de biossegurança, foram utilizados equipamentos de proteção individual pertinentes. Todo o material potencialmente contaminado foi manipulado em laboratório de segurança NB2, dentro de cabine de contenção biológica nível 2.

6. RESULTADOS

Para garantir maior credibilidade em nossos resultados e mensurar a parcela da população da região Norte acometida pelo HMPV, utilizamos o cálculo estatístico chamado de teste de impacto populacional (PIN-ER-t). Não foi necessário calcular o número amostral, pois testamos todas as amostras referentes ao período do estudo.

O teste de impacto populacional relaciona o fator de risco, tais como o Risco Relativo, e indica a intensidade da associação entre exposição e a doença, não esclarecem, todavia, os benefícios que poderiam advir para a população se a exposição ao fator de risco fosse modificada ou eliminada. O PIN-ER-t proporciona essa quantificação populacional, denominada de Número de Impacto Populacional.

Este teste varia de acordo com o número de amostras testadas, o número de amostras positivas e o número populacional. Para efetuar tal cálculo, obtivemos o número populacional de cada estado da região (**Quadro 5**).

Estado	Número Populacional (Ano de 2010)	Incidência	População acometida	Impacto do HMPV na população
Acre	733.559	9,14%	25.142	3,42%
Amapá	669.526	3,35%	8.410	1,25%
Amazonas	3.483.985	0,78%	10.190	0,29%
Pará	7.581.051	3,89%	110.588	1,45%

Quadro 5: Número de habitantes dos estados da região Norte, com suas respectivas populações acometidas e os impactos do HMPV na mesma, o Estado de Roraima não entrou no quadro devido não computar nenhuma amostra positiva.

Para o cálculo da incidência foi feito uma regra de três simples, utilizando o número de amostras que deram entrada no Laboratório de Vírus Respiratórios e o número de amostras positivas (**Quadro 6**).

ORIGEM	AMOSTRAS TESTADAS	AMOSTRAS POSITIVAS	INCIDÊNCIA (%)
ACRE	164	15	9,14
AMAPÁ	149	5	3,35
AMAZONAS	763	6	0,78
RORAIMA	47	0	0
PARÁ	2643	103	3,89
TOTAL	2966	129	-

Quadro 6: Descrição sucinta da incidência de HMPV por estados da região Norte.

Entre os anos de 2009 a 2011, foram analisadas 2966 amostras de secreção respiratórias de pacientes com IRA, provenientes da região Norte do Brasil (Acre, Amazonas, Amapá, Roraima e Pará); todas negativas para Influenza A (Flu A) e Vírus Respiratório Sincicial Humano (HVRs). Desse total, foi possível detectar através da qRT-PCR, o RNA do HMPV em 129 (4,34%) amostras (**Figura 7**).

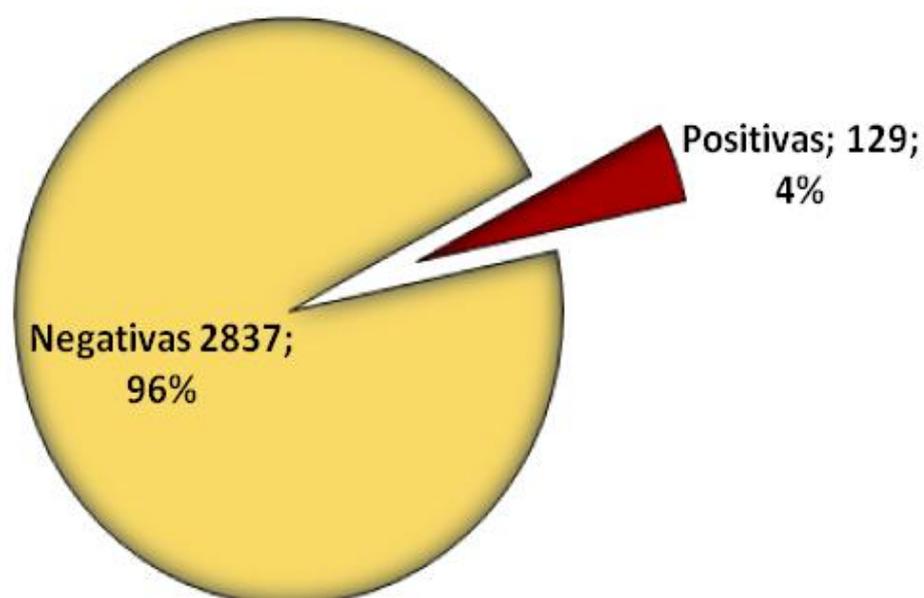


Figura 7: Detecção do RNA do HMPV por qRT-PCR.

A distribuição anual dos casos positivos evidenciou uma circulação variada do HMPV na região Norte. No Amazonas, Amapá e Pará, a circulação viral nos anos de 2009 e 2010 foi semelhante, com maior número de casos em 2009 nos meses de Julho a Dezembro e, para 2010, nos meses de Fevereiro a Maio (**Figura 8**).

No estado do Acre só foram observados casos positivos para HMPV no ano de 2011, distribuídos entre os meses de Abril a Dezembro. Neste mesmo ano, para os demais estados a circulação viral foi muito variada (**Figura 8**).

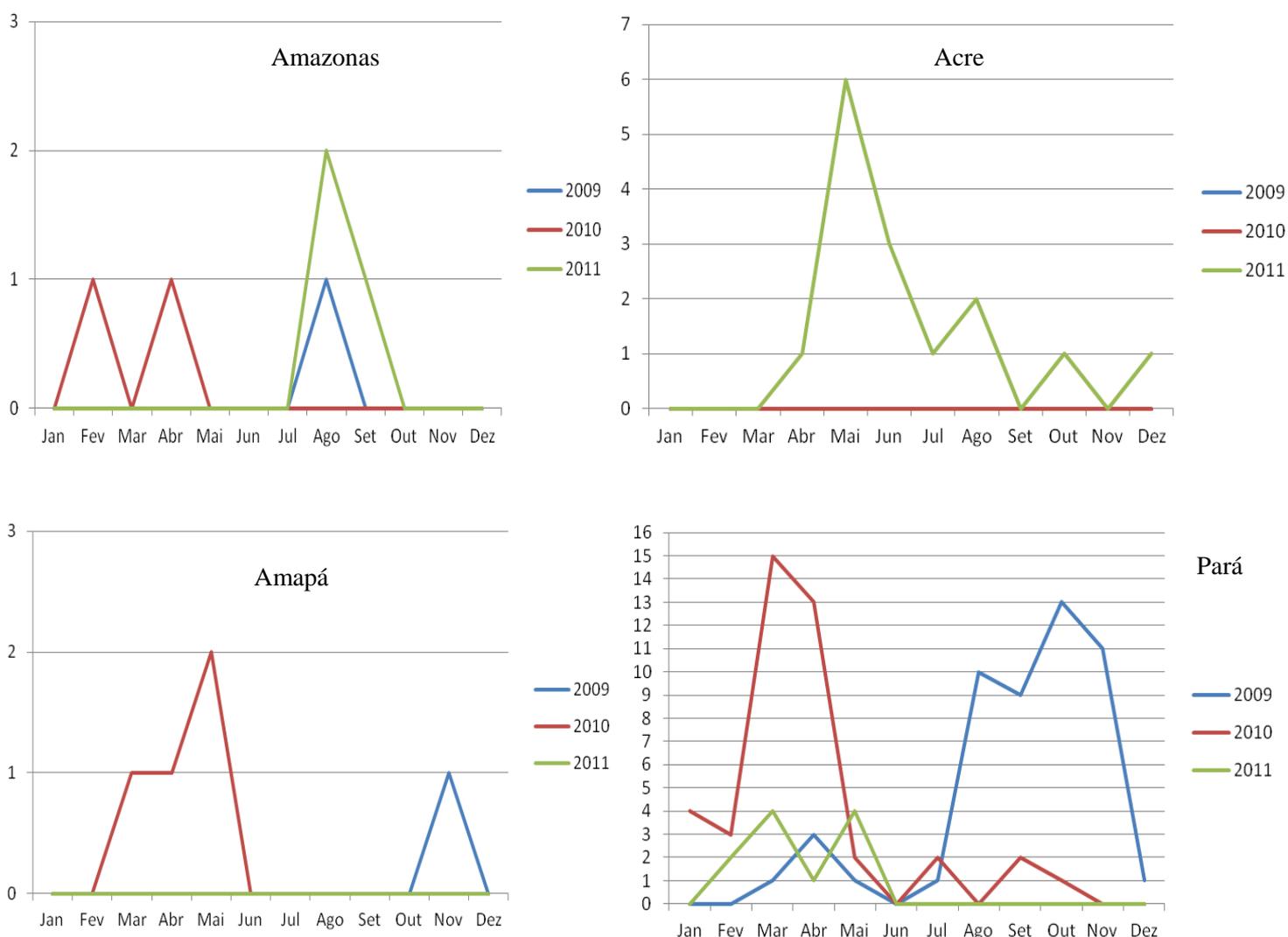


Figura 8: Distribuição anual dos casos positivos de infecção pelo HMPV, durante os anos de 2009, 2010 e 2011 na região norte do Brasil.

Em relação a faixa etária, o maior número de casos positivos foi detectado em indivíduos entre zero a quatro anos de idade (**Tabela 1**).

Tabela 1: Distribuição por faixa etária de amostras positivas para HMPV nos estados da região norte do Brasil, entre os anos de 2009 a 2011.

Faixa Etária (Anos)	Número de espécimes positivos para HMPV			Total
	2009	2010	2011	
0-4	31	37	17	85(65,8%)
5-14	9	04	06	19(14,7%)
15-24	02	02	03	07(5,4%)
25-59	03	05	01	09(6,9%)
>60	1	05	03	09(6,9%)
Total (%)	46 (7,74)	53 (6,26)	30 (4,24)	129 (100)

Das 129 amostras positivas pelo método de qRT-PCR, 26 amostras foram parcialmente sequenciadas para o gene codificador da proteína F, assim distribuídas: 14 detectadas no ano de 2009, sete em 2010 e cinco em 2011.

Para a análise filogenética das amostras sequenciadas, utilizou-se sequencias representativas de cada subtipo viral (A1/2 e B1/2), obtidas do banco de dados *GenBank*. A árvore filogenética construída a partir dessas análises evidenciou que as cepas circulantes dos grupos A e B pertenciam, exclusivamente, aos subgrupos A2 e B2, respectivamente (**Figura 9**).

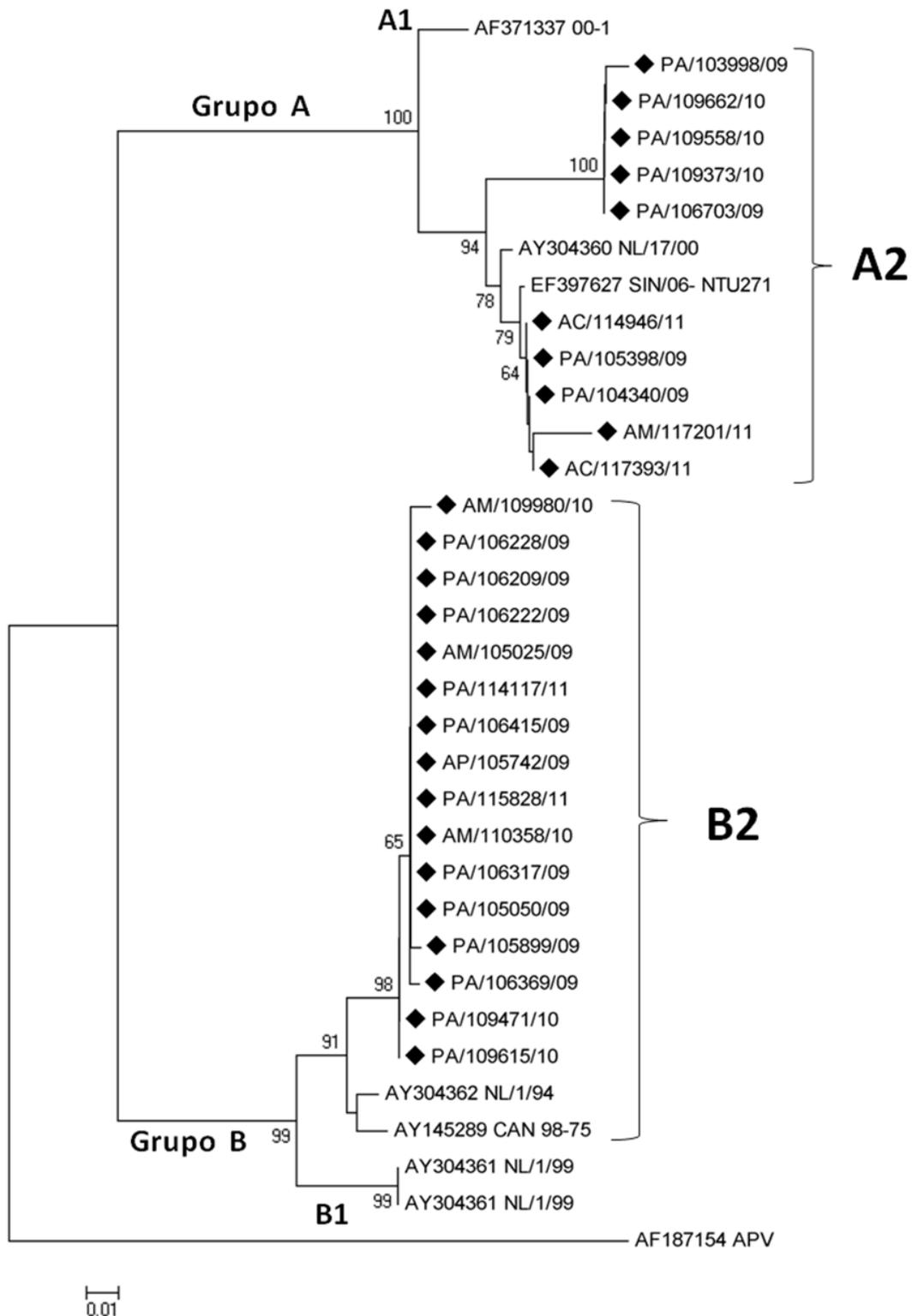


Figura 9: Árvore Filogenética construída a partir da sequência parcial do gene codificador da proteína F do HMPV. A árvore foi gerada pelo método de *neighbor-joining*,(NJ) utilizando o programa MEGA v. 5.0 e parâmetro *Kimura 2*. Foram incluídos na análise os nucleotídeos 3069 a 3844 do gene F. Valores de *Bootstrap* iguais a ($\times 2000$).

Na região Norte, fazendo a subdivisão por anos, pode-se observar que quatro amostras referentes ao ano de 2009 pertenciam ao subgrupo A2 e 10 amostras pertenciam ao subgrupo B2. Durante todo o ano de 2010 circularam na região Norte os subtipos A2 (três amostras) e B2 (quatro amostras). Já no ano de 2011 (A2 [três amostras] e B2 [duas amostras]) o padrão de circulação se manteve, não sendo observado, durante este estudo, a circulação dos subtipos A1 e B1 na região Norte (**Quadro 7**).

Estados	2009	2010	2011
Amazonas	B2	B2	A2
Acre	Sem detecção viral	Sem detecção viral	A2
Amapá	B2	Sem detecção viral	Sem detecção viral
Pará	A2/B2	A2/B2	B2

Quadro 7: Distribuição dos subtipos de HMPV por estado e ano.

Analisando os dados da **tabela 2**, construída com as amostras detectadas neste estudo, observa-se que houve variabilidade nucleotídica significativa entre os subtipos de HMPV detectados, divergências estas que variam em até 40%. No entanto, em relação a obtenção das sequências aminoácidas observam-se poucas divergências, concluindo que as mudanças nos nucleotídeos atuam de forma silenciosa.

Tabela 2: Variabilidade nucleotídica do HMPV entre as amostras sequenciadas em relação as cepas protótipos.

Amostra	SUBTIPO A2 Cepas de referência: AF371337, EF397627			SUBTIPO B2 Cepas de referência: AY304362, AY145289		
	2009	2010	2011	2009	2010	2011
PA/103998/09	100%	-	-	-	-	-
PA/104340/09	64%	-	-	-	-	-
PA/105398/09	-	-	79%	-	-	-
PA/106703/09	100%	-	-	-	-	-
PA/109373/10	-	100%	-	-	-	-
PA/109558/10	-	100%	-	-	-	-
PA/109662/10	-	100%	-	-	-	-
AC/114946/11	-	-	79%	-	-	-
AC/117393/11	-	-	60%	-	-	-
AM/117201/11	-	-	60%	-	-	-
PA/105050/09	-	-	-	65%	-	-
PA/105899/09	-	-	-	65%	-	-
PA/106209/09	-	-	-	65%	-	-
PA/106222/09	-	-	-	65%	-	-
PA/106228/09	-	-	-	65%	-	-
PA/106317/09	-	-	-	65%	-	-
PA/106369/09	-	-	-	65%	-	-
PA/106415/09	-	-	-	65%	-	-
PA/109980/10	-	-	-	-	65%	-
PA/110358/10	-	-	-	-	65%	-
PA/109471/10	-	-	-	-	98%	-
PA/109615/10	-	-	-	-	98%	-
PA/114117/11	-	-	-	-	-	65%
PA/115828/11	-	-	-	-	-	65%
AM/105025/09	-	-	-	65%	-	-
AP/105742/09	-	-	-	65%	-	-

O alinhamento das sequências genéticas traduzidas foi confeccionado para verificar a significância da variabilidade nucleotídica observada. Analisando a figura 10 com as sequências aminoácidas parciais do gene F, verifica-se que a maior variabilidade entre as sequências é observada entre os subgrupos A e B e que entre cada genótipo há forte relação de conservação.

Ao longo de toda a proteína F é possível que um número maior de divergência venha a compor a diferença antigênica entre as cepas A e B. Entretanto, os dados de sequenciamento parcial do gene F obtidos mostram que somente sete aminoácidos sugerem forte indicio de assinatura genética, responsável pela formação dos subgrupos.

De fato, as substituições I66V, N79T, G83N, E111D, S119R, A129D, N167T, foram encontradas em todas as cepas de subgrupo A2.

7. DISCUSSÃO

Uma vez obtido os números populacionais, e as incidências do HMPV em cada estado, foi realizado o teste de PIN-ER-t. O teste nos mostrou que 25.142 habitantes (3.42%) da população do Acre, de um total de 733.559 habitantes, foi acometida pelo HMPV, durante os anos de 2009 à 2011, onde apenas uma epidemia no ano de 2011 foi responsável por estes resultados. Para o estado do Amapá, 8.410 habitantes (1,25%) entraram em contato com o HMPV. Neste estado o HMPV teve um baixo impacto devido o padrão de circulação do vírus ser baixo no mesmo. No Amazonas, o teste mostrou que 10.190 habitantes (0,29%) foram acometidos pelo referido vírus. O percentual baixo neste estado explica-se pelo fato de se ter uma baixa positividade nas amostras testadas. E por fim, no estado do Pará, evidenciou-se que 110.588 habitantes (1,45%) entraram em contato, pelo ao menos, uma vez com o HMPV durante os três anos de estudo. O baixo impacto populacional, deve-se ao fato de serem testadas uma quantidade de amostras extremamente superior ao número de amostras positivas.

Entre janeiro de 2009 a Dezembro de 2011, foram diagnosticados 129 casos de infecção respiratória aguda associada ao Metapneumovirus Humano, na região Norte. As infecções respiratórias agudas continuam sendo um sério problema de saúde pública em países em desenvolvimento, afetando principalmente crianças menores de cinco anos de idade. Nesta população o HMPV é um dos patógenos mais comumente associados a esta infecção.

Na América latina dados da OPAS/OMS referentes à incidência e prevalência das IRA demonstram ser essa a causa principal de consultas ambulatoriais pediátricas, chegando a representar 40 a 60% dos motivos de consultas neste grupo (OPAS, 2007).

Em nosso estudo a faixa etária de 0-4 anos de idade foi a que concentrou a maioria dos casos (65,89%), em concordância com a literatura. Esta concentração do número de casos em menores de quatro anos pode ser explicada pela imaturidade imunológica desses indivíduos (MOURA et al, 2003; COLLINS et al., 2001; TREGONING & SCHWARZE, 2010; AKINLOYE, et al., 2011; HAJJAR, et al., 2011; REGEV et al., 2012). De fato, estudos recentes têm demonstrado que a doença causada pelo HMPV acomete igualmente adultos, embora com menor gravidade (ZAKI et al., 2009; TREGONING & SCHWARZE, 2010; JARTTI, et al., 2011; REGEV, et al., 2012; LIAO, et al, 2012).

Quanto à distribuição dos subgrupos dentro de cada período epidêmico, foi investigada através da caracterização genética por RT-PCR. Estes testes revelaram a co-circulação dos subgrupos A e B nos anos de 2009, 2010 e 2011, com predominância do subgrupo B2 nos anos de 2009 e 2010. Somente no ano de 2011 a circulação do subgrupo A2 foi superior à circulação do subgrupo B2.

Diversos estudos relatam a co-circulação dos subgrupos A e B com predominância de um, sendo, contudo, o subgrupo A reconhecido como predominante na maioria dos casos (MAERTZDORF, et al., 2004; SKIADOPOULOS, et al., 2004; SLOOTS, et al., 2006; LOO, et al., 2007; OLIVEIRA, et al., 2009; PRESTI, et al., 2011; AGRAWAL, et al., 2011).

No Brasil, poucos estudos sobre a variabilidade genética do HMPV foram descritos, porém verifica-se a circulação de todos eles, quer seja em apenas um período epidêmico ou em períodos epidêmicos consecutivos (OLIVEIRA, et al., 2009; CARNEIRO et al., 2009; DEBUR, et al., 2010; PILGER, et al., 2011).

Os vírus identificados na cidade de Belém mostraram-se formando *clusters* semelhantes aos demais vírus de outras partes do mundo, que estão geneticamente relacionadas, por exemplo, as cepas da Holanda.

A co-circulação de genótipos diferentes dentro de um mesmo período epidêmico tem sido relatada em estudos realizados em todos os continentes, como o Europeu, Oceania, Asiático, Africano e Americano (van den HOOGEN, et al., 2004; SLOOTS, et al., 2006; AGRAWAL, et al., 2011; PALACIOS, et al., 2011; REGEV, et al., 2012).

A população do Acre foi a mais impactada pela circulação do HMPV (3,42%), os outros estados tiveram índices menores, devido o número amostral ser muito maior do que a quantidade de amostras positivas (Pará e Amazonas). O estado do Amapá obteve um baixo impacto pela circulação do HMPV devido o referido vírus quase não circular no período estudado.

No Pará, observou-se que há circulação primeiro de um subgrupo (B2) no primeiro semestre e uma segunda circulação do subtipo A2 no segundo semestre. Circulando assim de maneira independente.

A caracterização genética do vírus por meio de seqüenciamento genético foi realizado diretamente da amostra clínica. Este tipo de sequenciamento apresenta a vantagem de demonstrar a sequencia real do genoma do vírus infectante humano, pois evita mudanças aminoacidicas devido a adaptação das proteínas da superfície viral as células da cultura celular ocorridas durante o processo de replicação *in vitro* semelhantes aos trabalhos de KONIG *et al.*, 2004 e LUDEWICK *et al.*, 2005.

Para a subtipagem utilizou-se a proteína F por dar origem a uma proteína de superfície viral e pelo fato de apresentar uma porção altamente conservada, e por

poder ser usado como referencia em estudos de variabilidade genética e genotipagem viral.

A árvore filogenética foi construída com uma região em comum de todas as sequencias obtidas e desta maneira a árvore para o gene F foi construída com 700 nucleotídeos. Estudos prévios demonstraram que os padrões filogenéticos produzidos por um fragmento deste gene são semelhantes aos produzidos pelo sequenciamento completo do gene (HUCK *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2008).

De um modo geral, a subtipagem do HMPV é realizada pela análise nucleotídica, pois poucas diferenças aminoácidas discriminam os genótipos A e B, e variações polimórficas tendem a agrupar discretamente os subtipos (YANG *et al.*, 2009).

A análise da árvore filogenética construída com as sequencias nucleotídicas parciais do gene F mostraram a presença de 2 grupos principais (A e B) que podem ser subdivididos em subgrupos (YANG *et al.*, 2009).

Van den Hoogen *et al.* (2004a) e Yang *et al.* (2009) realizaram estudos filogenéticos com sequencias parciais e completas do gene F e tanto o valor do *bootstrap* quanto a topologia da árvore foram semelhantes com a obtida neste estudo. Adicionalmente, os subtipos detectados pelo sequenciamento parcial do gene F foram suportados também pela análise de identidade/similaridade entre as sequências obtidas e as sequências de referência.

A composição nucleotídica das sequencias obtidas para o gene F revelou 83,2-88,2% e 85,4-88,2% de similaridade entre os genótipos A e B do HMPV detectados e uma identidade de 93,7–95,6% e 97,5% entre os subtipos do genótipo A e 95,9-98,4% e 95,6% entre os subtipos do genótipo B, respectivamente. Deste modo, as sequências mostraram maior diversidade nucleotídica e aminoácidas

entre os genótipos A e B (MACKAY *et al.*, 2004; GAUNT *et al.*, 2009). Huck *et al.* (2006) analisaram sequências parciais do gene F do HMPV (506 nucleotídeos) e determinaram que a identidade nucleotídica entre os subgrupos A e B foi de 84-87% enquanto que entre os subtipos A1-A2 e B1-B2 foi de 92-94% e 94- 96%, respectivamente.

No nosso estudo evidenciamos 112 variações nucleotídicas. Tais mudanças não representam grandes mudanças na síntese de aminoácidos, observa-se essa característica quando há a conversão dos aminoácidos em proteínas, observando-se o seguinte. De um total de 112 nucleotídeos divergentes no sequenciamento genético, somente 8 aminoácidos são diferentes entre as cepas A e B, mostrando claramente que apenas poucas divergências de aminoácidos podem causar a formação de subgrupos, obtendo assim uma assinatura genética entre as cepas. As manifestações clínicas dos indivíduos infectados pelo HMPV do subtipo A2 E B2 são bastante semelhantes, o que nos leva a acreditar que imunologicamente as diferenças de subgrupo não são determinantes na intensidade e na variedade dos sintomas apresentados pelos pacientes.

8. CONCLUSÕES

A faixa etária de 0-4 anos de idade foi a que concentrou a maioria de casos de infecção respiratória aguda associada ao HMPV (n=85; 65,89%).

Houve co-circulação dos subgrupos A e B nos anos de 2009, 2010 e 2011 com predominância do subgrupo B em todos os anos.

Dentro do grupo A, foi observada a circulação do subtipo A2.

Dentro do grupo B, foi observada a circulação do subtipo B2.

Não houve circulação dos subtipos A1 e B1 no período do estudo.

A similaridade de sequência nucleotídica do gene codificador da proteína F, obteve em média, 94% de valor *bootstrap* entre as amostras do subgrupo A2 quando comparadas com a cepa protótipo.

Dentro do subgrupo B a similaridade desta proteína variou em 98% de *bootstrap* entre as amostras do subgrupo B2.

As substituições I66V, N79T, G83N, E111D, S119R, A129D, N167T, foram características de cepas do subgrupo A2.

Aparentemente não há diferença nas manifestações clínicas em indivíduos infectados pelos subtipos A2 e B2.

9. ANEXOS

ANEXO A – FICHA DE NOTIFICAÇÃO PARA INFLUENZA

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO		Nº		
FICHA DE INVESTIGAÇÃO INFLUENZA HUMANA POR NOVO SUBTIPO (PANDÊMICO)						
CASO SUSPEITO DE INFLUENZA HUMANA POR NOVO SUBTIPO (PANDÊMICO): Todo paciente procedente de área afetada que apresente temperatura >= 38°C E tosse OU dor de garganta OU dispnéia.						
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação 2 - Individual		3 Data da Notificação			
	2 Agravado/a INFLUENZA HUMANA POR NOVO SUBTIPO (PANDÊMICO)		Código (CID)			
	4 UF	5 Município de Notificação	Código (IBGE)			
Notificação Individual	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código	7 Data dos Primeiros Sintomas		
	8 Nome do Paciente				9 Data de Nascimento	
	10 (ou) idade	11 Sexo	12 Gestante	13 Raça/Cor		
Dados de Residência	14 Escolaridade					
	15 Número do Cartão SUS		16 Nome da mãe			
	17 UF	18 Município de Residência	Código (IDGC)	19 Distrito		
	20 Bairro	21 Logradouro (rua, avenida...)		Código		
	22 Número	23 Complemento (apto., casa, ...)		24 Con. campo 1		
	25 Con. campo 2		26 Ponto de Referência		27 CPF	
	28 (DDD) Telefone	29 Zona		30 País (se residente fora do Brasil)		
	Dados Complementares do Caso					
	Antecedentes Epidemiológicos	31 Data da Investigação		32 Ocupação		
		33 Recebeu Vacina contra Gripe		34 Se sim, data da última dose		35 Recebeu Vacina Anti-Pneumocócica
36 Se sim, data da última dose		37 Contato com Caso Suspeito ou Confirmado de influenza humana por Novo Subtipo (até 10 dias antes do início dos sinais e sintomas)				
38 Informações sobre o Deslocamento (data e local frequentados no período de até 10 dias antes do início dos sinais e sintomas)						
Data		UF	Município/Localidade	País	Meio de Transporte	
39 Contato com Aves Doentes ou Mortas até 10 dias antes do início dos sinais e sintomas?		40 IFF	41 Nome do Município		42 País	
Dados Clínicos	43 Sinais e Sintomas					
	44 Comorbidade					

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS – CEP/IEC



Parecer de Aprovação nº 012/2011
Protocolo CEP/IEC - Nº 002/11
CAAE: 0001.0.072.000-11

Ananindeua/PA, 07 de abril de 2011.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS- CEP

Projeto: **“Caracterização Genética de Metapneumovírus humano isolados em casos de infecção respiratória aguda nas regiões Norte e Nordeste do Brasil”**

Pesquisador Responsável: WYLLER ALENCAR DE MELLO

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epigrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização.

Atenciosamente,


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINLOYE, O. M., RONKKO, E., SAVOLAINEN-KOPRA, C., ZIEGLER, T., IWALOKUN, B. A., DEJI-AGBOOLA, M. A., OLUWADUN, A., ROIVAINEN, M., ADU, F. D., HOVI, T. Specific Viruses Detected in Nigerian Children in Association with Acute Respiratory Disease. **Journal of Tropical Medicine**. 2011:1-6, 2011.

ALBUQUERQUE, M.C.; PENA, G.P.; VARELLA, R.B.; GALLUCCI, G.; ERDMAN, D.; SANTOS, N. Novel respiratory virus infections in children, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**.15:806-8, 2009.

ALI, S.A., WILLIAMS, J.V., CHEN, Q., FAORI, S., SHEHABI, A., AL JUNDI, E., KHURI-BULOS, N., HALASA, N. Human metapneumovirus in Hospitalized Children in Amman, Jordan. **Journal of Medical Virology**. 82:1012-1016, 2010.

ARABPOUR, M.; SAMARBAFZADEH, A. R.; MAKVANDI, M.; SHAMSIZADEH, A.; PERCIVALLE, E.; ENGLUD, J.; LATIFI, S. M. The highest prevalence of Human Metapneumovirus in Ahwaz children accompanied by Acute Respiratory Infections. **Indian Journal of Medical Microbiology**. 26(2): 123-6, 2008.

BAO, X., LIU, T., SHAN, Y., LI, K., GAROFALO, R.P., CASOLA, A. Human Metapneumovirus Glycoprotein G Inhibits Innate Immune Responses. **PLoS Pathogens**. 4(5):1-12, 2008.

BASTIEN, N., LIU, L., WARD, D., TAYLOR, T., LI, Y. Genetic Variability of the G Glycoprotein Gene of Human Metapneumovirus. **Journal Of Clinical Microbiology**. 42(8):3532-3537, 2004.

BERMAN, S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. **Reviews of infectious diseases**. 13:S454-62,1991.

BIACCHESI, S., SKIADOPOULOS, M.H., BOIVIN, G., HANSON, C.T., MURPHY, B.R., COLLINS, P.L., BUCHHOLZ, U.J. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. **Virology**. 315:1-9, 2003.

BOIVIN, G.; DE SERRES, G.; CÔTÉ, S.; GILCA, R.; ABED, Y.; ROCHETE, L.; BERGERON, M. G.; DERY, P. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. **Emerging Infectious Diseases** 9:634–640, 2003.

CAMPBELL, H. Acute Respiratory Infection: a global challenge. **Archives of Disease in Childhood**. (73): 281-86, 1995.

CARNEIRO, B.M., YOKOSAWA, J., ARBIZA, J., COSTA, L.F., MIRAZO, S., NEPOMUCENO, L.L., OLIVEIRA, T.F.M., GOULART, L.R., VIEIRA, C.U., FREITAS, G.R.O., PAULA, N.T., QUEIRÓZ, D.A.O. Detection of All Four Human Metapneumovirus Subtypes in Nasopharyngeal Specimens from Children with Respiratory Disease in Uberlândia, Brazil. **Journal of Medical Virology**. 81:1814-1818, 2009.

CHABRA, P.; GARG, S.; MITTAL, S.K.; SATYANARAYAN, L.; MEHRA, M.; SHARMA, N. Magnitude of acute respiratory infections in under fives. **Indian Pediatrics**. 30:1315-19, 1993.

CHUNG, J.Y.; HAN, T.H.; KIM, C.K.; KIM, S.W.; HWANG, E.; Human Metapneumovirus Infection In Hospitalized Children With Acute Respiratory Disease In Korea. **Journal Korean Medical Science**, (21): 838-42, 2006.

CHUNG, J. Y.; HAN, T. H.; KIM, S. W.; HWANG, E. S. Genotype variability of human metapneumovirus, South Korea. **Journal of Medical Virology**, 5 (80): 902-905, 2008.

CUEVAS, L. E.; BEN NASSER, A. M.; DOVE, W.; GURGEL, R. Q.; GREENSILL, J.; HART, C. A. Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, 9 (12): 1626-1628, 2003.

COLLINS, P.L & CROWE Jr., J.E. **Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus**. In *Fields Virology*, 5rd end, 1601-1646, 2007.

DEBUR, M.C., VIDAL, L.R.R., STROPARO, E., NOGUEIRA, M.B., ALMEIDA, S.M., TAKAHASHI, G.A., ROTTA, I., PEREIRA, L.A., SILVEIRA, C.S., DELFRANO, A., NAKATANI, S.M., SKRABA, I., RABONI, S.M. Impact of human metapneumovirus infection on in and outpatients for the years 2006-2008 in southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 105(8): 1010-1018, 2010.

DENNY, F.W & LODA, F.A. Acute respiratory infections are the leading cause of death in children in developing countries. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 35:1-2, 1986.

DITT, V., LUSEBRINK, J., TILLMANN, R.L., SCHILDGEN, V., SCHILDGEN, O. Respiratory Infections by HMPV and RSV Are Clinically Indistinguishable but Induce Different Host Response in Aged Individuals. **PLoS ONE.** 6(1):1-9, 2011.

DUARTE, D.M.G & BOTELHO, C. Perfil clínico de crianças menores de cinco anos com infecção respiratória aguda. **Jornal de Pediatria,** 76:207-212. 2000.

DULEK, D.E. & PEEBLES Jr., R.S. Viruses and asthma. **Biochimica Biophysica Acta,** 2011.

EBIHARA, T.; ENDO, R.; KIKUTA, H.; ISHIGURO, N.; ISHIKO, H.; HARA, M.; TAKAHASHI, Y.; KOBAYASHI, K.. Human metapneumovirus infection in Japanese children. **Journal of Clinical Microbiology.** 42:126–132, 2004.

EVASHUK, K.M.A.; FORGIE, S.E.; GILMOUR, S.; HUYNH, H.; LEE, B.E.; ROBINSON, J.L. Respiratory Failure Associated with Human Metapneumovirus Infection in an Infant Posthepatic Transplant. **American Journal of Transplantation.** 8: 1567-69, 2008.

FALSEY, A.; ERDMAN, D.; ANDERSON, L.; WALSH, E. Human Metapneumovirus infections in young and elderly adults. **Journal Infectious Disease,** 187: 785-90. 2003.

_____; WALSH E. Viral pneumonia in older adults. **Clinical Infectious Diseases**, 42:518–524. 2006.

FREYMUTH, F.; VABRET, A.; LEGRAND, L.; ETERRADOSSI, N.; LAFAYDELAIRE, F.; BROUARD, J. ET AL. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. **Pediatric Infectious Disease**; 22: 92-4. 2003.

GALIANO, M; VIDELA, C; PUCH, S. S; MARTÍNEZ, A; ECHAVARRÍA, M; CARBALLAL, G. Evidence of Human Metapneumovirus in Children in Argentina. **Journal of Medical Virology**, (72) 299-302, 2004.

GARENNE, M.; RONSMANS, C.; CAMPBELL, H. The Magnitude of Mortality from Acute Respiratory Infections in Children under 5 years in Developing Countries. **World Health Statistics**. 45: 180-91, 1992.

GIOULA, G.; CHATZIDIMITRIOU, D.; MELIDOU, A.; EXINDARI, M.; KYRIAZOPOULOU-DALAINA, V. Contribution of human metapneumovirus to influenza-like infections in North Greece, 2005-2008. **Euro Surveillance**, 15 (9): pii=19499, 2010.

GRAAF, M., OSTERHAUS, A.D.M.E., FOUCHIER, R.A.M., HOLMES, E.C. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. **Journal of General Virology**. 89: 2933-2942, 2008.

GRAY, G. C.; CAPUANO, A. W.; SETTERQUIST, S. F.; SANCHEZ, J. L.; NEVILLE, J. S.; OLSON, J.; LEBECK, M. G. A.; MCCARTHY, T.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Human Metapneumovirus, Peru. **Emerging Infectious Diseases** 12 (2): 347-350, 2006.

GREENSILL, J.; MCNAMARA, P. S.; DOVE, W.; FLANAGAN, B., SMYTH, R. L.; HART, C. A. Human Metapneumovirus in Severe Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. **Emerging Infectious Diseases** 9 (3): 372-375, 2003.

HAJJAR, S.A., THAWADI, S. A., SERAIHI, A. A., MUHSEN, S. A., IMAMBACCUS, H. Human Metapneumovirus and Human Coronavirus Infection and Pathogenicity IN Saudi Children Hospitalized With Acute Respiratory Illness. **Ann Saudi Med**. 31(5): 523-527, 2011.

HAMELIN, M.E.; YIM, K.; KUHN, K.H.; CRAGIN, R.P.; BOUKHVALOVA, M.; BLANCO, J.C.G.; PRINCE, G.A.; BOIVIN, G. Pathogenesis of Human Metapneumovirus Lung Infection in BALB/c Mice and Cotton Rats. **Journal of Virology**. 79: 8894-8903, 2005.

HARA, M., TAKAO, S., FUKUDA, S., SHIMAZU, Y., MIYAZAKI, K. Human Metapneumovirus Infection in Febrile Children with Lower Respiratory Diseases in Primary Care Settings in Hiroshima, Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. 61: 500-502, 2008.

HUCK, B., SCHARF, G., NEUMANN-HAEFELIN, D., PUPPE, W., WEIGL, J., FALCONE, V. Novel Human Metapneumovirus Sublineage. **Emerging Infectious Diseases**. 12(1):147-150, 2006.

JARTTI, L., LANGEN, H., SODERLUND-VENERMO, M., VOURINEN, T., RUUSKANEN, O., JARTTI, T. New Respiratory Viruses and the Elderly. **The Open Respiratory Medicine Journal**. 5:61-69, 2011.

KAHN, J. S. Epidemiology of human metapneumovirus. **Clinical Microbiology Reviews**. 19:546–55, 2006.

KAMBOJ, M.; GERBIN, M.; HUANG, C.K.; BRENNAM, C.; STILES, J.; BALASHOV, S.; PARK, S.; KIEHN, T.E.; PERLIN, D.S.; PAMER, E.G.; SEPKOWITZ, K.A. Clinical characterization of human metapneumovirus infection among patients with cancer. **Journal of Infection**. 57: 464-71, 2008

KIM, C.K.; CHOI, J.; CALLAWAY, Z.; KIM, H.B.; CHUNG, J.Y.; KOH, Y; SHIN, B.M. Clinical and Epidemiological Comparison of Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus in Seoul, Korea, 2003-2008. **Journal of Korean Medical Science**, 25:342-7, 2010.

KONIG, B.; KONIG, W.; ARNOLD, R.; WERCHAU, H.; IHORST, G.; FORSTER, J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. **Journal of Clinical Microbiology**. 42, 4632–4635, 2004.

LIAO, R. S., APPELGATE, D. M., PELZ, R. K. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility for the elderly in Oregon. **Journal of Clinical Virology**. 53:171-173, 2012.

LOO, L. H.; TAN, B. H.; NG, L.M.; TEE, N. W. S.; LIN R. T. P.; SUGRUE, R. J. Human Metapneumovirus in Children, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**. 13, (9): 1396-1398, 2007.

MAERTZDORF, J., WANG, C. K., BROWN, J. B., QUINTO, J. D., CHU, M., DE GRAAF, M., VAN DEN HOOGEN, B. G., SPAETE, R., OSTERHAUS, A. D. M. E., FOUCHIER, R. A. M. Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Human Metapneumoviruses from All Known Genetic Lineages. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(3):981-986, 2004.

MAHONY, J. B.. Detection of respiratory viruses by molecular methods. **Clinical Microbiology Reviews**. 21:716–747, 2008.

MAZZONCINI Jr, J.P., CROWELL, C.B., KANG, C.S. HUMAN METAPNEUMOVIRUS: AN EMERGING RESPIRATORY PATHOGEN. **The Journal of Emergency Medicine**. 38(4):456-459, 2010.

MELLO, W.A. & SILVA, C. Epidemiological aspects of RSV subgroups in Belém, Brazil. **Boletim Latino-Americano**. 1: 8 1992.

_____. & PINHEIRO, E.P. **Viroses Respiratórias**. In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e a medicina tropical. Belém MS: Fundação de Serviços de Saúde Pública, 473-81, 1986.

MIRAZO, S.; RUCHANSKY, D.; BLANC, A.; ARBIZA, J. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 100(7):715-8. 2005.

MOURA, F.E.A.; BORGES, L.C.; SOUZA, L.S.F.; RIBEIRO, D.H.; SIQUEIRA, M.N.; RAMOS, E.A.G. Estudo de infecções Respiratórias Agudas Virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39:275-282, 2003.

MULLER, A.; KLINKENBERG, D.; VEHRESCHILD, J.; CORNELLY, O.; TILLMAN, R.L.; FRANZEN, C.; SIMON, A.; SCHILDGEN, O. Low prevalence of human metapneumovirus and human bocavirus in adult immunocompromised high risk patients suspected to suffer from *Pneumocystis pneumonia*. **Journal of Infection**. 58: 227-31, 2009.

OLIVEIRA, D.B.L.; DURIGON, E.L.; CARVALHO, A.C.L.; LEAL, A.L.; SOUZA, T.S.; THOMAZELLI, L.M.; MORAES, C.T.P.; VIEIRA, S.E.; GILIO, A.E.; STEWIEN, K.E. Epidemiology and Genetic Variability of Human Metapneumovirus During a 4-Year-Long Study in Southeastern Brazil. **Journal of Medical Virology**. 81: 915–921, 2009.

OMURA, T.; IIZUKA, S.; TABARA, K.; TSUKAGOSHI, H.; MIZUTA, K.; MATSUDA, S.; NODA, M.; KIMURA, K. Detection of Human Metapneumovirus genomes during an outbreak of bronchitis and Pneumonia in a geriatric care home in Shimane, Japan, in Autumn 2009. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. 64: 85-87, 2011.

PAIVA, M.A.S. **Infecções de vias aéreas superiores**. In: REIS, F.J.C.; Silva, F.A.A. Manual de Pneumologia Pediátrica. Rio de Janeiro, 1-12, 1990.

PALACIOS, G., LOWENSTINE, L. J., CRANFIELD, M. R., GILARDI, K., V. K., SPELMAN, L., LUKASIK-BRAUM, M., KINANI, J. F., MUDAKIKWA, A., NYIRAKARAGIRE, E., BUSSETTI, A. V., SAVJI, N., HUTCHISON, S., EGHOLM, M., LIPKIN, W. I. Human Metapneumovirus Infection in Wild Mountain Gorillas, Rwanda. **Emerging Infectious Diseases**. 17(4):711-713, 2011.

PELLETIER, G.; DÉRY, P.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Respiratory Tract Reinfections by the New Human Metapneumovirus in an Immunocompromised Child. **Emerging Infectious Diseases**. 08(09): 976-78, 2002.

PERET, T.C.T., ABED, Y., ANDERSON, L.J., ERDMAN, D.D., BOIVIN, G. Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein. **Journal of General Virology**. 85:679-686, 2004.

PILGER, D. A., CANTARELLI, V. V., AMANTEA, S. L., LEISTNER-SEGAL, S. Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 106(1):56-60, 2011.

PRESTI, A. L., CAMMAROTA, M., APOSTOLI, P., CELLA, E., FIORENTINI, S., BABAKIR-MINA, M., CIOTTI, M., CICCOCCHI, M. Genetic Variability and Circulation Pattern of Human Metapneumovirus Isolated in Italy Over Five Epidemic Seasons. **NEW MICROBIOLOGICA**. 34:337-344, 2011.

REGEV, L.; MENINGHER, T.; HINDIYEH, M.; MENDELSON, E.; MANDELBOIN, M. Increase Human Metapneumovirus Mediated Morbidity following Pandemic Influenza Infection. **PLoS ONE**. 7:1-6, 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 74:12, 1977.

SANTOS, M.C. **Caracterização molecular de cepas do vírus respiratório sincicial isoladas de casos de infecção respiratória aguda na cidade de Belém, Pará, Brasil entre os anos de 2000 a 2006**. Dissertação de Mestrado. Belém, Pará, Brasil. 89 pag. 2006.

SCHAPPERT, S.M.; BURT, C.W. Ambulatory care visits to physician offices, hospital outpatient departments, and emergency departments: United States, 2001-02. **Vital and Health Statistics**. 13:1-66, 2006.

SEMPLE, M.G.; COWELL, A.; DOVE, W.; GREENSIL, J.; MACNAMAR, P.S.; HALFHIDE, C.; SHEARS, P.; SMITH, R.L.; HART, C.A. Dual Infection of Infants by Human Metapneumovirus and Human Respiratory Syncytial Virus Is Strongly Associated with Severe Bronchiolitis. **Journal Infectious Disease**. 191:382–6, 2005.

SILVA, A.K; SANTOS, M.C; MELLO, W.A; MEDEIROS, R. Ocorrência de Bocavirus Humano associado às infecções respiratórias agudas em crianças de 0 a 2 anos de idade na cidade de Belém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 1, p. 87-92, 2009.

SLOOTS, T. P., MACKAY, I. M., BIALASIEWICZ, S., JACOB, K. C., McQUEEN, E., HARNETT, G. B., SIEBERT, D. J., MASTERS, I. B., YOUNG, P. R., NISSEN, M. D. Human Metapneumovirus, Australia, 2001–2004. **Emerging Infectious Diseases**. 12(8):1263:1266, 2006.

STOCKTON, J., STEPHENSON, I., FLEMING, D., ZAMBON, M. Human Metapneumovirus as a Cause of Community-Acquired Respiratory Illness. **Emerging Infectious Diseases**. 8(9):897-901, 2002.

SUTMOLLER, F.; MAIA, P.R. Acute respiratory infections in children living in two low income communities of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 90:665-74, 1995.

THAMMAWAT, S.; SADLON, T.A.; HALLSWORTH, P.G.; GORDON, D.L.. Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection. **Journal of Virology**. 82:11767-11774, 2008.

THOMAZELLI, L. M.; VIEIRA, S.; LEAL, A. L.; SOUSA, T. S.; OLIVEIRA, D. B. L.; GOLONO, M. A.; GILLIO, A. E.; STWIEN, E. K.; ERDMAN, D. D.; DURIGON, E. L. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. **Jornal de Pediatria**. 83(5): 422-428, 2007.

TREGONING, J.S. ; SCHWARZE, J. Respiratory Viral Infections in Infants: Causes, Clinical Symptoms, Virology, and Immunology. **Clinical Microbiology Reviews**. 23 : 71-98, 2010.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; DE JONG, J. C.; GROEN, J.; KUIKEN, T.; DE GROOT, R.; FOUCHIER, R. A. et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nature Medicine**. 7:719–24, 2001.

_____ ; BESTEBROER, T.M.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; FOUCHIER, R.A.M. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. **Virology**. 295:119–32, 2002.

VIAZOV, S.; RATJEN, F.; SCHEIDHAUER, R.; FIEDLER, M.; ROGGENDORF, M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. **Journal Clinical Microbiology**. 41, 3043–3045, 2003.

VICENTE, D.; CILLA, G.; MONTES, M.; PEREZ-TRALLERO, E. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. **Emerging Infectious Disease**. 9:602–3, 2003.

WALLIA, B.N.S.; GAMBHIR, S.K.; SINGHI, S.; SROA, S.R. Socio-economic and correlates of acute respiratory infections in preschool children. **Indian Pediatrics**. 25:607-11, 1988.

WALSH, E.E.; PETERSON, D.R.; FALSEY, A.R. Human metapneumovirus infections in adults: Another piece of the puzzle. **Archives of Internal Medicine**.168:2489–2496, 2008.

WHO. A programme for controlling acute respiratory infections in children: Memorandum from a WHO Meeting. **Bulletin of the World Health Organization**. 62 (1): 47-58, 1984.

WHO & PAHO. **The world health report 2005 - make every mother and child count**. Disponível em http://www.who.int/whr/2005/annex/annexes3-4_en.pdf. Acessado em 16 de novembro de 2010.

WILLIAMS, J. V.; HARRIS, P. A.; TOLLEFSON, S. J.; HALBURNT-RUSH, L. L.; PINGSTERHAUS, J. M.; EDWARDS, K. M.; WRIGHT, P. F.; CROWE, J. E, JR. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. **New England Journal Medical**. 350, 443–450, 2004.

ZAKI, M. E. S., RAAFAT, D., EL-METAAL, A. A., ISMAIL, M. Study of Human Metapneumovirus-Associated Lower Respiratory Tract Infections in Egyptian Adults. **Microbiol Immunol**. 53:603-608, 2009.