



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

**ALLAN KAIO SILVA**

**OCORRÊNCIA DO METAPNEUMOVÍRUS HUMANO NAS INFECÇÕES  
RESPIRATÓRIAS AGUDA EM ESTADOS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

**BELÉM**

**2012**

**ALLAN KAIO SILVA**

**OCORRÊNCIA DO METAPNEUMOVÍRUS HUMANO NAS INFECÇÕES  
RESPIRATÓRIAS AGUDA EM ESTADOS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical  
da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau  
de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rita Catarina Medeiros Sousa

Co-Orientador: Dr. Wyller Alencar de Mello

**BELÉM**

**2012**

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

---

Silva, Allan Kaio.

Ocorrência do metapneumovírus humano nas infecções respiratórias agudas em estados da região nordeste do Brasil / Allan Kaio Silva; 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. Aparelho respiratório – Doenças – Brasil, nordeste. 2. Infecções respiratórias – Brasil, nordeste. 2. Metapneumovirus humano.. I. Sousa, Rita Catarina Medeiros, orient. II. Mello, Willer Alencar de, co-orient III. Título.

CDD: 22. ed. 616.2



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

**ALLAN KAIO SILVA**

**OCORRÊNCIA DO METAPNEUMOVÍRUS HUMANO NAS INFECÇÕES  
RESPIRATÓRIAS AGUDA EM ESTADOS DA REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA.

Aprovada em:  
Conceito:

**Banca Examinadora**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Catarina Medeiros Souza  
*Orientadora - NMT/UFPA*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maisa Silva de Sousa  
*Membro – NMT/UFPA*

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas  
*Membro – NMT/IEC*

---

Dr. Rodrigo Vellasco Duarte Silvestre  
*Membro – IEC*

Dedico este trabalho a todos os pacientes que, indiretamente, contribuem para com a ciência e são parte de todo conhecimento até hoje existente das patologias que afetam a sociedade.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a N<sup>a</sup>. Sr<sup>a</sup>. de Nazaré, por sempre clarear meus caminhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CNPq-Capes pelo incentivo financeiro.

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa de sua diretora Elisabeth Santos e a Seção de Virologia no nome do Dr. Alexandre Linhares.

Ao Núcleo de Medicina Tropical – UFPA por disponibilidade de profissionais, mestres e espaço.

A minha orientadora, Dra. Rita Medeiros, por instigar meus conhecimentos e estar sempre serena, clareando minha mente nas dificuldades e dúvidas enfrentadas nesta saga.

Ao Dr. Wyller Mello, pessoa esta que considero responsável pelo meu crescimento científico.

Aos meus amigos Milla, James e Luis, meus diversos braços e mentes em prol aos resultados.

A Dra. Maisa Sousa, professora e amiga que muito colaborou para os dados deste trabalho.

A todos do Laboratório de Vírus Respiratório Pacheco, Akim, Edna, Kamilla, Jessylene, Alvino, Luana e Rodrigo pelo apoio sempre.

A meus pais, meu irmão e a Lourdes Gomes, pessoas influentes em minha índole, e que sempre me deram forças nos mais diversos momentos.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos impedem de caminhar.  
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** Classificação taxonômica da família *Paramyxoviridae*..... Pag.21
- FIGURA 2.** Representação esquemática do mapa genômico de HMPV, mostrando a ordem dos genes e, de forma ampliada, a sobreposição existente no gene M2 com as matrizes de leitura M2-1 e M2-2..... Pág. 22
- FIGURA 3.** Representação esquemática da partícula viral do HMPV mostrando as principais estruturas e proteínas virais..... Pag. 24
- FIGURA 4.** Representação esquemática mostrando as principais etapas do ciclo replicativo do *Metapneumovirus Humano*; entrada do vírus na célula, replicação e transcrição viral..... Pag. 27
- FIGURA 5.** Desenho ilustrativo da coleta de aspirado da nasofaringe..... Pag. 37
- FIGURA 6.** Desenho ilustrativo da coleta dos *swabs* nasal e da orofaringe..... Pag. 38
- FIGURA 7.** Percentual de positividade para HMPV encontrado em cada Estado da região Nordeste..... Pag. 43
- FIGURA 8.** Distribuição dos pacientes investigados por sexo e Etado de origem..... Pag. 44
- FIGURA 9.** Distribuição pontual das idades por Estado e na Região Nordeste e em cada Estado..... Pag. 45
- FIGURA 10.** Fluxograma descritivo das amostras do estudo..... Pag. 46
- FIGURA 11.** Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado do Maranhão..... Pag. 47
- FIGURA 12.** Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado do Ceará..... Pag. 48

<b>FIGURA 13.</b> Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado da Paraíba.....	Pag. 48
<b>FIGURA 14.</b> Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado do Rio Grande do Norte.....	Pag. 49
<b>FIGURA 15.</b> Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado de Pernambuco.....	Pag. 49

## LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1.** Seleção das amostras de casos de IRA a partir de amostragem estratificada..... Pag. 36
- QUADRO 2.** Oligonucleotídeos iniciadores e sonda utilizadas na reação qRT-PCR para o diagnóstico viral do HMPV..... Pag. 40
- QUADRO 3.** Reagentes e quantidades utilizadas para o teste de qRT-PCR..... Pag. 40
- QUADRO 4.** Condições para amplificação do gene F de HMPV pela técnica do qRT-PCR..... Pag. 41

## LISTA DE ABREVEATURAS

aa – Aminoácido

AdV – Adenovírus

ANF – Aspirado nasofaringe

APV – *Pneumovirus Aviario*

APV-C – *Pneumovirus Aviario C*

CE – Ceará

CEF – células embrionadas de galinha

Células tMK – Células terciárias de fígado de macaco

CEP-IEC – Comitê de Ética e Pesquisa do IEC

CONEP – Conselho Nacional de Ética e Pesquisa

cRNA – RNA complementar

DNase – enzima que degrada DNA

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Flu A – Vírus *influenza* tipo A

Flu B – Vírus *influenza* tipo B

GAG – Glicosaminoglicano

HBoV – *Bocavirus Humano*

HCoV – *Coronavirus Humano*

HMPV – *Metapneumovirus Humano*

HPIV – *Virus Parainfluenza Humano*

HRV – *Rinovirus Humano*

HVRS – *Virus Respiratorio Sincicial Humano*

IC – Intervalo de confiança

IEC – Instituto Evandro Chagas

IRA – Infecção Respiratória Aguda

ITRI – Infecção do Trato Respiratório Inferior

ITRS – Infecção do Trato Respiratório Superior

LVR – Laboratório de Vírus Respiratórios

MA – Maranhão

MDCK – Células de fígado canino

mRNA – RNA mensageiro

MS – Ministério da Saúde

NE – Nordeste

ORF – *Open Read Frame* (Leitura de fase aberta)

PB – Paraíba

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PE – Pernambuco

qRT-PCR – PCR em tempo real

RAP-PCR – *RNA arbitrarily primed PCR*

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso

RN – Rio Grande do Norte

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAse – enzima que degrada RNA

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – PCR precedida de Transcrição Reversa

SC – *swab* combinado

SIVEP-Gripe – Sistema Nacional de Vigilância da Gripe

SRAG – Síndrome Respiratória Aguda Grave

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

vRNA – RNA viral

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	15
<b>ABSTRACT</b> .....	16
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	19
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
3.1 HISTÓRICO .....	20
3.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	21
3.3 ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL .....	23
<b>3.3.1 Morfologia e genoma do vírus</b> .....	23
<b>3.3.2 Estrutura protéica</b> .....	23
3.4 CICLO REPLICATIVO .....	26
3.5 ASPECTOS CLÍNICOS .....	28
3.6 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	29
3.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	31
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	33
4.1 OBJETIVO GERAL: .....	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	34
5.1. MATERIAL.....	34
<b>5.1.1. Tipo do estudo</b> .....	34
<b>5.1.2. Aspectos éticos</b> .....	34
<b>5.1.3. População de estudo</b> .....	35
<b>5.1.4. Espécimes clínicos</b> .....	35
<b>5.1.5. Critérios de inclusão</b> .....	36
<b>5.1.6. Critério de Exclusão</b> .....	37
<b>5.2.1. Coleta de espécimes clínicos</b> .....	37

5.2.2.	Tratamento das amostras .....	38
5.2.3.	Detecção genética do HMPV .....	39
5.2.4.	Análise estatística.....	42
6.	RESULTADOS.....	43
7.	DISCUSSÃO .....	50
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
	REFERENCIAS .....	55
	ANEXO A.....	64
	ANEXO B (Adaptado) .....	65

## RESUMO

As doenças do trato respiratório são responsáveis por uma significativa taxa de absentismo laboral bem como por elevados índices de morbidade e morte, entre as quais as infecções respiratórias aguda (IRA) representam as maiores queixas nos serviços de atendimento médico-ambulatorial em todo o mundo. Os vírus são considerados os principais agentes etiológicos das IRA, atuando seja como patógeno principal ou predispondo às infecções bacterianas secundárias, entre eles encontra-se o *Metapneumovirus Humano* (HMPV). Este vírus foi identificado em 2001 apresentando-se como um importante agente causador de IRA adquirida na comunidade. É um vírus cosmopolita que causa doenças respiratórias semelhantes ao *Vírus Respiratório Sincicial*. No Brasil, são relativamente escassos os relatos da ocorrência do HMPV na população. O objetivo deste estudo é investigar a ocorrência de *Metapneumovirus Humano* (HMPV) em pacientes com diagnóstico clínico de infecção respiratória aguda (IRA) na Região Nordeste do Brasil. Entre o período de Junho de 2009 a Setembro de 2010, pacientes oriundos de atendimentos em unidades de atenção básica ou hospitalar de cinco estados da Região Nordeste, foram submetidos a coleta de espécimes para detecção a partir de técnicas de biologia molecular. Análises estatísticas foram utilizadas para escolha do tamanho amostral (545) e tratamento dos resultados obtidos. O estudo mostrou uma positividade de 4.7% para HMPV, sem a existência de uma faixa etária específica para a ocorrência da infecção. Ocorreu uma prevalência do sexo feminino entre os casos positivos, entretanto, sem significado estatístico. O pico de positividade para o vírus (n=16) mostrou existir no terceiro trimestre do ano em todos os Estados investigados. Neste estudo, foi possível descrever a ocorrência de HMPV na Região Nordeste, afetando pacientes portadores de infecção respiratória aguda, tanto acompanhados ambulatorialmente como hospitalizados, que preencheram critério clínico para Síndrome Respiratória Aguda Grave.

**PALAVRAS CHAVE:** *Metapneumovirus Humano*, Infecções Respiratórias Aguda, Nordeste.

## ABSTRACT

The respiratory tract illnesses are responsible by a significant rate of laborer absenteeism as well like by elevated indices of morbidity and death, between which the acute respiratory infections (ARI) represent the bigger complaints in the medical-ambulatory service in world. The viruses are considered the main etiologic agents of ARI, acting is like main pathogen or prepossess the secondary bacterial infections, among them finds the *Human Metapneumovirus* (HMPV). This virus was identified in 2001 presenting as an important causal agent of ARI acquired in the community. It is a cosmopolitan virus that causes similar respiratory illnesses to the Respiratory Syncytial Virus. In Brazil, reports are relatively scarce about the occurrence of the HMPV in the population. The objective of this study is to investigate the occurrence of *Human Metapneumovirus* (HMPV) in patients with clinical diagnosis of acute respiratory infection (ARI) in the Northeast Region of Brazil. Between the period of June 2009 to September 2010, patients from basic attention unit or hospital units services of five states of Northeast Region, were submitted the collection of specimens for detection from techniques of molecular biology. Statistical analyses were utilized for sample choice (545) and handling of the results obtained. The study showed a positivity of 4,7% for HMPV, without the existence of a specific age group for the occurrence of infection. A predominance of the female sex between the positive cases occurred, however, without statistical meaning. The peak of positivity for the virus (n=16) happen in the third quarter of the year in all States investigated. In this study, was possible describe the occurrence of HMPV in the Northeast Region, affecting patients with acute respiratory infection like accompanied in basic attention as hospitalized, that filled clinical criterion for Severe Acute Respiratory Syndrome.

**KEYWORDS:** *Human Metapneumovirus*, Acute Respiratory Infection, Northeast.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças do trato respiratório são responsáveis por uma significativa taxa de absenteísmo laboral causando custos diretos e indiretos a assistência a saúde, bem como por elevados índices de morbidade e mortalidade entre crianças menores de cinco anos de idade, indivíduos imunocomprometidos e idosos (MONTO & SULLIVAN, 1993; CAMPBELL, 1995; HINMAN, 1998; STOCKTON *et al.*, 2002; FF *et al.*, 2004; GIRARD *et al.*, 2005; GILLIM-ROSS & SUBBARAO, 2006; BOIVIN *et al.*, 2007).

Estas infecções são causadas por diversos agentes etiológicos descritos e, certamente, alguns ainda não laboratorialmente identificados (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001; ALTO, 2004; LOUIE *et al.*, 2005; TSUCHIYA *et al.*, 2005). Entre essas doenças, as Infecções Respiratórias Agudas (IRA) representam um importante problema de saúde pública, sendo uma das principais queixas nos serviços de atendimento médico-ambulatorial em todo o mundo (CAMPBELL, 1995).

Os vírus são considerados os principais agentes etiológicos das IRA, atuando seja como patógeno principal ou predispondo às infecções bacterianas secundárias, dentre os quais se destacam os vírus *Influenza A e B* (Flu A e Flu B), *Parainfluenza 1, 2 e 3* (HPIV), *Adenovirus* (AdV), *Virus Respiratório Sincicial* (HVRs), *Rinovirus* (HRV), *Coronavirus* (HCoV), *Bocavirus* (HBoV) e o *Metapneumovirus Humano* (HMPV) (BERMAN *et al.*, 1983; BERMAN, 1991; MONTO, 1995; FALSEY *et al.*, 2003; GILLIM-ROSS & SUBBARAO, 2006; BOIVIN *et al.*, 2007).

As IRA's causadas por vírus têm maior impacto na morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento, atingindo taxas até 30 vezes superiores ao observado em países desenvolvidos (MARKOWITZ & NIEBURG, 1991). No Brasil, a maioria dos estudos realizados nesta área, tem como cenário as regiões Sudeste e Sul envolvendo prioritariamente, crianças menores de cinco anos de idade. Dados relativos à ocorrência em outras regiões brasileiras ou estudos contemplando diferentes faixas etárias ainda são escassos (MOURA *et al.*, 2003).

A transmissão dos vírus respiratórios geralmente ocorre pelo contato próximo com indivíduos infectados que durante a fala, tosse ou espirro eliminam as partículas virais (FALSEY & WALSH, 2006). É comum também a veiculação do vírus através do contato com objetos contaminados com secreções respiratórias do paciente, tais como estetoscópios, aparelhos telefônicos, maçanetas, teclados ou similares, e vestuário.

Devido os mecanismos de mutação genética e a facilidade de transmissão dos vírus, surtos de etiologia viral causadas por IRA são frequentemente descritos e, quando não controlados adequadamente, podem desencadear epidemias ou mesmo pandemias, a exemplo da Gripe Espanhola em 1918, ou mais recentemente, no ano de 2009, a gripe ocasionada pelo vírus *Influenza A (H1N1)* pandêmico que afetou diversos países (PEREZ, 2009; AL HAJJAR & MCINTOSH, 2010).

No Brasil, o perfil de circulação de alguns vírus respiratórios, como a influenza e o HVRS, já são conhecidos propiciando a adoção de medidas preventivas ao seu controle como o ocorrido nesta última pandemia gerada pelo vírus *Influenza A (H1N1)* no qual em um curto período de tempo, foi possível criar uma vacina para prevenção de novos casos.

Entretanto, a investigação de outros agentes virais como o HMPV, ainda são limitados, geralmente envolvendo apenas pacientes pediátricos e/ou hospitalizados (CUEVAS *et al.*, 2003; THOMAZELLI *et al.*, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Neste contexto, dados epidemiológicos mais representativos da circulação do HMPV na população brasileira se fazem necessários.

## 2. JUSTIFICATIVA

O Metapneumovírus Humano vem sendo frequentemente considerado um dos principais agentes virais ocasionadores de IRA em diversos países (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001; FREYMOUTH *et al.*, 2003; VIAZOV *et al.*, 2003; WILLIAMS *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2006; ARABPOUR *et al.*, 2008).

O HMPV já foi detectado e descrito em algumas localidades no Brasil, entretanto, a exceção do estudo de Cuevas *et al.*, (2003) e Bezerra *et al.*, (2011), todos foram realizados em regiões com padrão climatológico (umidade do ar, nível de precipitação pluviométrica e temperatura) diferente do existente nas regiões Norte e Nordeste do País (THOMAZELLI *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; DEBUR *et al.*, 2010).

Assim sendo, é imperativo a realização de estudos que avaliem a ocorrência do HMPV em pacientes de diferentes faixas etárias, com sintomatologia de IRA, atendidos a nível ambulatorial e hospitalar na região Nordeste, do País.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 HISTÓRICO

No ano de 2001 foi identificado na Holanda um paramixovírus em espécimes da nasofaringe obtidos no inverno de 1981 e estocados em laboratório. As amostras clínicas pertenciam a 28 crianças menores de cinco anos de idade com diagnóstico de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) caracterizada por tosse, bronquiolite e pneumonia (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Os vírus foram isolados em cultivo celular e apresentavam um crescimento fastidioso gerando efeito citopatogênico muito semelhante ao produzido pelo HVRs, com ausência de atividade hemaglutinante. O vírus foi detectado através de microscopia eletrônica de contraste e após análise, este apresentou a existência de semelhança genética e antigênica com os paramyxovírus (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Ainda partindo do sobrenadante da cultura do vírus, em células tMK, foi realizada, usando oligonucleotídeos randômicos, a RAP-PCR (*RNA arbitrarily primed PCR* - técnica de biologia molecular que consiste em obter diversos fragmentos genéticos aleatórios) - obtendo 20 fragmentos sendo 10 destes com forte semelhança ao *Pneumovirus Aviário* (APV) (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

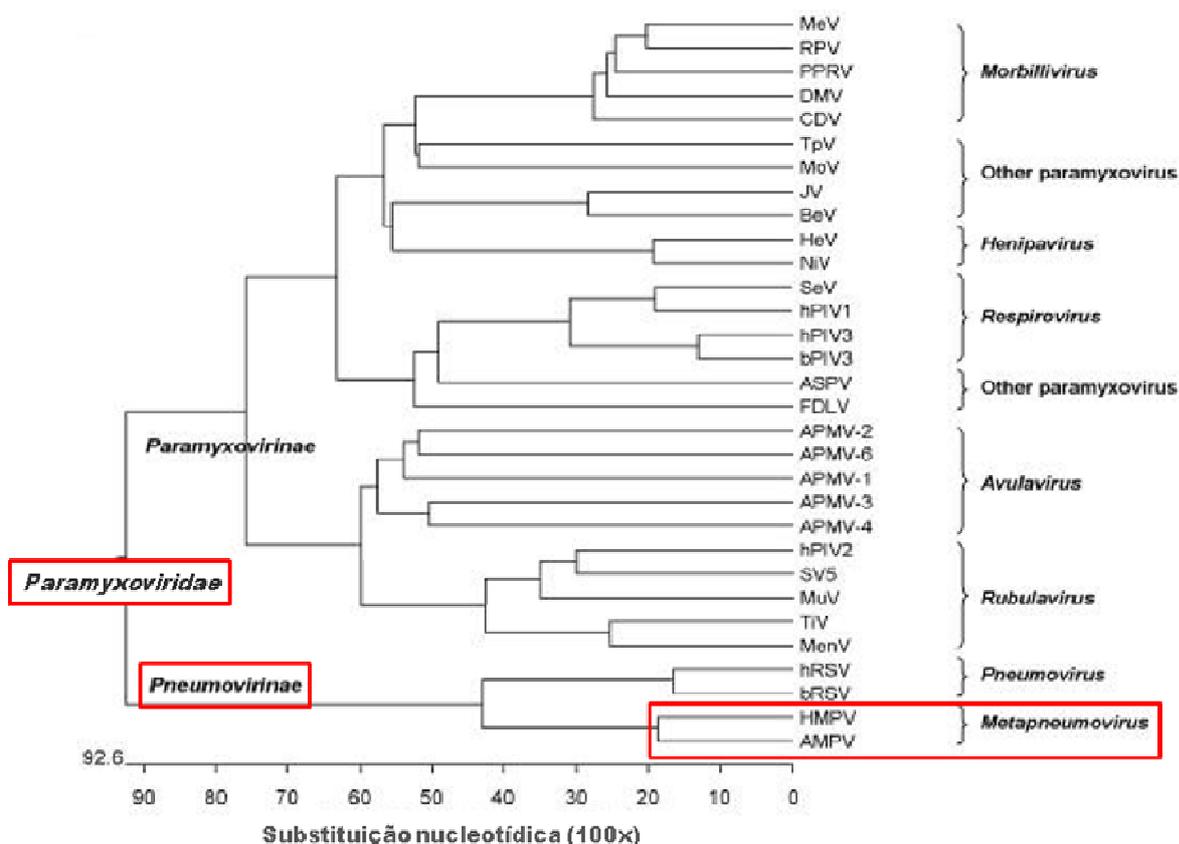
Os fragmentos obtidos na RAP-PCR permitiram sua utilização no desenho de oligonucleotídeos específicos que foram testados em outra reação objetivando gerar seqüências genéticas parciais do novo vírus. A análise destas seqüências revelou uma alta identidade genética com o APV sugerindo que o vírus encontrado era distinto do HVRs, portanto classificado em outro gênero (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001).

Posteriormente, estudo conduzido por De Graaf *et al.* (2008) demonstrou que o HMPV provavelmente teve origem a partir de pássaros há cerca de 200 anos e seu ancestral comum seria o *Pneumovirus Aviário tipo C* (APV-C).

### 3.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

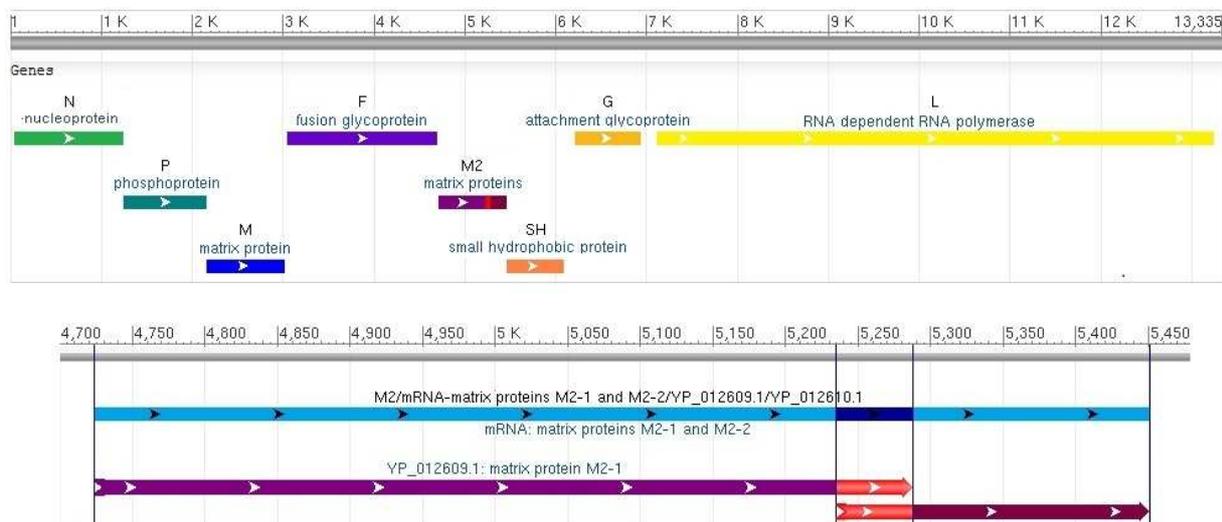
A classificação da família *Paramyxoviridae* em duas subfamílias (*Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*), onde se encontram diversos vírus associados á IRA em humanos, baseia-se na organização genética dos vírus nela incluídos (LING *et al.*, 1992; YU *et al.*, 1992; RANDHAWA *et al.*, 1997).

Segundo a ordem em que se encontram seus genes (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') e devido a ausência das proteínas não estruturais NS1 e NS2, o HMPV encontra-se como membro da subfamília *Pneumovirinae*, classificado no gênero *Metapneumovirus* como mostra a Figura 1 e 2 (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001; BIACCHESI *et al.*, 2003).



**FIGURA 1.** Classificação taxonômica da família *Paramyxoviridae*.

O genoma do HMPV é constituído por oito genes porem existindo nove fases de leitura abertas (ORF – *open read frame*) devido a existência de duas fases de leitura (M2-1 e M2-2) no gene M2 (Figura 2) (BUCHHOLZ *et al.*, 2005).



**FIGURA 2.** Representação esquemática do mapa genômico de HMPV, mostrando a ordem dos genes e, de forma ampliada, a sobreposição existente no gene M2 com as matrizes de leitura M2-1 e M2-2. Fonte: Adaptado de Kahn, J.S. 2006, em *Epidemiology of Human Metapneumovirus*.

Tendo por base as diferenças antigênicas das proteínas de superfície, o HMPV é classificado em duas linhagens genéticas denominadas como subtipos A e B, que por sua vez se subdividem em subgrupos A1/A2a, A2b e B1/B2, respectivamente (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002; BIACCHESI *et al.*, 2003; GRAY *et al.*, 2006; HUCK *et al.*, 2006).

### 3.3 ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL

#### 3.3.1 Morfologia e genoma do vírus

O HMPV é constituído por uma partícula pleomórfica, com diâmetro aproximado de 120 nm, quando em forma esférica. O vírus se apresenta envelopado com uma dupla camada lipídica originada da membrana plasmática da célula hospedeira (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001; BIACCHESSI *et al.*, 2003).

O genoma viral é constituído por uma molécula de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples, não-segmentado (ordem *Mononegavirales*), de polaridade negativa, com tamanho aproximado de 13,3 Kb (MACKIE, 2003).

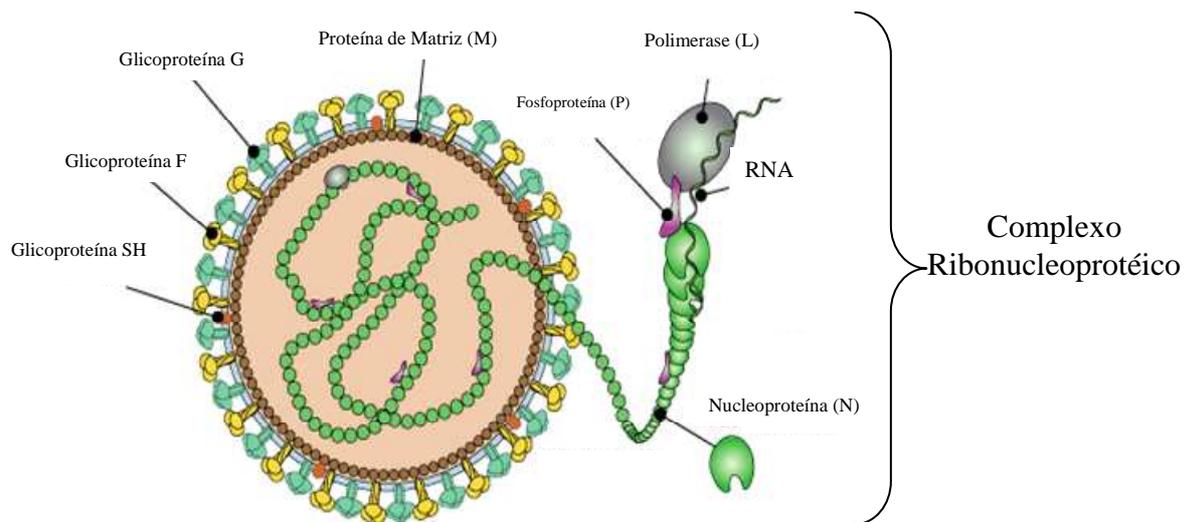
A análise das sequências nucleotídicas do vírus evidenciou a presença de uma região bem conservada (GGG ACA AnT nnn AAT G) em cada gene do HMPV que indicam o início do gene. Esta leitura também é bem caracterizada no início dos genes dos APV. Semelhante aos outros pneumovírus, as sequências intergênicas variam em tamanho (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESSI *et al.*, 2003).

O final de cada gene do HMPV é composto por um pentâmero altamente conservado seguido de uma pobre trinca de adeninas e timinas e finalizado por uma cauda poli-A de quatro a sete nucleotídeos (AGT TAn nnA AAA A) (BASTIEN *et al.*, 2003; BIACCHESSI *et al.*, 2003).

#### 3.3.2 Estrutura protéica

A partícula viral do HMPV é composta por oito segmentos genéticos, que codificam: as glicoproteínas F, G e SH do tipo transmembrana de superfície celular; a proteína de matriz (M), que se encontra na face interna do envelope viral; a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a

subunidade da polimerase (L) e o fator de alongação de transcrição (M2-1) participantes da formação do nucleocapsídeo ou complexo ribonucleoprotéico e a proteína regulatória (M2-2) totalizando nove proteínas estruturais (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002). A Figura 3 representa as principais estruturas.



**FIGURA 3:** Representação esquemática da partícula viral do HMPV mostrando as principais estruturas e proteínas virais. Fonte: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICT\\_1.048.2.htm](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICT_1.048.2.htm).

A proteína F é uma proteína de superfície transmembrana do tipo I, sintetizada inicialmente como um precursor F0, o qual é posteriormente clivado por proteases celulares, em duas subunidades (F1 e F2) (BASTIEN *et al.*, 2003; DE GRAAF, HERFST *et al.*, 2008). Na posição N-terminal da subunidade F1, ocorre a fusão hidrofóbica peptídica entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula do hospedeiro (COLLINS & CROWE Jr., 2007; HERFST *et al.*, 2008).

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 baixo faz com que a proteína de fusão do HMPV promova o contato envelope viral-célula proporcionando a entrada do vírus e aumentando a infectividade viral (DE GRAAF, HERFST *et al.*, 2008).

A proteína F é a mais conservada da partícula viral, chegando a ter uma homologia genética de até 95% entre os grupos A e B existentes para o HMPV. Estruturalmente, este monômero da proteína F possui uma forma característica pregueada devido aos resíduos de cisteína conservados, em locais específicos de todos os representantes dos subgrupos virais do HMPV (DE GRAAF, HERFST *et al.*, 2008; AGRAWAL *et al.*, 2011).

A proteína G, por sua vez, é altamente variável com apenas 56% de homologia na sequência aminoacídica (aa) entre os grupos. A maior variabilidade se concentra no domínio extracelular a partir de substituições e inserções de nucleotídeos. A região intracelular e transmembrana mostram-se bem conservadas (AGRAWAL *et al.*, 2011).

A proteína G, proveniente do gene G, é uma proteína de superfície do tipo II possuindo um domínio citoplasmático amino-terminal hidrofílico, uma forte região hidrofóbica contendo de 40 a 51 aa e um domínio carboxi-terminal hidrofóbico de tamanho variável (GOVINDARAJAN & SAMAL, 2004; PERET *et al.*, 2004). Esta proteína ainda não está bem descrita na literatura supondo-se apenas que parece ser a responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira através dos glicosaminoglicanos (GAG's) (COLLINS & CROWE Jr., 2007).

A proteína SH é uma glicoproteína do tipo II que é inserida na membrana plasmática por uma sequência de ancoragem hidrofóbica localizada perto da região citoplasmática amino-terminal e a região extracelular na carboxi-terminal. Ela auxilia a proteína F durante a fusão do envelope viral com a membrana das células hospedeiras, formando assim a tríade protéica responsável pela penetração do vírus nas células (BAO *et al.*, 2008; THAMMAWAT *et al.*, 2008).

No HMPV, a proteína F parece ser o antígeno que induz a maior resposta imunológica de neutralização e proteção quando expressa em vetores roedores ou primatas não-humanos. Quando expressas individualmente, as proteínas G ou SH mostram-se pouco eficazes em induzir proteção e imunogenicidade em modelos animais (MACPHAIL *et al.*, 2004; COLLINS & CROWE Jr., 2007).

A proteína M é uma proteína não glicosilada, e deposita-se na membrana plasmática da célula. Ela possui as funções de interagir com a proteína F e outros fatores durante a morfogênese da partícula viral além de controlar a transcriptase do nucleocapsídeo (TAKIMOTO & PORTNER, 2004; COLLINS & CROWE Jr., 2007). Uma pequena região

localizada na porção N-terminal da proteína formada é conservada em todas as proteínas M dos pneumovírus, porém sua significância biológica ainda não foi descrita (BASTIEN *et al.*, 2003).

A proteína N do HMPV é similar em tamanho ao de outros pneumovírus (391-394 aa) e relativamente menor quando comparada aos outros membros da família *Paramyxoviridae* (489-583 aa). A proteína P mostra-se com elevado nível de divergência nucleotídica quando comparada aos outros pneumovírus. Estas proteínas, juntas, mostram interagir entre si formando complexos protéicos responsáveis por inclusões citoplasmáticas em células não infectadas (BASTIEN *et al.*, 2003; DERDOWSKI *et al.*, 2008).

A proteína N traduzida a partir do gene de mesmo nome tem por função principal deixar o nucleocapsídeo resistente. A proteína P que é aproximadamente 80% fosforilada e é responsável pela estabilidade na replicação. O gene L constitui o maior gene do HMPV. Ele é o gene de polimerase e possui uma proteção contra possíveis mutações (BASTIEN *et al.*, 2003; COLLINS & CROWE JR., 2007).

O gene M2 possui duas *Open Read Frame* - Leitura de fase aberta (ORF's) sobrepostas, a M2-1 e a M2-2. Estas regiões de leitura aberta são independentes uma da outra e mostram ser completamente dispensáveis quanto à eficiência de replicação *in vitro*, porém suas ausências *in vivo* atenuam o vírus (BUCHHOLZ *et al.*, 2005).

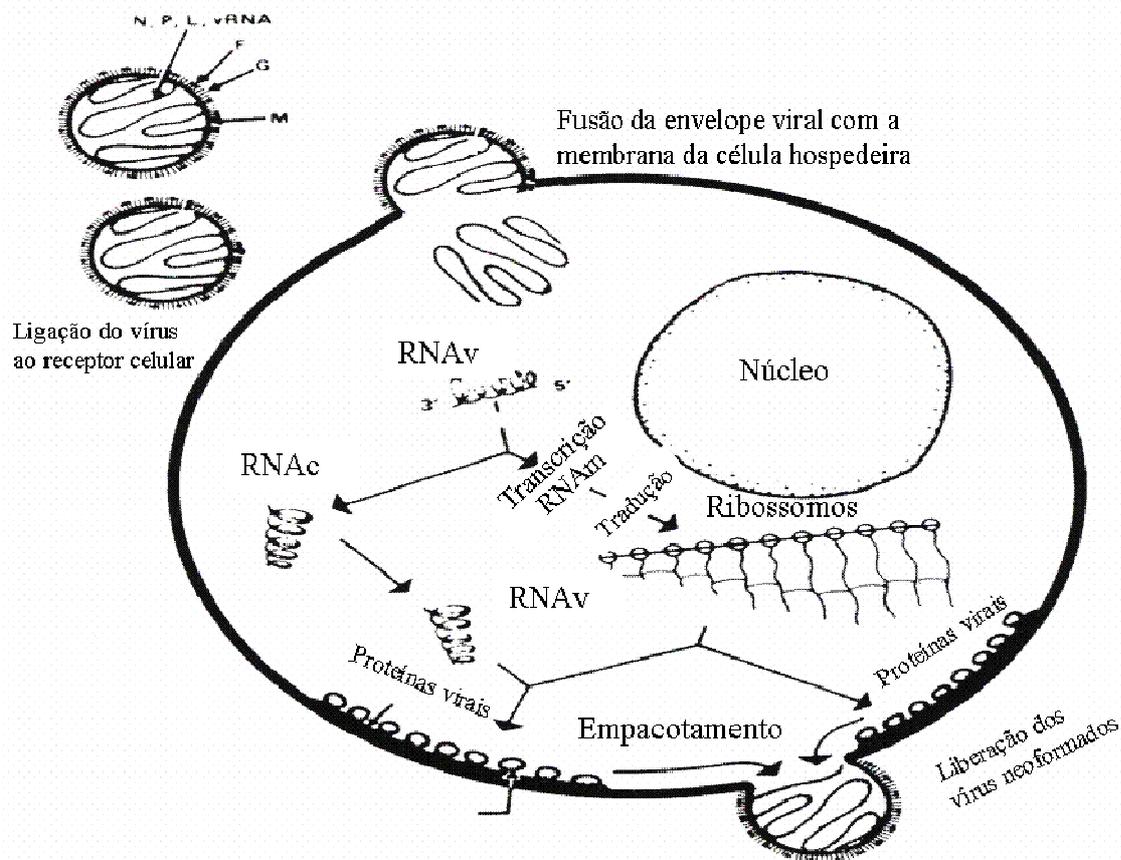
### 3.4 CICLO REPLICATIVO

Todos os eventos no ciclo replicativo do HMPV ocorrem ao nível do citoplasma da célula hospedeira, aonde, após a adsorção do envelope viral à superfície da membrana plasmática, através da ligação da proteína G aos GAG's, ocorre a fusão mediada pela proteína F e o nucleocapsídeo é liberado (COLLINS & CROWE Jr., 2007; THAMMAWAT *et al.*, 2008).

No citoplasma da célula hospedeira, o RNA viral (vRNA) pode tomar dois caminhos. Em um, ele é transcrito em RNA mensageiro (mRNA) traduzido no retículo endoplasmático rugoso (RER) junto aos ribossomos formando novas proteínas virais que dará origem aos futuros envelopes virais. No outro caminho, o vRNA dá origem a partículas de RNA

complementar (cRNA) que são transformados em novas partículas virais pela polimerase (L) antes de ser englobado pelas proteínas de superfície viral (COLLINS & CROWE Jr., 2007).

Todo o processo do ciclo replicativo acima descrito, está representado a seguir na Figura 4.



**FIGURA 4:** 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.

Durante a infecção, são formadas 10 moléculas de mRNA a partir da transcrição do vRNA. Os mRNAs são poli-adenilados, e por meio de suas ORF's cada um codifica uma ou mais proteínas virais. A cinética da replicação do HMPV tem um pico de expressão protéica

intracelular ocorrendo por volta de 48 a 72 horas após a infecção (COLLINS & CROWE Jr., 2007).

O genoma é transcrito iniciando pela extremidade 3', de forma linear, seqüencial, tendo paradas e reinícios a cada gene. A transcrição é guiada por sinais de início e fim e são encontrados na extremidade de cada gene (LAMB & KOLAKOFSKY, 2001).

### 3.5 ASPECTOS CLÍNICOS

O período de incubação das infecções respiratórias causadas pelo HMPV varia de 2 a 6 dias após o contato inicial, e os sinais e sintomas apresentados são principalmente, tosse, rinorréia e febre. As complicações mais comumente observadas em crianças são bronquiolite, pneumonia, bronquite, e exacerbação asmática (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001; BOIVIN *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 2006).

As características clínicas da doença vão depender da porção do trato respiratório acometida pela infecção viral. O envolvimento do trato respiratório inferior é mais comum em neonatos e crianças jovens os quais podem apresentar taquipnéia, febre, tosse, hipóxia, e alterações de imagem em radiografias do tórax, tal como infiltrações ou hiperinsuflação pulmonar. (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001; FALSEY *et al.*, 2003).

Nos casos mais graves evidencia-se evolução para bronquites, bronquiólites e/ou pneumonia. A infecção do trato respiratório superior é acompanhada de coriza, conjuntivite, faringite, otite ou estomatite (MULLINS *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2004).

Em adultos o HMPV ocasiona mais frequentemente doença moderada caracterizada por tosse, dor de garganta, rinorréia, rouquidão e obstrução nasal, sendo a febre pouco relatada. Em pacientes idosos e em imunocomprometidos a infecção está relacionada à depleção do sistema imunológico (FALSEY *et al.*, 2003; FALSEY & WALSH, 2006).

Os quadros clínicos observados em crianças não são muito diferentes, porém nestes grupos observam-se frequentemente neutropenias, infiltrados pulmonares, exacerbação de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), adenocarcinomas de células traqueais e

pneumonia atípica, sendo os vírus, muitas vezes, determinantes para a morbidade destes indivíduos (FALSEY *et al.*, 2003; HAMELIN & BOIVIN, 2005; EVASHUK *et al.*, 2008; OMURA *et al.*, 2011).

### 3.6 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O HMPV é um importante agente causador de IRA adquirida na comunidade. Acomete recém-nascidos, crianças, adultos e idosos. Infecções graves podem ocorrer em menores de um ano de idade, doentes crônicos e imunosuprimidos (PERET *et al.*, 2002; STOCKTON *et al.*, 2002; FALSEY *et al.*, 2003; GILLIM-ROSS & SUBBARAO, 2006; BOIVIN *et al.*, 2007; THOMAZELLI *et al.*, 2007).

O HMPV é um vírus cosmopolita que causa doenças respiratórias semelhantes ao HVRS (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2001; NISSEN *et al.*, 2002; PERET *et al.*, 2002; CUEVAS *et al.*, 2003; PEIRIS *et al.*, 2003; FF *et al.*, 2004). Estudos comparativos entre a infectividade do HMPV em populações pediátricas mostram que as infecções no trato respiratório superior (ITRS) parecem ser menos agressivas que nas infecções do trato respiratório inferior (ITRI) (WILLIAMS *et al.*, 2006).

Estudos realizados com base clínica, demográfica, radiológica e genética sugerem que o HMPV ocasiona ITRI em recém nascidos com elevada frequência. Este estudo ainda mostrou que 75% de todas as infecções causadas por HMPV, no trato respiratório inferior, sucedem nos primeiros anos de vida e com maior ocorrência no final do inverno semelhante às enfermidades ocasionadas por HVRS (BOIVIN *et al.*, 2003; WILLIAMS *et al.*, 2004).

A doença por HMPV está associada a impactos clínicos e econômicos por ter uma média de hospitalização de aproximadamente sete dias (STOCKTON *et al.*, 2002; BOIVIN *et al.*, 2003). O período de incubação da infecção é de 5-6 dias segundo estudo realizado em Hong Kong em 2003. Na mesma investigação, baixas taxas de co-infecção foram encontradas (PEIRIS *et al.*, 2003). Outros relatos ainda enfatizam que, raramente este agente é encontrado em pacientes assintomáticos (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2003; WILLIAMS *et al.*, 2004).

Embora atualmente sejam descritos apenas cinco subgrupos distintos de HMPV (A1, A2a, A2b, B1 e B2), a existência de novos subgrupos não pode ser descartada (SCHILDGEN *et al.*, 2004; GRAY *et al.*, 2006; HUCK *et al.*, 2006). Este desconhecimento pode ter implicações no diagnóstico laboratorial suscitando maiores, investigações. A literatura também evidencia a circulação concomitante de mais de um subtipo de HMPV na população (GALIANO *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2006).

O nível de anticorpos neutralizantes para o HMPV em crianças aumenta de acordo com a idade, sugerindo desta forma que existe um reforço na resposta imune. Esta afirmação é consubstanciada com o estudo de Pelletier *et al.* (2002) demonstrando que crianças com idade acima de 5 anos possuem títulos de anticorpos maiores quando comparadas com crianças situadas na faixa etária de 1 a 2 anos. Neste contexto, se admite a ocorrência de re-infecção frequente, com subgrupos heterólogos (FALSEY *et al.*, 2003; BOIVIN *et al.*, 2007).

O percentual de detecção do HMPV em casos de IRA varia de 2,9% a 54,4% em diversos estudos conduzidos em todo o mundo (GRAY *et al.*, 2006; ARABPOUR *et al.*, 2008). No Brasil, estes percentuais variam de 2,4% a 17,8% (THOMAZELLI *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

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 (GALIANO *et al.*, 2004; LUCHSINGER *et al.*, 2005; MIRAZO *et al.*, 2005; GRAY *et al.*, 2006; ESCOBAR *et al.*, 2009; PIZZORNO *et al.*, 2010).

No Brasil, são relativamente escassos os relatos da ocorrência do HMPV na população. Na região Sudeste, Thomazelli *et al.* (2007) investigaram a presença do vírus em menores de cinco anos hospitalizados com IRA encontrando uma positividade de 17,8%. Estudos semelhantes foram realizados por Carneiro *et al.* (2009) e Oliveira *et al.* (2009) obtendo índices de positividade para o vírus situados em 12,3% e 11,4% respectivamente.

Na região Nordeste, Bezerra *et al.* (2011) encontrou evidencia de infecção por HMPV em pacientes menores de cinco anos de idade com atendimento primário e hospitalizados obtendo positividade de 10%. Em outro estudo da mesma região Cuevas *et al.* (2003) obteve positividade de 24,3% em amostras de crianças menores de três anos hospitalizadas.

Em estudo realizado por Ferreira *et al.* (2011), investigando a ocorrência do HMPV em menores de cinco anos com atendimento em unidades de atenção básica e hospitais de Belém foi relatado uma positividade de 16.7% (dados não publicados).

Nos diversos estudos gerados em todo o mundo, o HMPV tem revelado um comportamento sazonal característico com a ocorrência de epidemias esporádicas. Em regiões de clima temperado as infecções acontecem preponderantemente durante o inverno. Em países de clima tropical, a despeito das poucas investigações já realizadas, existem algumas evidências que apontam uma maior atividade do vírus entre os meses de setembro a dezembro (GALIANO *et al.*, 2004; THOMAZELLI *et al.*, 2007).

### 3.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Estudos sobre o impacto das viroses respiratórias são limitados pela dificuldade em distinguir o agente etiológico mediante o quadro clínico apresentado ou mesmo através do diagnóstico laboratorial. Além do mais, os estudos são focados geralmente nos patógenos virais mais comuns, assim, uma gama de agentes etiológicos continuam desconhecidos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

Apesar da acentuada sensibilidade de algumas técnicas laboratoriais de diagnóstico uma significativa proporção das viroses respiratórias adquiridas na comunidade deixam de ser diagnosticadas todos os anos (STOCKTON *et al.*, 2002; AGAPOV *et al.*, 2006). Para o HMPV o diagnóstico é realizado por diversas técnicas como ensaios sorológicos, isolamento viral e detecção de antígenos ou ácidos nucleicos.

Em cultura celular, o HMPV possui um crescimento lento e fastidioso (BOIVIN *et al.*, 2002; FALSEY *et al.*, 2003). Já foi testado em células de fígado de macaco (tMK), células Vero-E6, Vero-118, A549, QT6, QT35, de fígado canino (MDCK) e em células embrionárias de galinha (CEF) tendo desenvolvimento melhor suportado em células Vero-118, E6, Hep-2 e em células tMK onde mostra-se necessário suplementação com tripsina (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2002; MAO *et al.*, 2008; DE GRAAF *et al.*, 2009). Seu efeito citopático se dá entre 10-14 dias após a inoculação (AGAPOV *et al.*, 2006).

Em um estudo conduzido na Itália foi avaliado 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, 2008).

Os métodos mais sensíveis quando comparados a cultura celular e a sorologia que usualmente são utilizados para a detecção viral do HMPV são as técnicas de Biologia Molecular Reação em Cadeia mediada pela Polimerase antecedida por transcrição reversa (RT-PCR) a Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de retrotranscrição em Tempo Real (q-RT-PCR) e a nested PCR -Sistema de dupla amplificação de uma sequência genética- possuindo como referência os genes L, M, F e N para amplificação (COTE *et al.*, 2003; AGAPOV *et al.*, 2006; PABBARAJU *et al.*, 2007; KAIDA *et al.*, 2008).

Em estudo comparativo entre as técnicas de Biologia Molecular para detecção de HMPV realizado por Kaida *et al.* (2008), foi provado que a q-RT-PCR é mais sensível que a RT-PCR porém é menos sensível que a nested-PCR. Quando comparado a especificidade, as três técnicas mostraram resultados bons e equivalentes.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL:

Detectar e descrever a circulação do *Metapneumovirus Humano* (HMPV) em amostras colhidas nos estados da região Nordeste (NE) do Brasil, associados a casos de infecção respiratória aguda.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência das infecções por HMPV nos casos de IRA;
- Realizar o diagnóstico molecular das infecções por HMPV durante o período pandêmico ocasionado pelo vírus da influenza A (H1N1);
- Descrever epidemiologicamente a população em estudo;
- Determinar a influência de comorbidades nas hospitalizações.
- Determinar as diferenças de proporções entre os casos ambulatoriais e hospitalizados.
- Identificar a ocorrência de frequências associadas com as condições climáticas.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. MATERIAL**

#### **5.1.1. Tipo do estudo**

Este estudo caracterizou-se como analítico descritivo, observacional, de corte transversal com demanda ambulatorial e hospitalar. A pesquisa foi de caráter retrospectivo envolvendo a análise de amostras clínicas de pacientes, com sinais ou sintomas de IRA, preservadas no laboratório de vírus respiratórios do Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS).

#### **5.1.2. Aspectos éticos**

O projeto seguiu todas as orientações contidas na resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), o qual foi aprovado sob o número de registro 012/2011 pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas (CEP-IEC) sendo este um subprojeto da pesquisa intitulada “Caracterização Genética de Metapneumovírus Humano isolados em casos de Infecção Respiratória Aguda nas regiões Norte e Nordeste do Brasil” (Anexo A).

### 5.1.3. População de estudo

Foram considerados como população de estudo os pacientes com diagnóstico clínico de IRA selecionados pelo Sistema Nacional de Vigilância da Gripe (SIVEP-Gripe / MS) nos estados do Ceará (CE), Maranhão (MA), Paraíba (PB), Pernambuco (PE) e Rio Grande do Norte (RN) durante o período compreendido entre junho de 2009 a setembro de 2010.

O diagnóstico clínico de IRA era feito considerando as recomendações do Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância Epidemiológica da Influenza (Anexo B) no qual considera como caso suspeito de doença respiratória aguda grave indivíduo de qualquer idade com doença respiratória aguda caracterizada por febre elevada, acompanhada de tosse ou dor de garganta, acompanhado ou não de manifestações gastrointestinais, e dispnéia ou outro sinal de gravidade.

### 5.1.4. Espécimes clínicos

Amostras de aspirado da nasofaringe (ANF) ou *swab* combinado da narina/garganta (SC) foram obtidas de pacientes que apresentavam sinais e sintomas de IRA com até cinco dias de evolução durante o atendimento médico em cada Estado. Após a coleta, os espécimes foram encaminhados e conservados no Laboratório de Vírus Respiratórios (LVR) do Instituto Evandro Chagas (IEC) até o seu processamento.

O tamanho amostral do estudo foi calculado considerando o total de amostras encaminhadas ao IEC (n=576), margem de erro de 5% e Intervalo de Confiança (IC) de 99%. Na seleção das amostras foi utilizado o programa BioEstat 5.0, a partir de amostragem estratificada como demonstrado no Quadro 1 (AYRES et al., 2007).

**QUADRO 1.** Seleção das amostras de casos de IRA a partir de amostragem estratificada.

<b>Unidade Federativa</b>	<b>Nº de amostras da população</b>	<b>*IC 99%</b>
<b>Ceará</b>	167	<b>159</b>
<b>Rio Grande do Norte</b>	118	<b>112</b>
<b>Pernambuco</b>	107	<b>103</b>
<b>Maranhão</b>	106	<b>101</b>
<b>Paraíba</b>	78	<b>75</b>
<b>Total</b>	576	<b>545</b>

\*IC 99%.: Intervalo de confiança de 99%.

Como as amostras eram providas de coleta feita no período pandêmico ocasionado pelo vírus Influenza A/California/07/2009 (H1N1), nesse contexto, foi considerado como fatores de risco ou grupo de risco os mesmos descritos no Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância Epidemiológica da Influenza (Anexo B):

- a) Imunodepressão: indivíduos transplantados, com câncer, tratamento para síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA).
- b) Condições Crônicas: hemoglobinopatias, cardiopatias, pneumopatias, doenças renais crônicas doenças metabólicas ou obesidade mórbida.
- c) Grupo de risco: idade inferior a 2 ou superior a 60 anos; gestantes em qualquer idade gestacional.

### **5.1.5. Critérios de inclusão**

Amostras clínicas de pacientes pertencentes a ambos os gêneros e diferentes faixas etárias, atendidos a nível hospitalar ou ambulatorial com quadro clínico de IRA, que se define por indivíduo com febre superior a 38°C, acompanhado de um ou mais dos seguintes sintomas: Tosse, calafrios, dispnéia, dor de garganta ou mialgia. Com até cinco dias de evolução da doença, selecionados no período entre junho de 2009 a setembro de 2010 e negativos para outros vírus respiratórios.

### 5.1.6. Critério de Exclusão

Espécimes clínicos transportados sem refrigeração, obtidos de pacientes com mais de cinco dias de doença ou com resultado laboratorial positivo para Influenza ou VRS.

## 5.2. MÉTODOS

### 5.2.1. Coleta de espécimes clínicos

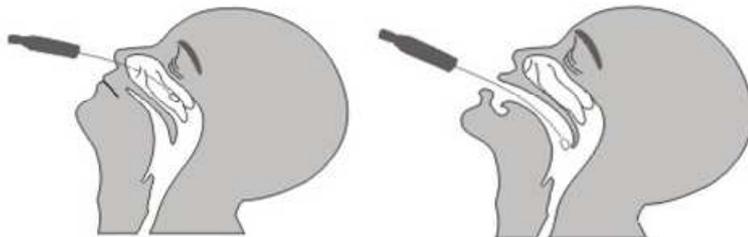
Amostras de ANF foram obtidas com a utilização de um coletor plástico descartável acoplado a uma sonda nasal e ligado a uma fonte de vácuo. A sonda foi introduzida em ambas as narinas do paciente promovendo a aspiração de secreções para o interior do coletor (Figura 5). Após este processo, foi adicionado ao coletor 4 mL de meio de transporte (Hanks e gelatina a 0,5%) para preservação do espécime.



**FIGURA 5.** Desenho ilustrativo da coleta de aspirado da nasofaringe.

Alternativamente foi utilizada a coleta de SC que consistiu na introdução de um estilete ou swab na cavidade nasal friccionando o meato médio na tentativa de obter algumas células da mucosa (Figura 6). Este procedimento foi realizado nas duas narinas (um *swab* para cada

narina). Em seguida, um terceiro swab também foi obtido da cavidade oral do paciente. Finalmente, os três estiletos foram inseridos em um tubo com 4 mL de meio de transporte.



**FIGURA 6.** Desenho ilustrativo da coleta dos *swabs* nasal e da orofaringe

Após a coleta, os espécimes foram rotulados com a identificação do paciente e transportados sob refrigeração a 4°C ao LVR-IEC para posterior processamento.

### 5.2.2. Tratamento das amostras

No LVR-IEC, as amostras clínicas 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.

### 5.2.3. Detecção genética do HMPV

#### Extração do RNA viral

O RNAv foi extraído utilizando-se o *kit* comercial *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. O método consistiu em três principais etapas: Lise (quebra), lavagem e eluição e baseia-se na capacidade que a sílica tem de formar ligação com o RNAv em meios com alta concentração de sal combinada à centrifugação em alta velocidade (8.000 a 14.000 rpm).

O procedimento consiste em adicionar em um tubo de 1.5mL, 5.6 µL de RNA Carrier, 25 µL de proteinase K e 200 µL de tampão *Lysis Buffer*, e em seguida acrescentar 200 µL de amostra (swab combinado ou aspirado nasofaríngeo) e agitar em vortex por 15s.

A solução formada é incubada por 15 minutos a 56°C, para que ocorresse a completa lise das partículas virais e liberação do ácido nucléico, ao termino é feito um spin. Adiciona-se 250 µL de etanol absoluto (98 a 100%), agitar em vortex por 15 segundos. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente e submeter a um novo spin. Transferir 675 µL do lisado para a coluna acoplada a um tubo coletor, centrifugar por 1 min a 6800 x g.

Transferiu-se a coluna para um novo tubo coletor e é adicionado 500 µL de tampão *Wash Buffer* e centrifugar por 1 min a 6800 x g. Este procedimento é repetido duas vezes com tampões de lavagem diferentes. Transferiu-se a coluna para um novo tubo coletor e centrifugou-se a coluna por 1 minuto a velocidade máxima da microcentrifuga para retirar qualquer excesso de etanol. Transferiu-se a coluna para um tubo novo de 1.5mL e é adicionado 80 µL de água DNA/RNase *free* no centro da coluna promovendo uma nova centrifugação na velocidade máxima da microcentrifuga.

Descartar a coluna e estocar o DNA/RNA extraído a -70°C devidamente rotulado com registro e data da extração. Após a extração o RNA eluído foi estocado a -70°C para testes posteriores.

## Detecção do RNA viral via qRT-PCR

A detecção de HMPV foi baseada na amplificação do gene F por meio de qRT-PCR. A técnica foi realizada em placas e utilizou-se o kit comercial *SuperScript<sup>TM</sup> III One-step qRT-PCR with Platinum Taq<sup>TM</sup>* (Invitrogen Life Technologies) junto aos oligonucleotídeos e sondas especificados no Quadro 2. As reações foram feitas para um volume final de 25µL contendo 5µL de RNA viral, 5,5µL de H<sub>2</sub>O, 12,5 µL de 2X *reaction mix*, 0,5µM de cada *primer* específico, 0,5µM da sonda e 0,5µL de SSIIRT/Taq mix (Quadro 3).

**QUADRO 2.** Oligonucleotídeos iniciadores e sonda utilizadas na reação qRT-PCR para o diagnóstico viral do HMPV.

Identificação	Seqüência (5'-3')	Tamanho do Amplicon
HMPV/+/540	CAAGTGYGACATTGCTGACCTGAA	59 pb
HMPV/-/598	ACTGCCGCACAACATTTAGAAA	
(sonda)	6FAM TAMRA	--
HMPV1	-TGGCYGTYAGCTTCAGTCAATTCAACAGA-	

**QUADRO 3.** Reagentes e quantidades utilizadas para o teste de qRT-PCR.

Reagente	1X (µL)
H <sub>2</sub> O	5,5
<i>Reaction Mix</i>	12,5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Sonda	0,5
SSIIRT/Taq	0,5
RNA <sub>v</sub>	5

A amplificação do segmento do gene F foi realizada inicialmente submetendo a mistura de reação a 48°C por 30 minutos e 95°C 10 minutos. Esta etapa foi seguida por 45 ciclos de PCR cada um composto por 95°C por 15 segundos e 60°C 1 minuto. Todas as etapas da reação foram realizadas na plataforma 7500 PCR Systems (*Applied Biosystems*). As condições de amplificação do gene F pela técnica qRT-PCR encontra-se descrita No quadro 4.

**QUADRO 4:** Condições para amplificação do gene F de HMPV pela técnica do 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

As amostras clínicas foram trabalhadas em grupos (*pools*) de cinco espécimes contendo 5µL de cada amostra. A detecção de positividade em um *pool*, suscitava a realização de uma nova reação de qRT-PCR com cada espécime formador daquele conjunto. A positividade foi considerada quando, após esta nova reação, havia persistência de resultados positivos, sendo então esta(s) amostra(s) a(s) identificada(s) como 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 substituindo o DNA viral e um controle positivo (DNA genômico da cepa CAN 97-83 detectada no Canadá, considerada protótipo para análise molecular de HMPV).

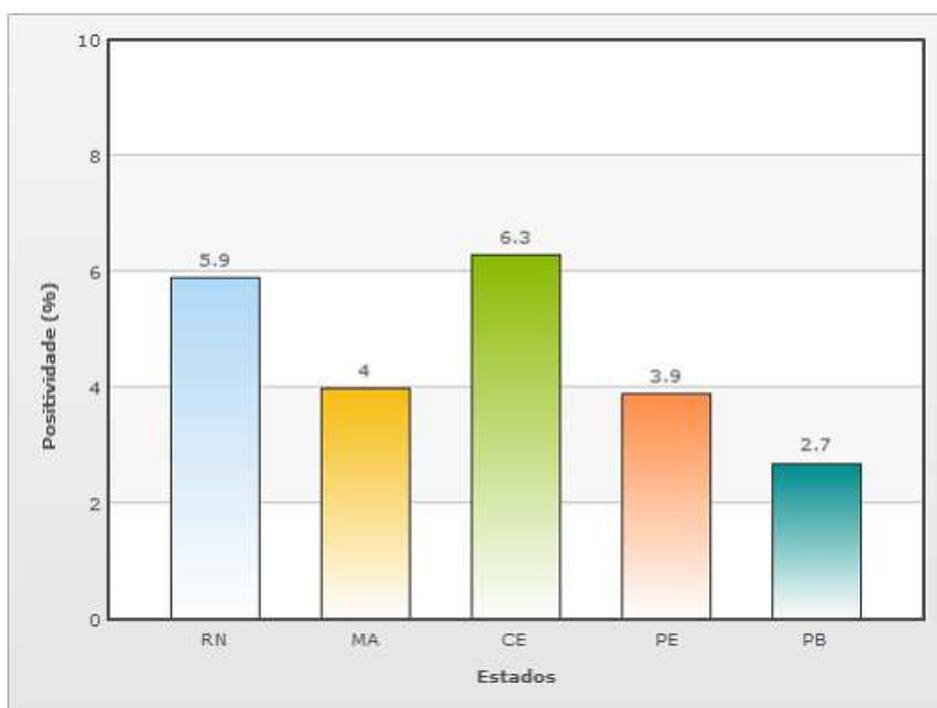
#### 5.2.4. Análise estatística

Os dados foram tratados inicialmente com estatística descritiva e posteriormente as variáveis foram analisadas por meio de testes qui-quadrado, regressão logística múltipla e regressão linear múltipla e simples; o valor de  $p \leq 0.05$  foi considerado significativo; odds ratio e IC 99%; os cálculos foram realizados pelo software Bioestat 5.0 (AYRES *et al.* 2007).

Para inferir sobre sazonalidade do vírus, predisposição de infecção associada á umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica em cada Estado, foram obtidos e analisados dados metereológicos do período estudado no site <http://clima.icea.gov.br/clima/> . Neste contexto, foi realizado uma matriz de correlação entre as variáveis umidade do ar, precipitação pluviométrica, casos suspeitos de IRA e pacientes HMPV positivos.

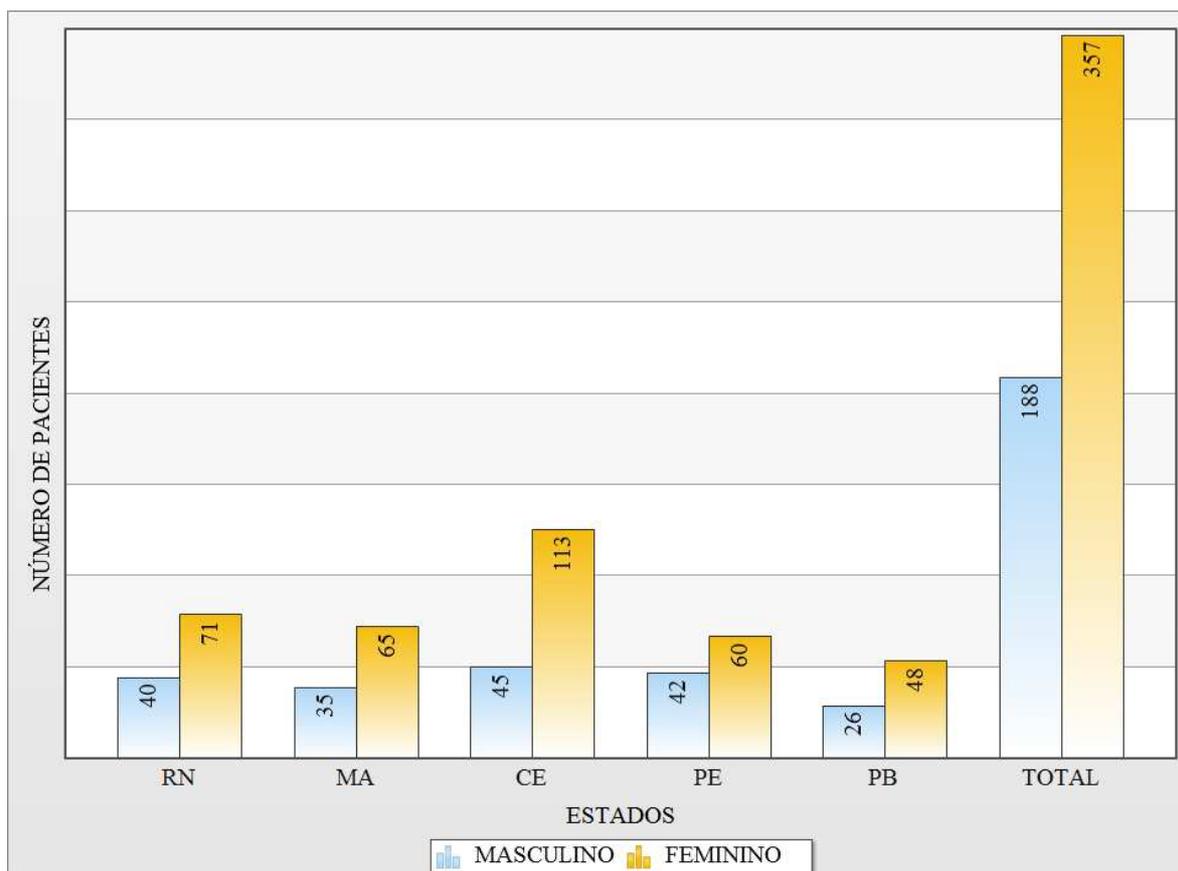
## 6. RESULTADOS

No presente estudo, um total de 545 amostras foram analisadas laboratorialmente e revelaram etiologia positiva para HMPV em 4,7% dos pacientes pesquisados tendo em cada Estado a seguinte positividade: Seis pacientes no Rio Grande do Norte (5,9%), quatro pacientes no Maranhão (4,0%), dez pacientes no Ceará (6,3%), quatro pacientes em Pernambuco (3,9%) e dois pacientes na Paraíba (2,7%) como pode ser observada na figura 7.



**FIGURA 7.** Percentual de positividade para HMPV encontrado em cada Estado da região Nordeste.

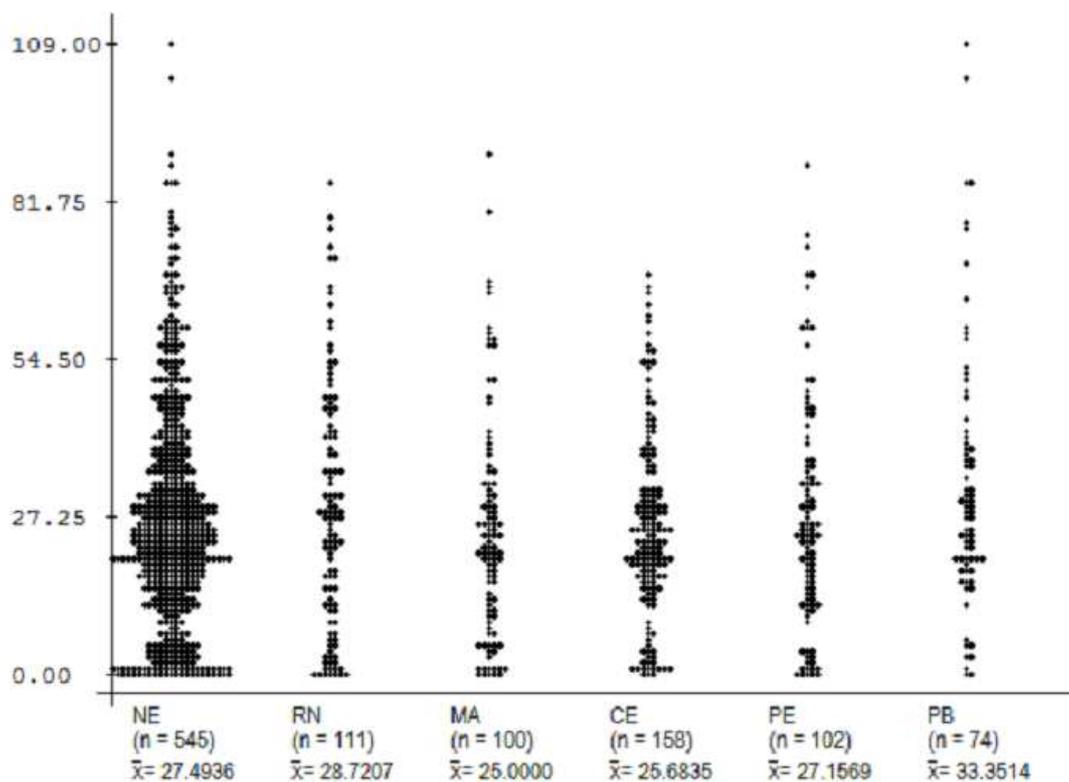
Na figura 8 observamos que os pacientes com IRA pertenciam a ambos os gêneros compreendendo 65,5% mulheres e 34,5% homens. A prevalência de pacientes do sexo feminino sobre o masculino foi recorrente em todos os Estados. Entre os pacientes com resultado positivo para o HMPV, observou-se que 26,9% eram homens e 73,1% mulheres.



**FIGURA 8.** Distribuição dos pacientes investigados por sexo e Estado de origem.

A partir destes dados, foi realizado o teste de qui-quadrado para duas amostras independentes, objetivando comprovar a existência de predisposição da positividade para o HMPV. Com o resultado, aplicado devidamente a correção de Yates para o pValor, foi encontrado  $p = 0.5346$ , revelando desta forma que esta diferença entre os gêneros, não possuiu uma significância estatística, assim não existindo a predisposição.

A idade dos pacientes com IRA variou de 0 (recém-nascidos) a 109 anos (media 27,5 anos) com distribuição uniforme entre os diferentes Estados como pode ser visto na figura 9. A positividade para o HMPV ficou situada na faixa de 1 a 67 anos (média de 26,5 anos) sendo que, destes pacientes, 23,08% eram crianças até 12 anos, 73,08% adultos entre 13 a 64 anos e 3,86% idosos.



**FIGURA 9.** Distribuição pontual das idades de pacientes com IRA na Região Nordeste e em cada Estado.

Mais de 55% da população investigada relatou febre, adicionado a sintomas de tosse, dispnéia, rinorréia e/ou mialgia no momento da investigação. Além disso, foi ainda registrado, embora em menor frequência, sinais de congestão nasal, artralgia, cefaléia, dor de garganta, calafrios, otite, astenia, náuseas e conjuntivite. Nos pacientes com diagnóstico positivo para HMPV, ocorreu com maior frequência manifestações de tosse (100%), dispnéia (77%) e rinorréia (69%).

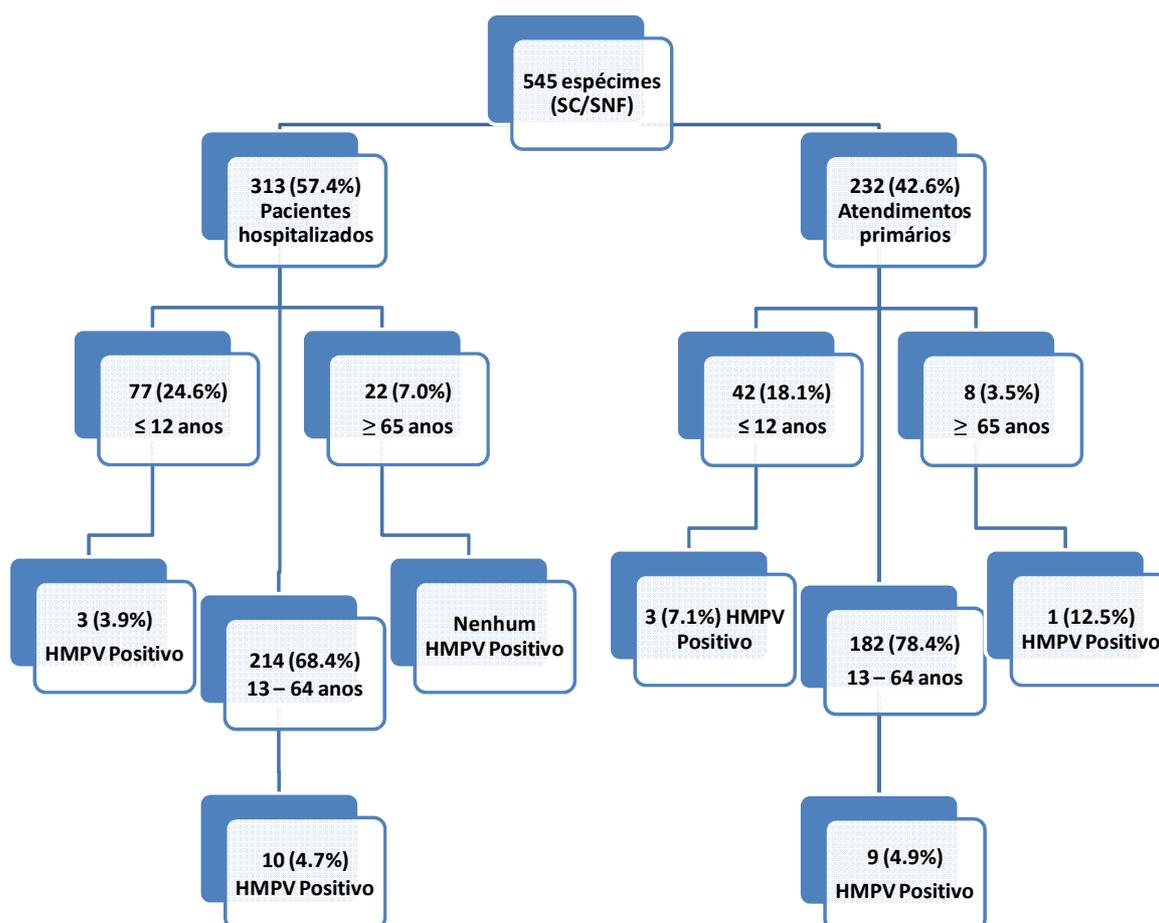
Para avaliar a existência de relação direta entre os sinais e sintomas e a infecção por HMPV, foi realizado o teste de regressão logística múltipla. Com o resultado obtido ( $p > 0.05$ ), podemos inferir que não existiu um quadro de sintomatologia determinado para constatação da doença por HMPV.

Foi observado que 31% ( $n=169$ ) do total de pacientes envolvidos no estudo, apresentavam alguma comorbidade sendo a bronquite o agravo mais frequente detectado em

15% dos pacientes acometidos por IRA. Entre os pacientes infectados por HMPV, 42% dos casos apresentava algum fator de risco.

Do total de pacientes avaliados, 232 (42,6%) foram provenientes de atendimento ambulatorial (postos de atenção básica em saúde). O percentual de positividade para o HMPV nestes indivíduos foi de 7,1% em menores até 12 anos, 4,9% para os situados na faixa etária de 13 a 64 anos e 12,5% em maiores de 64 anos (Figura 10).

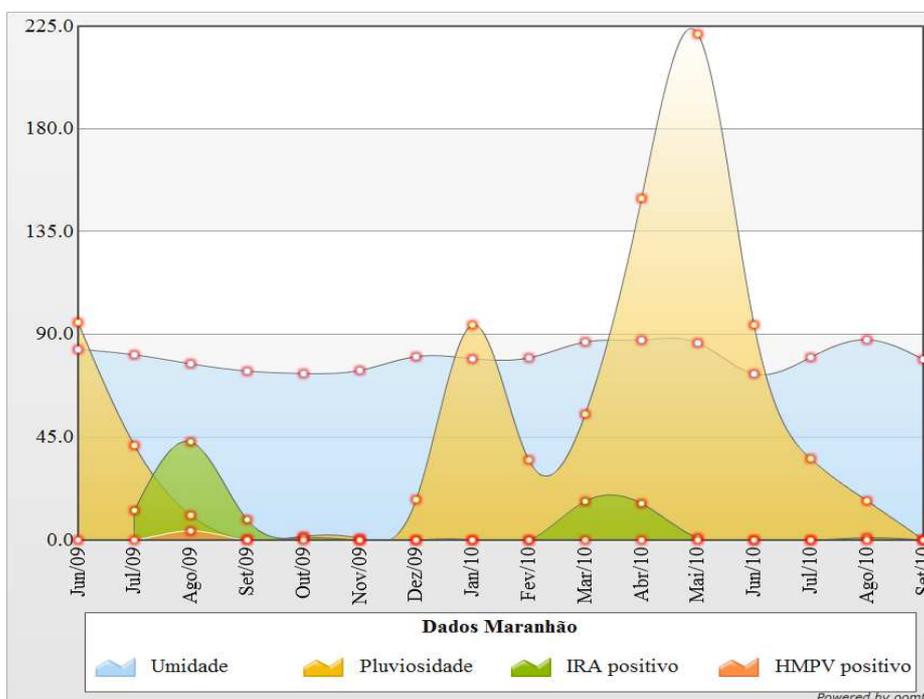
Os demais 313 (57,4%) pacientes, foram oriundos de internações em hospitais públicos e privados, e alcançaram positividade de 3,9% em crianças até 12 anos de idade e 4,7% em pacientes pertencentes ao grupo de 12 á 64 anos. Não foi detectada positividade para HMPV nos pacientes com idade superior a 64 anos (Figura 10).



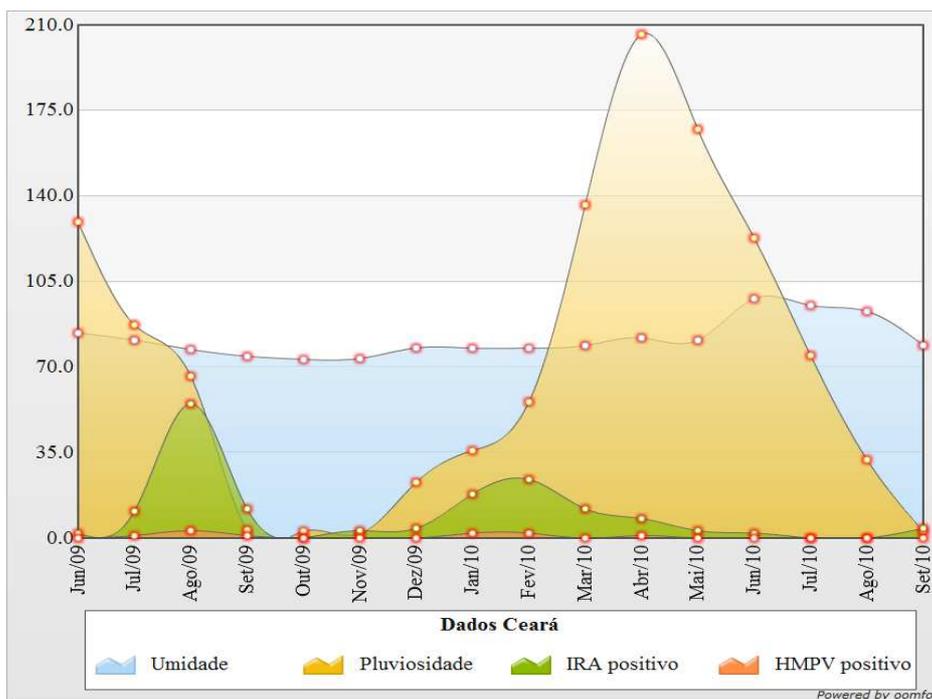
**FIGURA 10.** Fluxograma descritivo das amostras do estudo.

Houve relação entre as hospitalizações e as comorbidades obtendo alta significância estatística ( $p < 0.0001$ ) após a realização do teste de regressão logística simples constatando que a presença da comorbidade foi primordial para o tratamento intensivo do paciente.

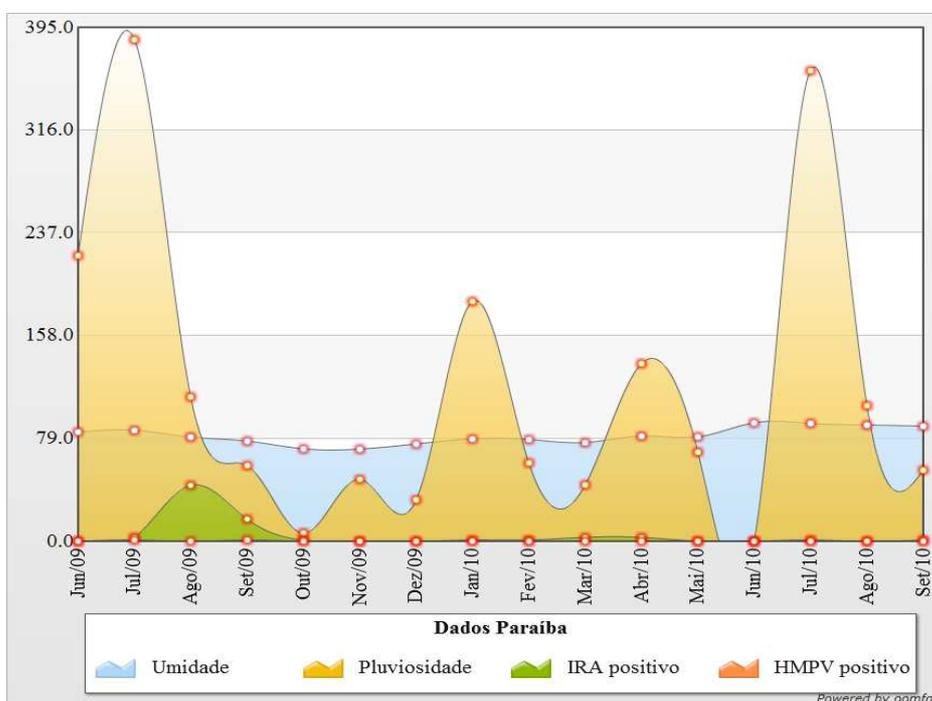
Em todas as análises realizadas não foi observada nenhuma relação entre as variáveis climatológicas, casos suspeitos de IRA e pacientes HMPV positivos, assim sendo, não existiu nenhuma relação estatística significativa entre os dados avaliados quanto a climatologia e a positividade dos dados para IRA ou HMPV. O pico de positividade para o vírus (n=16) foi observado no terceiro trimestre do ano em todos os Estados investigados como pode ser observado nas figuras de 11 - 15.



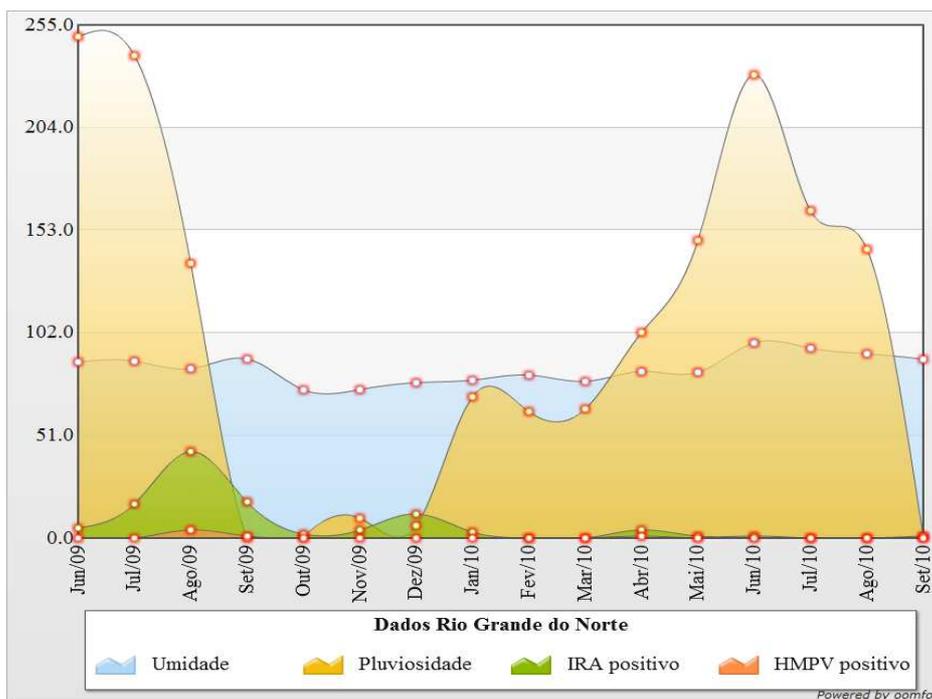
**Figura 11.** Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado do Maranhão.



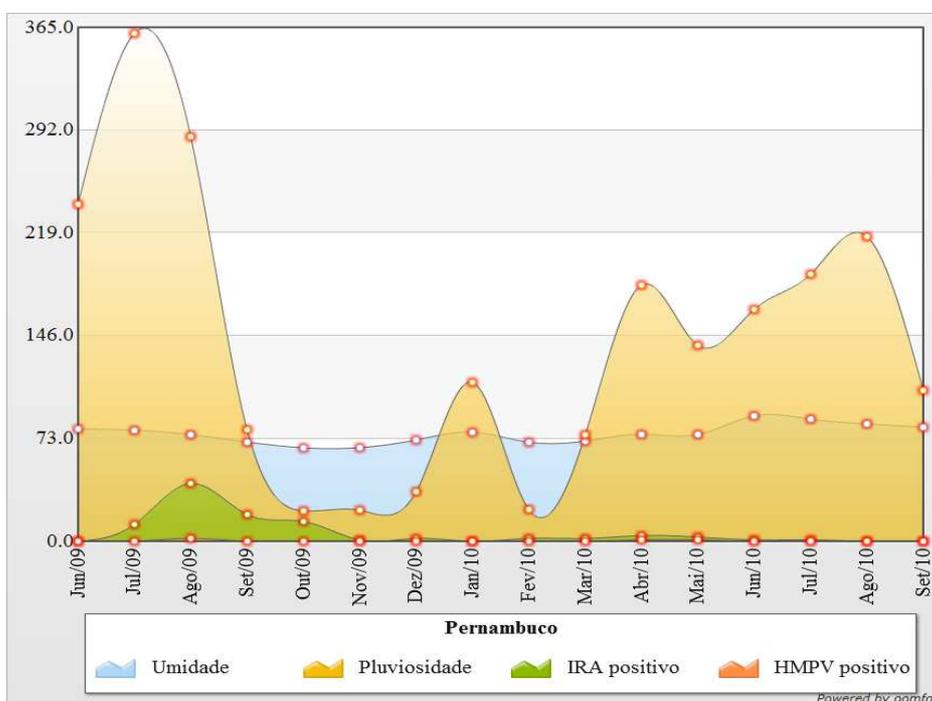
**Figura 12.** Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado do Ceará.



**Figura 13.** Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado da Paraíba.



**Figura 14.** Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado do Rio Grande do Norte.



**Figura 15.** Dados climatológicos confrontados a dados de positividade para IRA e HMPV do Estado de Pernambuco.

## 7. DISCUSSÃO

Foram analisadas 545 amostras provindas de todos os cinco Estados, dentro dos critérios propostos, obtendo positividade em todos os Estados, compatíveis com resultados registrados na literatura nacional e internacional (GRAY *et al.*, 2006; THOMAZELLI *et al.*, 2007; ARABPOUR *et al.*, 2008; DEBUR *et al.*, 2010).

Se compararmos com outros estudos, Gray *et al.* (2006) no Peru e Gioula *et al.* (2010) na Grécia pesquisando a presença do HMPV em pacientes, de todas faixas etárias e assistidos em diversos serviços de saúde, encontraram positividade em 2,9% e 6,05% respectivamente. Nossos dados obtidos mostram proximidade aos dados acima relatados considerando ainda a similaridade das populações envolvidas.

Foi observado, considerando a região como um todo, e também considerando os dados em cada Estado, que a quantidade de pacientes do sexo feminino era sempre maior quando comparado ao masculino, existindo ainda esta tendência quando comparado estes dados quanto à positividade.

Estudo realizado por Gomes *et al.* (2007) relataram com depoimentos de pessoas do sexo masculino, sem nenhum grau de escolaridade completo ou com ensino superior em curso ou concluído, que a busca por serviços primários de saúde é bem maior na população feminina quando comparada a masculina. Este fato se dá por um modelo hegemônico de masculinidade.

Nosso estudo mostra forte relação com estes dados, pois podemos afirmar que a superioridade de pacientes do sexo feminino existente, foi devido à coleta ser realizada em indivíduos que haviam procurado o serviço de atenção primária e, dependendo do estado de morbidade, eram encaminhados a serviços especializados e ainda justifica o fato de não existir uma predisposição apesar dos dados sempre tenderem ao sexo feminino.

Diversos estudos afirmam existir uma maior afinidade do HMPV para menores de cinco anos e maiores que 60 anos (GREENSILL *et al.*, 2003; FF *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2006; MAO *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009). Esta afirmativa é relevante considerando o sistema imunológico mais susceptível das faixas etárias primárias, devido o sistema imune estar em

formação, e na terceira idade devido geralmente existirem doenças consideradas fatores de risco ou comorbidades.

Em nosso estudo e em alguns outros com o mesmo perfil (CHAN *et al.*, 2003; GRAY *et al.*, 2006; DEBUR *et al.*, 2010; GIOULA *et al.*, 2010) esta afirmativa torna-se inconclusiva, pois apesar de existir uma grande população de crianças, esta predominância não pode ser observada. Todos os nossos resultados encontrados sobre a população estavam sempre dentro do intervalo percentual representativo de positividade para o HMPV.

As infecções virais respiratórias, quanto aos sinais e sintomas, são indistinguíveis podendo somente ser classificadas como de maior ou menor gravidade. Diversas pesquisas clínicas relataram além de febre, a tosse, dispnéia e coriza como sintomatologias usualmente registradas (VAN DEN HOOGEN *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2006; SLOOTS *et al.*, 2006; HARA *et al.*, 2008).

A literatura revela ser frequente a ocorrência de agravos respiratórios como pneumonia, bronquite e bronquiolite, doenças estas que são classificadas como pneumopatias em pacientes infectados por HMPV (GREENSILL *et al.*, 2003; PEIRIS *et al.*, 2003; HAMELIN & BOIVIN, 2005; WILLIAMS *et al.*, 2005; FALSEY & WALSH, 2006; JOHNSTONE *et al.*, 2008). Estas comorbidades, também foram observadas em nossos pacientes com diagnóstico de HMPV, havendo evolução mais frequente com o quadro de bronquite.

Em uma pesquisa realizada por Walsh *et al.* (2008), foi avaliado durante quatro anos a infecção por HMPV em não-hospitalizados, divididos em três grupos (idosos saudáveis, pessoas com fatores de risco e crianças) e hospitalizados obtendo como resultado uma positividade maior no grupo não-hospitalizado (9.4%:8.5%) sendo que, analisando separadamente, somente o grupo de idosos saudáveis obteve um percentual menor que os pacientes hospitalizados (5.9%:8.5%).

Dados mais recentes gerados por Debur *et al.* (2010), relataram 1572 espécimes coletados entre os anos de 2006 a 2008 de crianças hospitalizadas, pacientes transplantados e pessoas de atendimento em unidades básicas. Obtiveram como resultados maior positividade para HMPV no grupo de pacientes não-hospitalizados.

Nos resultados revelados em nosso estudo, também tivemos uma maior positividade em pacientes de atendimento sem necessidade de hospitalização (5,6%) quando comparado aos pacientes internados em algum hospital público ou particular (4,6%). Esta prevalência se estendeu por todas as faixas etárias mostrando concordância com os poucos dados publicados na literatura.

Valendo-se dos resultados obtidos, foi constatado que os pacientes em estados graves e principalmente todos os classificados como comorbidades foram encaminhados ao internamento em algum hospital público ou particular como preconizava o Protocolo de Manejo Clínico e Vigilância Epidemiológica da Influenza (Anexo B).

Na literatura existente, os dados quanto ao período sazonal do HMPV diferem muito dentro de um mesmo continente, mostrando picos em períodos distintos a cada estudo relatado, como pode se observar por exemplo nos estudos publicados com populações asiáticas. Nos relatos de Chung *et al.* (2006), Peiris *et al.* (2003), Mao *et al.* (2008), Hara *et al.* (2008) e Kim *et al.* (2009), cada um mostra a existência do vírus, porém variando o período de positividade entre as estações de inverno, verão e primavera. Este fato mostra-se existente nos demais estudos abordando sazonalidade pelo mundo.

A Região Nordeste do Brasil se caracteriza por um clima semi-árido com chuvas raras e baixa umidade. As temperaturas são elevadas com uma média anual que varia de 20°C a 28°C. A média de chuvas é menos de 300 mm por ano, às quais ocorrem durante no máximo três meses, dando vazão a estiagens que preponderantemente acontecem no período de agosto a dezembro.

Em nosso estudo os casos de infecção por HMPV obtiveram picos de positividade nos diferentes Estados investigados nos meses de agosto e setembro. Este período, corresponde a estação seca na região que é caracterizada pela queda da precipitação pluviométrica e da umidade relativa do ar.

Nossos resultados assemelham-se aos de Bezerra *et al.* (2011) realizado também no Nordeste, na cidade de Aracajú o qual obteve picos de positividade para HMPV no trimestre entre agosto e outubro. Com grande variância quanto ao período sazonal de circulação do HMPV, é necessário mais estudos para inferir sobre estes dados.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foi possível descrever a ocorrência de HMPV (4,7%) na Região Nordeste acometendo pacientes portadores de infecção respiratória aguda, tanto acompanhada ambulatorialmente como hospitalizados, que preencheram critério clínico para Infecção Respiratória Aguda Grave.

A ocorrência de positividade para o HMPV não teve prevalência em nenhuma faixa etária. Entretanto, observou-se uma tendência da infecção pelo vírus entre os pacientes do sexo feminino ( $p = 0,5346$ ).

Os sintomas mais frequentemente observados, nos pacientes infectados por HMPV foram além de febre, tosse, rinorréia e dispnéia.

A presença de comorbidades era definitiva para ocorrer a internação. Entre os pacientes com infecção por HMPV, a positividade foi maior nos pacientes com atendimento primário.

Quanto à sazonalidade, foi evidenciada semelhança quanto ao período de pico da infecção na região Nordeste, porém sem correlação estatística entre a IRA ou HMPV com os dados climatológicos.

## REFERENCIAS

AGAPOV, E.; SUMINO, K. C.; GAUDREAU-KEENER, M.; STORCH, G. A.; HOLTZMAN, M. J. Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness. *J Infect Dis* [S.I.], v. 193, n. 3, p. 396-403, Feb 1 2006.

AGRAWAL, A. S.; ROY, T.; GHOSH, S.; CHAWLA-SARKAR, M. Genetic variability of attachment (G) and Fusion (F) protein genes of human metapneumovirus strains circulating during 2006-2009 in Kolkata, Eastern India. *Virology* [S.I.], v. 8, p. 67, 2011.

AL HAJJAR, S.; MCINTOSH, K. The first influenza pandemic of the 21st century. *Ann Saudi Med* [S.I.], v. 30, n. 1, p. 1-10, Jan-Feb 2010.

ALBUQUERQUE, M. C.; PENA, G. P.; VARELLA, R. B.; GALLUCCI, G.; ERDMAN, D.; SANTOS, N. Novel respiratory virus infections in children, Brazil. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 15, n. 5, p. 806-8, May 2009.

ALTO, W. A. Human metapneumovirus: a newly described respiratory tract pathogen. *J Am Board Fam Pract* [S.I.], v. 17, n. 6, p. 466-9, Nov-Dec 2004.

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 J Med Microbiol* [S.I.], v. 26, n. 2, p. 123-6, Apr-Jun 2008.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L. & SANTOS, A. A. *BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. 2007, Ong Mamiraua. Belém, PA.

BAO, X.; SINHA, M.; LIU, T.; HONG, C.; LUXON, B. A.; GAROFALO, R. P.; CASOLA, A. Identification of human metapneumovirus-induced gene networks in airway epithelial cells by microarray analysis. *Virology* [S.I.], v. 374, n. 1, p. 114-27, Apr 25 2008.

BASTIEN, N.; NORMAND, S.; TAYLOR, T.; WARD, D.; PERET, T. C.; BOIVIN, G.; ANDERSON, L. J.; LI, Y. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. *Virus Res* [S.I.], v. 93, n. 1, p. 51-62, May 2003.

BERMAN, S.; DUENAS, A.; BEDOYA, A.; CONSTAIN, V.; LEON, S.; BORRERO, I.; MURPHY, J. Acute lower respiratory tract illnesses in Cali, Colombia: a two-year ambulatory study. *Pediatrics* [S.I.], v. 71, n. 2, p. 210-8, Feb 1983.

BERMAN, S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. *Rev Infect Dis* [S.I.], v. 13 Suppl 6, p. S454-62, May-Jun 1991.

BEZERRA, P. G.; BRITTO, M. C.; CORREIA, J. B.; DUARTE MDO, C.; FONCECA, A. M.; ROSE, K.; HOPKINS, M. J.; CUEVAS, L. E.; MCNAMARA, P. S. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLoS One* [S.I.], v. 6, n. 4, p. e18928, 2011.

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* [S.I.], v. 315, n. 1, p. 1-9, Oct 10 2003.

BOIVIN, G.; ABED, Y.; PELLETIER, G.; RUEL, L.; MOISAN, D.; COTE, S.; PERET, T. C.; ERDMAN, D. D.; ANDERSON, L. J. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* [S.I.], v. 186, n. 9, p. 1330-4, Nov 1 2002.

BOIVIN, G.; DE SERRES, G.; COTE, S.; GILCA, R.; ABED, Y.; ROCHETTE, L.; BERGERON, M. G.; DERY, P. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 634-40, Jun 2003.

BOIVIN, G.; DE SERRES, G.; HAMELIN, M. E.; COTE, S.; ARGOUIN, M.; TREMBLAY, G.; MARANDA-AUBUT, R.; SAUVAGEAU, C.; OUAKKI, M.; BOULIANNE, N.; COUTURE, C. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 44, n. 9, p. 1152-8, May 1 2007.

BUCHHOLZ, U. J.; BIACCHESI, S.; PHAM, Q. N.; TRAN, K. C.; YANG, L.; LUONGO, C. L.; SKIADOPOULOS, M. H.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L. Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *J Virol* [S.I.], v. 79, n. 11, p. 6588-97, Jun 2005.

CAMPBELL, H. Acute respiratory infection: a global challenge. *Arch Dis Child* [S.I.], v. 73, n. 4, p. 281-3, Oct 1995.

CARNEIRO, B. M.; YOKOSAWA, J.; ARBIZA, J.; COSTA, L. F.; MIRAZO, S.; NEPOMUCENO, L. L.; OLIVEIRA, T. F.; GOULART, L. R.; VIEIRA, C. U.; FREITAS, G. R.; PAULA, N. T.; QUEIROZ, D. A. Detection of all four human metapneumovirus subtypes in nasopharyngeal specimens from children with respiratory disease in Uberlandia, Brazil. *J Med Virol* [S.I.], v. 81, n. 10, p. 1814-8, Oct 2009.

CHAN, P. K.; TAM, J. S.; LAM, C. W.; CHAN, E.; WU, A.; LI, C. K.; BUCKLEY, T. A.; NG, K. C.; JOYNT, G. M.; CHENG, F. W.; TO, K. F.; LEE, N.; HUI, D. S.; CHEUNG, J. L.; CHU, I.; LIU, E.; CHUNG, S. S.; SUNG, J. J. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 9, n. 9, p. 1058-63, Sep 2003.

CHANG, L. Y.; CHIANG, B. L.; KAO, C. L.; WU, M. H.; CHEN, P. J.; BERKHOUT, B.; YANG, H. C.; HUANG, L. M. Lack of association between infection with a novel human coronavirus (HCoV), HCoV-NH, and Kawasaki disease in Taiwan. *J Infect Dis* [S.I.], v. 193, n. 2, p. 283-6, Jan 15 2006.

CHUNG, J. Y.; HAN, T. H.; KIM, B. E.; KIM, C. K.; KIM, S. W.; HWANG, E. S. Human metapneumovirus infection in hospitalized children with acute respiratory disease in Korea. *J Korean Med Sci* [S.I.], v. 21, n. 5, p. 838-42, Oct 2006.

COLLINS, P. L.; CROWE, J. E. Jr. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. *In Fields Virology*, 5th ed, 1601-1646, 2007.

COTE, S.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 41, n. 8, p. 3631-5, Aug 2003.

CUEVAS, L. E.; NASSER, A. M.; DOVE, W.; GURGEL, R. Q.; GREENSILL, J.; HART, C. A. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 9, n. 12, p. 1626-8, Dec 2003.

DE GRAAF, M.; HERFST, S.; SCHRAUWEN, E. J.; CHOI, Y.; VAN DEN HOOGEN, B. G.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Specificity and functional interaction of the polymerase complex proteins of human and avian metapneumoviruses. *J Gen Virol* [S.I.], v. 89, n. Pt 4, p. 975-83, Apr 2008.

DE GRAAF, M.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A.; HOLMES, E. C. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *J Gen Virol* [S.I.], v. 89, n. Pt 12, p. 2933-42, Dec 2008.

DE GRAAF, M.; SCHRAUWEN, E. J.; HERFST, S.; VAN AMERONGEN, G.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Fusion protein is the main determinant of metapneumovirus host tropism. *J Gen Virol* [S.I.], v. 90, n. Pt 6, p. 1408-16, Jun 2009.

DEBUR, M. C.; VIDAL, L. R.; STROPARO, E.; NOGUEIRA, M. B.; ALMEIDA, S. M.; TAKAHASHI, G. A.; ROTTA, I.; PEREIRA, L. A.; SILVEIRA, C. S.; DELFRARO, 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* [S.I.], v. 105, n. 8, p. 1010-8, Dec 2010.

DERDOWSKI, A.; PETERS, T. R.; GLOVER, N.; QIAN, R.; UTLEY, T. J.; BURNETT, A.; WILLIAMS, J. V.; SPEARMAN, P.; CROWE, J. E., JR. Human metapneumovirus nucleoprotein and phosphoprotein interact and provide the minimal requirements for inclusion body formation. *J Gen Virol* [S.I.], v. 89, n. Pt 11, p. 2698-708, Nov 2008.

ESCOBAR, C.; LUCHSINGER, V.; DE OLIVEIRA, D. B.; DURIGON, E.; CHNAIDERMAN, J.; AVENDANO, L. F. Genetic variability of human metapneumovirus isolated from Chilean children, 2003-2004. *J Med Virol* [S.I.], v. 81, n. 2, p. 340-4, Feb 2009.

EVASHUK, K. M.; 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. *Am J Transplant* [S.I.], v. 8, n. 7, p. 1567-9, Jul 2008.

FALSEY, A. R.; ERDMAN, D.; ANDERSON, L. J.; WALSH, E. E. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* [S.I.], v. 187, n. 5, p. 785-90, Mar 1 2003.

FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 42, n. 4, p. 518-24, Feb 15 2006.

FF, I. JPMA; BEEKHUIS, D.; COTTON, M. F.; PIEPER, C. H.; KIMPEN, J. L.; VAN DEN HOOGEN, B. G.; VAN DOORNUM, G. J.; OSTERHAUS, D. M. Human metapneumovirus infection in hospital referred South African children. *J Med Virol* [S.I.], v. 73, n. 3, p. 486-93, Jul 2004.

FREYMOUTH, F.; VABRET, A.; LEGRAND, L.; ETERRADOSSI, N.; LAFAY-DELAIRE, F.; BROUARD, J.; GUILLOIS, B. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* [S.I.], v. 22, n. 1, p. 92-4, Jan 2003.

GALIANO, M.; VIDELA, C.; PUCH, S. S.; MARTINEZ, A.; ECHAVARRIA, M.; CARBALLAL, G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol* [S.I.], v. 72, n. 2, p. 299-303, Feb 2004.

GILLIM-ROSS, L.; SUBBARAO, K. Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. *Clin Microbiol Rev* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 614-36, Oct 2006.

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 Surveill* [S.I.], v. 15, n. 9, Mar 4 2010.

GIRARD, M. P.; CHERIAN, T.; PERVIKOV, Y.; KIENY, M. P. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. *Vaccine* [S.I.], v. 23, n. 50, p. 5708-24, Dec 30 2005.

GOMES, R.; NASCIMENTO, E. F.; ARAÚJO, F. C. Por que os homens buscam menos os serviços de saúde do que as mulheres? As explicações de homens com baixa escolaridade e homens com ensino superior. *Cad Saud Public*, v. 23, n. 3, p. 565-574, Mai 2007.

GOVINDARAJAN, D.; SAMAL, S. K. Sequence analysis of the large polymerase (L) protein of the US strain of avian metapneumovirus indicates a close resemblance to that of the human metapneumovirus. *Virus Res* [S.I.], v. 105, n. 1, p. 59-66, Sep 15 2004.

GRAY, G. C.; CAPUANO, A. W.; SETTERQUIST, S. F.; SANCHEZ, J. L.; NEVILLE, J. S.; OLSON, J.; LEBECK, M. G.; MCCARTHY, T.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Human metapneumovirus, Peru. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 347-50, Feb 2006.

GREENSILL, J.; MCNAMARA, P. S.; DOVE, W.; FLANAGAN, B.; SMYTH, R. L.; HART, C. A. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 9, n. 3, p. 372-5, Mar 2003.

HAMELIN, M. E.; BOIVIN, G. Human metapneumovirus: a ubiquitous and long-standing respiratory pathogen. *Pediatr Infect Dis J* [S.I.], v. 24, n. 11 Suppl, p. S203-7, Nov 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. *Jpn J Infect Dis* [S.I.], v. 61, n. 6, p. 500-2, Nov 2008.

HERFST, S.; SCHRAUWEN, E. J.; DE GRAAF, M.; VAN AMERONGEN, G.; VAN DEN HOOGEN, B. G.; DE SWART, R. L.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A.

Immunogenicity and efficacy of two candidate human metapneumovirus vaccines in cynomolgus macaques. *Vaccine* [S.I.], v. 26, n. 33, p. 4224-30, Aug 5 2008.

HINMAN, A. R. Global progress in infectious disease control. *Vaccine* [S.I.], v. 16, n. 11-12, p. 1116-21, Jul 1998.

HUCK, B.; SCHARF, G.; NEUMANN-HAEFELIN, D.; PUPPE, W.; WEIGL, J.; FALCONE, V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 12, n. 1, p. 147-50, Jan 2006.

JOHNSTONE, J.; MAJUMDAR, S. R.; FOX, J. D.; MARRIE, T. J. Human metapneumovirus pneumonia in adults: results of a prospective study. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 46, n. 4, p. 571-4, Feb 15 2008.

KAHN, J. S. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 546-57, Jul 2006.

KAIDA, A.; KUBO, H.; SHIOMI, M.; KOHDERA, U.; IRITANI, N. Evaluation of real-time RT-PCR compared with conventional RT-PCR for detecting human metapneumovirus RNA from clinical specimens. *Jpn J Infect Dis* [S.I.], v. 61, n. 6, p. 461-4, Nov 2008.

KIM, S.; SUNG, H.; IM, H. J.; HONG, S. J.; KIM, M. N. Molecular epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of human metapneumovirus infection in a pediatric hemato-oncology patient population. *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 47, n. 4, p. 1221-4, Apr 2009.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSKY, D. *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. In *Fields Virology* 4 Ed p. 1305-1340.

LING, R.; EASTON, A. J.; PRINGLE, C. R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *J Gen Virol* [S.I.], v. 73 ( Pt 7), p. 1709-15, Jul 1992.

LOUIE, J. K.; HACKER, J. K.; GONZALES, R.; MARK, J.; MASELLI, J. H.; YAGI, S.; DREW, W. L. Characterization of viral agents causing acute respiratory infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the influenza season. *Clin Infect Dis* [S.I.], v. 41, n. 6, p. 822-8, Sep 15 2005.

LUCHSINGER, V.; ESCOBAR, C.; AVENDANO, L. F. [Detection of human metapneumovirus in children hospitalized for acute lower respiratory infection in Santiago, Chile]. *Rev Med Chil* [S.I.], v. 133, n. 9, p. 1059-64, Sep 2005.

MACKIE, P. L. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr Respir Rev* [S.I.], v. 4, n. 2, p. 84-90, Jun 2003.

MACPHAIL, M.; SCHICKLI, J. H.; TANG, R. S.; KAUR, J.; ROBINSON, C.; FOUCHIER, R. A.; OSTERHAUS, A. D.; SPAETE, R. R.; HALLER, A. A. Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design. *J Gen Virol* [S.I.], v. 85, n. Pt 6, p. 1655-63, Jun 2004.

MAHONY, J. B. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin Microbiol Rev* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 716-47, Oct 2008.

MAO, H. W.; YANG, X. Q.; ZHAO, X. D. Characterization of human metapneumoviruses isolated in Chongqing, China. *Chin Med J (Engl)* [S.I.], v. 121, n. 22, p. 2254-7, Nov 20 2008.

MARKOWITZ, L. E.; NIEBURG, P. The burden of acute respiratory infection due to measles in developing countries and the potential impact of measles vaccine. *Rev Infect Dis* [S.I.], v. 13 Suppl 6, p. S555-61, May-Jun 1991.

MIRAZO, S.; RUCHANSKY, D.; BLANC, A.; ARBIZA, J. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [S.I.], v. 100, n. 7, p. 715-8, Nov 2005.

MONTO, A. S.; SULLIVAN, K. M. Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect* [S.I.], v. 110, n. 1, p. 145-60, Feb 1993.

MONTO, A. S. Viral respiratory infections in the community: epidemiology, agents, and interventions. *Am J Med* [S.I.], v. 99, n. 6B, p. 24S-27S, Dec 29 1995.

MOURA, F. E. A.; BORGES, L. C.; SOUZA, L. S. F.; RIBEIRO, D. H.; SIQUEIRA, M. M.; RAMOS, E. A. G. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). *J Bras de Patol e Med Lab*, v. 39, n. 4, p. 275-282, Jan 28 2003.

MULLINS, J. A.; ERDMAN, D. D.; WEINBERG, G. A.; EDWARDS, K.; HALL, C. B.; WALKER, F. J.; IWANE, M.; ANDERSON, L. J. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 10, n. 4, p. 700-5, Apr 2004.

NISSEN, M. D.; SIEBERT, D. J.; MACKAY, I. M.; SLOOTS, T. P.; WITHERS, S. J. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Med J Aust* [S.I.], v. 176, n. 4, p. 188, Feb 18 2002.

OLIVEIRA, D. B.; DURIGON, E. L.; CARVALHO, A. C.; LEAL, A. L.; SOUZA, T. S.; THOMAZELLI, L. M.; MORAES, C. T.; 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. *J Med Virol* [S.I.], v. 81, n. 5, p. 915-21, May 2009.

OMURA, H.; KAJIKI, A.; NAGATA, N.; KITAHARA, Y.; WAKAMATSU, K.; MINAMI, T.; TAGUCHI, K.; KATAHIRA, K. [A case of pulmonary tuberculosis with diminished lung function whose paradoxical reaction led to death]. *Kekkaku* [S.I.], v. 86, n. 5, p. 509-14, May 2011.

PABBARAJU, K.; WONG, S.; MCMILLAN, T.; LEE, B. E.; FOX, J. D. Diagnosis and epidemiological studies of human metapneumovirus using real-time PCR. *J Clin Virol* [S.I.], v. 40, n. 3, p. 186-92, Nov 2007.

PEIRIS, J. S.; TANG, W. H.; CHAN, K. H.; KHONG, P. L.; GUAN, Y.; LAU, Y. L.; CHIU, S. S. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 628-33, Jun 2003.

PELLETIER, G.; DERY, P.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Respiratory tract reinfections by the new human Metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 8, n. 9, p. 976-8, Sep 2002.

PERCIVALLE, E.; SARASINI, A.; VISAI, L.; REVELLO, M. G.; GERNA, G. Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 43, n. 7, p. 3443-6, Jul 2005.

PERET, T. C.; BOIVIN, G.; LI, Y.; COUILLARD, M.; HUMPHREY, C.; OSTERHAUS, A. D.; ERDMAN, D. D.; ANDERSON, L. J. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis* [S.I.], v. 185, n. 11, p. 1660-3, Jun 1 2002.

PERET, T. C.; ABED, Y.; ANDERSON, L. J.; ERDMAN, D. D.; BOIVIN, G. Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein. *J Gen Virol* [S.I.], v. 85, n. Pt 3, p. 679-86, Mar 2004.

PEREZ, P. B. [Genesis of a pandemic virus: H1N1]. *Rev Esp Quimioter* [S.I.], v. 22 Suppl 1, p. 5-6, Nov 2009.

PIZZORNO, A.; MASNER, M.; MEDICI, C.; SARACHAGA, M. J.; RUBIO, I.; MIRAZO, S.; FRABASILE, S.; ARBIZA, J. Molecular detection and genetic variability of human metapneumovirus in Uruguay. *J Med Virol* [S.I.], v. 82, n. 5, p. 861-5, May 2010.

RANDHAWA, J. S.; MARRIOTT, A. C.; PRINGLE, C. R.; EASTON, A. J. Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J Virol* [S.I.], v. 71, n. 12, p. 9849-54, Dec 1997.

RUUSKANEN, O. & OGRA P. L. Respiratory syncytial virus. *Curr probl Pediatr*, v. 23, n. 2, p. 50-79, 2003.

SCHILDGEN, O.; GEIKOWSKI, T.; GLATZEL, T.; SIMON, A.; WILKESMANN, A.; ROGGENDORF, M.; VIAZOV, S.; MATZ, B. New variant of the human metapneumovirus (HMPV) associated with an acute and severe exacerbation of asthma bronchiale. *J Clin Virol* [S.I.], v. 31, n. 4, p. 283-8, Dec 2004.

SCHOWALTER, R. M.; CHANG, A.; ROBACH, J. G.; BUCHHOLZ, U. J.; DUTCH, R. E. Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry. *J Virol* [S.I.], v. 83, n. 3, p. 1511-22, Feb 2009.

SLOOTS, T. P.; MCERLEAN, P.; SPEICHER, D. J.; ARDEN, K. E.; NISSEN, M. D.; MACKAY, I. M. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol* [S.I.], v. 35, n. 1, p. 99-102, Jan 2006.

STOCKTON, J.; STEPHENSON, I.; FLEMING, D.; ZAMBON, M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* [S.I.], v. 8, n. 9, p. 897-901, Sep 2002.

TAKIMOTO, T.; PORTNER, A. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res* [S.I.], v. 106, n. 2, p. 133-45, Dec 2004.

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. *J Virol* [S.I.], v. 82, n. 23, p. 11767-74, Dec 2008.

THOMAZELLI, L. M.; VIEIRA, S.; LEAL, A. L.; SOUSA, T. S.; OLIVEIRA, D. B.; GOLONO, M. A.; GILLIO, A. E.; STWIEN, K. E.; ERDMAN, D. D.; DURIGON, E. L. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)* [S.I.], v. 83, n. 5, p. 422-8, Sep-Oct 2007.

TSUCHIYA, L. R.; COSTA, L. M.; RABONI, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; PEREIRA, L. A.; ROTTA, I.; TAKAHASHI, G. R.; COELHO, M.; SIQUEIRA, M. M. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect* [S.I.], v. 51, n. 5, p. 401-7, Dec 2005.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; DE JONG, J. C.; GROEN, J.; KUIKEN, T.; DE GROOT, R.; FOUCHIER, R. A.; OSTERHAUS, A. D. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* [S.I.], v. 7, n. 6, p. 719-24, Jun 2001.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; BESTEBROER, T. M.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* [S.I.], v. 295, n. 1, p. 119-32, Mar 30 2002.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; VAN DOORNUM, G. J.; FOCKENS, J. C.; CORNELISSEN, J. J.; BEYER, W. E.; DE GROOT, R.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis* [S.I.], v. 188, n. 10, p. 1571-7, Nov 15 2003.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; OSTERHAUS, D. M.; FOUCHIER, R. A. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* [S.I.], v. 23, n. 1 Suppl, p. S25-32, Jan 2004.

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. *J Clin Microbiol* [S.I.], v. 41, n. 7, p. 3043-5, Jul 2003.

WALSH, E.E.; PETERSON, D.R.; FALSEY, A.R. Human metapneumovirus infections in adults: another piece of the puzzle. *Arch of Intern Med*, Chicago, v. 168, n. 22, p. 2489-2496, 2008.

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. *N Engl J Med* [S.I.], v. 350, n. 5, p. 443-50, Jan 29 2004.

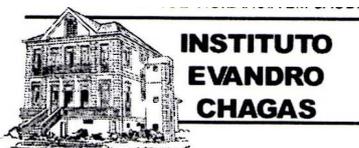
WILLIAMS, J. V.; CROWE, J. E., JR.; ENRIQUEZ, R.; MINTON, P.; PEEBLES, R. S., JR.; HAMILTON, R. G.; HIGGINS, S.; GRIFFIN, M.; HARTERT, T. V. Human metapneumovirus

infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *J Infect Dis* [S.I.], v. 192, n. 7, p. 1149-53, Oct 1 2005.

WILLIAMS, J. V.; WANG, C. K.; YANG, C. F.; TOLLEFSON, S. J.; HOUSE, F. S.; HECK, J. M.; CHU, M.; BROWN, J. B.; LINTAO, L. D.; QUINTO, J. D.; CHU, D.; SPAETE, R. R.; EDWARDS, K. M.; WRIGHT, P. F.; CROWE, J. E., JR. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *J Infect Dis* [S.I.], v. 193, n. 3, p. 387-95, Feb 1 2006.

YU, Q.; DAVIS, P. J.; LI, J.; CAVANAGH, D. Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology* [S.I.], v. 186, n. 2, p. 426-34, Feb 1992.

## ANEXO A



**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

## **ANEXO B**



**Ministério da Saúde  
Secretaria de Vigilância em Saúde  
Gabinete Permanente de Emergências de Saúde Pública**

**Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional  
ESPII**

## **PROTOCOLO DE MANEJO CLÍNICO E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DA INFLUENZA**

**O Ministério da Saúde reforça a recomendação sobre a necessidade das autoridades de saúde e todo o corpo clínico e de apoio manterem o sigilo da identidade dos casos. Esta medida visa evitar estigma social aos pacientes e resguardar o direito da inviolabilidade de sua privacidade. O não cumprimento dessa medida sujeita o infrator a ações administrativas e penais.**

**VERSÃO I**

Brasília, 08 de julho de 2009

## SUMÁRIO

### INTRODUÇÃO GERAL

#### MÓDULO 1

### MANEJO CLÍNICO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE

- 1. OBJETIVOS**
- 2. DEFINIÇÃO DE CASO**
- 3. ORIENTAÇÕES GERAIS PARA O MANEJO CLÍNICO**
  - a) Informações gerais
  - b) Avaliação simplificada de gravidade em serviços de saúde de atenção primária e secundária
- 4. INDICAÇÕES PARA O USO DO OSELTAMIVIR**
  - a) Para tratamento
  - b) Para quimioprofilaxia
  - d) Informações adicionais
- 5. ASPECTOS LABORATORIAIS**
  - a) Informações gerais
  - b) Indicação de coleta de amostras de indivíduos doentes
  - c) Técnica para coleta
  - d) Acondicionamento, transporte e envio de amostras para diagnóstico
  - e) Indicação de coleta de amostras em situação de óbito
- 6. MEDIDAS DE PRECAUÇÃO E CONTROLE A SEREM ADOTADAS NA ASSISTÊNCIA**
  - a) Informações gerais
  - b) Medidas preventivas
  - c) Quem deve adotar as medidas de precaução
  - d) Equipamentos de Proteção Individual (EPI)
  - e) Higienização das mãos
- 7. MEDIDAS A SEREM IMPLEMENTADAS NO ATENDIMENTO AMBULATORIAL E PRONTO ATENDIMENTO**
- 8. MEDIDAS A SEREM IMPLEMENTADAS NO TRANSPORTE DE PACIENTES**
- 9. ORIENTAÇÕES PARA ISOLAMENTO NO AMBIENTE HOSPITALAR**
- 10. PROCESSAMENTO DE PRODUTOS PARA SAÚDE**

- a) Informações gerais
- b) Limpeza e desinfecção
- c) Processamento de roupas d)  
Tratamento de resíduos

## INTRODUÇÃO

Diante da pandemia de influenza desencadeada pela circulação, entre seres humanos, do novo vírus da influenza A(H1N1) e com base no conhecimento atual sobre a disseminação mundial deste novo vírus, o Ministério da Saúde produziu este Protocolo com o objetivo de adaptar, destacar, complementar e padronizar as principais ações que constam no Plano Brasileiro de Preparação para uma Pandemia de Influenza (PBPPi), adequando essas medidas a este novo cenário.

A situação epidemiológica atual, no Brasil e no mundo, caracteriza-se como um cenário de uma pandemia predominantemente com casos clinicamente leves, com baixa letalidade. Diante dessa situação, a Organização Mundial de Saúde (OMS), quando da passagem para o nível seis, estratificou os países em “Com transmissão sustentada”, “Sem ocorrência de casos” e “Em transição” (ainda sem evidências de transmissão comunitária). O Brasil enquadra-se nesta última classificação e as ações propostas pela OMS para os países desse grupo incluem:

- I. Manter a notificação de casos laboratorialmente confirmados à OMS, de acordo com o RSI/2005;
- II. Descrever de forma detalhada as características clínicas, epidemiológicas e etiológicas dos primeiros 100 casos da influenza pandêmica (ou de tantos quantos for possível), visando aprimorar o conhecimento sobre a expressão da doença;
- III. Coletar informação sobre a gravidade dos quadros clínicos da doença;
- IV. Abandonar, progressivamente, a busca ativa de contatos, na medida em que a epidemia progride e que esta atividade não agrega informação nova;
- V. Adotar medidas de mitigação em antecipação à situação de transmissão sustentada, como:
  - a. Antecipação e/ou extensão de prazo das férias escolares, quando indicado;
  - b. Suspensão temporária de atividades em escolas e locais de trabalho, quando indicado pela autoridade de saúde local;

Com a chegada do inverno no hemisfério Sul, como esperado, verificou-se o aumento do número de casos de infecção por este novo vírus e a circulação concomitante com os demais vírus de influenza. A análise dos resultados 3.215 amostras clínicas processadas pelos laboratórios da FIOCRUZ/MS e do Instituto Adolfo Lutz/SES/SP demonstrou que somente 26,2% foram positivas para o novo vírus A(H1N1), 22,6% foram positivas para a gripe sazonal e 51% sequer eram infecções por qualquer vírus influenza

Este fenômeno aumenta as chances de recombinação genética deste novo vírus, podendo levar ao surgimento de novas ondas epidêmicas e eventual alteração de sua virulência. Esses fatores podem levar ao aumento da demanda por serviços de saúde ambulatoriais e hospitalares, principalmente por indivíduos com condições de risco para complicações e óbito pela doença.

Durante os últimos dois meses a estratégia de enfrentamento desta ESPII foi baseada em medidas de contenção - identificação precoce, tratamento e isolamento de casos e no seguimento de seus contatos próximos. No cenário atual esta estratégia perde importância e efetividade - fenômeno esperado na transmissão de agentes infecciosos, particularmente com as características dos vírus influenza - requerendo medidas mais integradas de monitoramento da situação epidemiológica e de priorização da assistência aos casos graves ou com potencial de complicação.

Desse modo, considerando a discussão acumulada ao longo dos últimos anos e materializada nas orientações técnicas contidas no Plano Brasileiro de Preparação para a Pandemia de Influenza (PBPPi) e a necessidade de aprimorar a vigilância da influenza no Brasil, o Ministério da Saúde atualizou o presente Protocolo, reiterando que apenas os tópicos aqui descritos devem substituir o que consta no PBPPi. As demais medidas devem ser aplicadas conforme as recomendações desse Plano.

Como toda normatização, está sujeito a ajustes decorrentes da sua utilização prática e das modificações do cenário epidemiológico. Ressalta-se que ele se aplica ao cenário epidemiológico brasileiro na atual fase pandêmica, de acordo com as orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS).

## MÓDULO 1

# MANEJO CLÍNICO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CASOS DE DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE

### 1. OBJETIVOS

- Detectar casos de doença respiratória aguda grave de maneira oportuna;
- Reduzir a ocorrência de formas graves e de óbitos;
- Monitorar as complicações da doença

### 2. CASO SUSPEITO DE DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE

Indivíduo de qualquer idade com doença respiratória aguda caracterizada por febre elevada, acompanhada de tosse **OU** dor de garganta, acompanhado ou não de manifestações gastrointestinais, **E dispnéia** ou outro sinal de gravidade, por exemplo, ausculta compatível com pneumonia ou quadro clínico, laboratorial ou radiológico compatível com pneumonia

### 3. ORIENTAÇÕES GERAIS PARA O MANEJO CLÍNICO

#### a) Informações gerais

No indivíduo com manifestações clínicas compatíveis com doença respiratória aguda grave, deve-se:

- Utilizar equipamentos de proteção individual conforme orientações nesse Protocolo;
- Realizar avaliação clínica minuciosa
- Coletar amostra de secreção nasofaríngea e de sangue, até o 7º dia de início dos sintomas;
- Recomenda-se fortemente internar o paciente, dispensando-se todos os cuidados que o caso requer.

**Importante:** Para menores de 18 anos de idade é contra-indicado o uso de salicilatos em casos suspeitos ou confirmados de infecção por vírus influenza, por causa do risco de desenvolvimento da Síndrome de Reye.

#### b. Fatores de risco para complicações por influenza

- **Idade:** inferior a dois ou superior a 60 anos de idade;
- **Imunodepressão:** por exemplo, pacientes com câncer, em tratamento para aids ou em uso regular de medicação imunossupressora;
- **Condições crônicas:** por exemplo, hemoglobinopatias, diabetes *mellitus*; cardiopatias, pneumopatias e doenças renais crônicas
- **Gestação**

#### c) Avaliação simplificada de gravidade em serviços de saúde de atenção primária e secundária

A presença de pelo menos **UM** dos sinais abaixo deve alertar o médico para o encaminhamento do paciente ao hospital de referência definido pela SES

#### **c.1. Avaliação em adultos**

- Confusão mental
- Frequência Respiratória > 30 mrm
- PA diastólica < 60 mmHg ou PA sistólica < 90 mmHg
- Idade > 65 anos de idade

#### **c.2. Avaliação em crianças**

- Toxemia
- Tiragem intercostal
- Desidratação/Vômitos/Inapetência
- Estado geral comprometido
- Dificuldades familiares em medicar e observar cuidadosamente
- Presença de co-morbidades/Imunodepressão

## **4. ASPECTOS LABORATORIAIS**

### **a) Informações gerais**

- § Os agentes infecciosos prioritários para investigação etiológica são os vírus influenza e os agentes etiológicos responsáveis por quadros de pneumonia bacteriana.
- § As amostras de secreções respiratórias devem ser coletadas preferencialmente até o 3º (terceiro) dia após o início dos sintomas, no máximo até o 7º (sétimo) dia.
- § A técnica de diagnóstico preconizada pela OMS para confirmação laboratorial do novo vírus Influenza A(H1N1) é o RT-PCR.
- § Não é recomendada a metodologia de Imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção desse novo subtipo de Influenza A(H1N1), no momento atual.
- § O processamento das amostras de secreção respiratória de casos suspeitos para o diagnóstico de infecção pelo novo vírus Influenza A(H1N1) será realizado exclusivamente pelos Laboratórios de Referência (LR):
  - Instituto Adolfo Lutz (IAL/SP) em São Paulo;
  - Instituto Evandro Chagas (IEC/PA) no Pará;
  - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ) no Rio de Janeiro.
- § Considerando as normas de biossegurança vigentes no país e as recomendações da OMS, o Ministério da Saúde reitera que a coleta de amostras de material humano seja realizada rigorosamente dentro das normas de biossegurança preconizadas para essa situação.
- § Os LACEN poderão processar amostras de sangue ou outras amostras clínicas que não sejam do trato respiratório para subsidiar o diagnóstico diferencial, conforme as hipóteses diagnósticas elencadas no hospital de referência e desde que façam parte da

lista de exames próprios desta rede de laboratórios, adotando-se as medidas de biossegurança preconizadas para cada situação.

**O exame laboratorial para diagnóstico específico de influenza A (H1N1) somente está indicado, segundo avaliação do médico assistente, para:**

- (i) Acompanhar casos de doença respiratória aguda grave**
- (ii) Em amostras de casos de surtos de síndrome gripal em comunidades fechadas**

#### **b) Indicação para a coleta de amostras no indivíduo doente**

Diante de um caso suspeito de doença respiratória aguda grave (apresentando ou não fator de risco para complicações) ou indivíduos com síndrome gripal com fatores de risco para complicações, de acordo com a indicação médica, poderão ser coletadas amostras clínicas de:

- **Secreção nasofaringeana:** para detecção de vírus influenza
- **Sangue para hemocultura:** para realização de pesquisa de agentes microbianos e avaliação da resistência antimicrobiana.
- **Outras amostras clínicas:** serão utilizadas apenas para monitoramento da evolução clínica do paciente e/ou para realização de diagnóstico diferencial, conforme hipóteses elencadas pelo médico do hospital de referência e as evidências geradas pela investigação epidemiológica.

### **ATENÇÃO**

**O Ministério da Saúde alerta aos profissionais de saúde e aos familiares de indivíduos com doença respiratória aguda grave que as condutas clínicas não dependem do resultado do exame laboratorial específico para influenza A(H1N1).**

**O Ministério da Saúde esclarece ainda que este exame, quando indicado, demanda um tempo maior de realização, pela complexidade da técnica utilizada.**

#### **b.1) Técnica para a coleta**

- § Preferencialmente, utilizar a técnica de aspirado de nasofaringe com frasco coletor de secreção, pois a amostra obtida por essa técnica pode concentrar maior número de células.
- § Na impossibilidade de utilizar a técnica de aspirado de nasofaringe, como alternativa, poderá ser utilizada a técnica de swab combinado de nasofaringe e orofaringe, exclusivamente com swab de rayon.
- § Não deverá ser utilizado swab de algodão, pois o mesmo interfere nas metodologias moleculares utilizadas.

- § As amostras de secreção respiratória coletadas devem ser mantidas em temperatura adequada de refrigeração (4 a 8°C) e encaminhadas aos LACEN no mesmo dia da coleta.
- § Efetuar a coleta de duas amostras de sangue para sorologia, sendo uma na fase aguda e outra na fase convalescente (15 dias após início dos sintomas). Uma vez obtido o soro, estes devem ser congelados a -20°C e encaminhados ao LACEN, onde serão submetidos à análise para outros possíveis agentes etiológicos.

## **b.2) Acondicionamento, transporte e envio de amostras para diagnóstico**

Todas as unidades coletoras (unidades de saúde) deverão encaminhar as amostras ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) de seu Estado ou Distrito Federal acompanhadas da ficha epidemiológica devidamente preenchida.

As amostras deverão ser colocadas em caixas (térmicas) de paredes rígidas, que mantenham a temperatura adequada de refrigeração (4 a 8°C) até a chegada ao LACEN.

O LACEN deverá acondicionar a amostra em caixas específicas para Transporte de Substâncias Infecciosas, preferencialmente em gelo seco. Na impossibilidade de obter gelo seco, a amostra poderá ser congelada a -70°C e encaminhada em gelo reciclável.

O envio e a comunicação com a informação do “número de conhecimento aéreo” devem ser imediatos para o respectivo laboratório de referência. O transporte deve obedecer as Normas da Associação Internacional de Transporte Aéreo (IATA).

## **c) Indicação para a coleta de amostras em situação de óbito**

### **c.1. Informações gerais**

Recomenda-se a coleta de espécimes para diagnóstico post-mortem de casos de doença respiratória aguda grave **sem diagnóstico etiológico prévio em situações especiais indicadas pela vigilância epidemiológica**, nos locais onde seja viável a realização das técnicas de coleta de amostras abaixo especificadas.

Os ácidos nucléicos virais podem ser detectados em diversos tecidos, principalmente de brônquios e pulmões, que constituem espécimes de escolha para o diagnóstico laboratorial de vírus influenza pela técnica de Transcrição Reversa associada à Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (RT-PCR). No entanto, considerando a principal infecção secundária à influenza, foram contempladas neste item orientações para coleta de amostras para o diagnóstico bacteriano diferencial, bem como para o diagnóstico histopatológico.

### **c.2. Coleta dos espécimes teciduais**

Devem ser coletados, no mínimo, oito fragmentos de cada tecido (listados abaixo) com dimensões aproximadas de 1 a 3 cm. Amostras de outros sítios das vias aéreas também podem ser submetidas a culturas e a ensaios moleculares. Colocar em recipientes separados e devidamente identificados as amostras coletadas de órgãos diferentes.

### **c.3. Pontos anatômicos de coleta de amostras**

1. Da região central dos brônquios (hilar), dos brônquios direito e esquerdo e da traquéia proximal e distal;
2. Do parênquima pulmonar direito e esquerdo;
3. Das tonsilas e mucosa nasal;
4. De pacientes com suspeita de miocardites, encefalites e rabdomiólise podem ser coletados fragmentos do miocárdio (ventrículo direito e esquerdo), SNC (córtex cerebral, gânglios basais, ponte, medula e cerebelo) e músculo esquelético, respectivamente;
5. Espécimes de qualquer outro órgão, mostrando aparente alteração macroscópica, podem ser encaminhados para investigação da etiologia viral.

### **c.4. Acondicionamento das amostras**

#### **c.4.1. Para diagnóstico Viral**

- § As amostras frescas coletadas de diferentes sítios das vias respiratórias ou qualquer outra localização anatômica devem ser acondicionadas individualmente, em recipientes estéreis e imersas em meio de transporte viral ou solução salina tamponada (PBS pH 7.2) suplementados com antibióticos.
- § Imediatamente após a coleta, os espécimes identificados com sua origem tecidual, devem ser congelados e transportados em gelo seco.

#### **c.4.2. Para diagnóstico diferencial bacteriano**

- § As amostras frescas coletadas de diferentes sítios das vias respiratórias ou qualquer outra localização anatômica devem ser acondicionadas individualmente, em recipientes estéreis e imersas em solução salina tamponada (PBS pH 7.2) sem antibióticos.
- § Imediatamente após a coleta, os espécimes identificados com sua origem tecidual, devem ser mantidos e transportados sob refrigeração (4° C) ao laboratório para diagnóstico.

#### **c.4.3. Para diagnóstico histopatológico**

- § A coleta de amostras para realização do diagnóstico histopatológico deve ser feita observando-se os protocolos em vigência nos serviços locais de patologia.
- § Acondicionar as amostras em frasco de vidro com boca larga com formalina tamponada a 10%.
- § Utilizar parafina sem compostos adicionais (por exemplo: cera de abelha, cera de carnaúba, etc.) no processo de parafinização dos fragmentos.

### **c.5. Envio de amostras e documentação necessária**

- § Resumo do histórico clínico;

- § Cópia do laudo preliminar ou conclusivo da necropsia;
  - § Cópia de qualquer resultado laboratorial pertinente;
  - § Ficha completa de identificação do indivíduo e o endereço para envio do resultado laboratorial.
- **Nota 1:** Todas as amostras de tecidos deverão ser encaminhadas seguindo as normas de acondicionamento e transporte de substâncias infecciosas da IATA.
  - **Nota 2:** Após o embarque da amostra, o Laboratório de Referência deverá ser informado do número do conhecimento aéreo para o monitoramento da recepção do material enviado.

#### c.5.1. Destinatários para envio das amostras

- **Laboratório:** Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS  
**Destinatário:** Dr. Wyller Mello  
**Endereço:** Rodovia. BR 316, Km 07, S/N CEP: 67.030.000. Ananindeua – PA  
**Telefone:** 91-32142013/2024 E-mail: [wyllermello@iec.pa.gov.br](mailto:wyllermello@iec.pa.gov.br)
  
- **Laboratório:** Laboratório de vírus Respiratórios/ FIOCRUZ/MS  
**Destinatário:** Dra Marilda Siqueira  
**Endereço:** Pavilhão Helio e Peggy Pereira, sala B106 - Av. Brasil, 4365 CEP: 21045-900 Rio de Janeiro  
**Telefone:** 21-2562 1778 E-mail: [mmsiq@ioc.fiocruz.br](mailto:mmsiq@ioc.fiocruz.br)
  
- **Laboratório:** Seção de Anatomia Patológica-Divisão de Patologia - Instituto Adolfo Lutz  
**Destinatário:** Dra. Marina Suheko Oyafuso  
**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo, 355- 7º Andar CEP: 012046-902 – São Paulo – SP  
**Telefone:** 11-30682872 E-mail: [moyafuso@ial.sp.gov.br](mailto:moyafuso@ial.sp.gov.br)

#### c.5.2. Recebimento dos resultados

Todos os resultados serão encaminhados de forma concomitante para as secretarias estaduais de saúde e para a SVS/MS.

## 5. INDICAÇÕES PARA O USO DO OSELTAMIVIR

### a) Para tratamento

Este medicamento deve ser utilizado em, no máximo, **até 48 horas** a partir da data de início dos sintomas, observando-se as recomendações do fabricante constantes na bula do medicamento. Como em toda prescrição terapêutica, atentar para as interações medicamentosas, as contra-indicações formais e os efeitos colaterais. Este medicamento pode ainda induzir

resistência dos vírus influenza, se utilizado de forma indiscriminada. Segundo a orientação do fabricante, o Oseltamivir deve ser usado durante a gravidez somente se o benefício justificar o risco potencial para o feto.

São elegíveis para tratamento:

**Indivíduos com doença respiratória aguda grave e seus contatos** próximos que também apresentem doença respiratória aguda grave

**O Ministério da Saúde alerta que todos os indivíduos com síndrome gripal que apresentam fator de risco para as complicações de influenza, requerem - obrigatoriamente - avaliação e monitoramento clínico constante de seu médico assistente, para indicação ou não de tratamento com Oseltamivir, além da adoção de todas as demais medidas terapêuticas.**

#### a.1) Dosagem recomendada

A dose recomendada é de 75 mg duas vezes ao dia, por cinco dias, para adultos. Para crianças acima de um ano de idade e com menos de 40 kg as doses variam de acordo com o peso, conforme especificação a seguir:

**Tabela de dosagem por peso e frequência diária**

Peso	Dose	Frequência
Menos de 15 kg	30mg	Duas vezes ao dia
De 15 a 23 kg	45mg	Duas vezes ao dia
De 23 a 40 kg	60mg	Duas vezes ao dia
Acima de 40 kg	75mg	Duas vezes ao dia

#### b) Quimioprofilaxia

Está absolutamente contra indicado o uso do Oseltamivir para quimioprofilaxia em larga escala.

O uso deste medicamento para profilaxia está indicado **APENAS** nas seguintes situações:

- Os profissionais de laboratório que tenham manipulado amostras clínicas que contenham a nova Influenza A(H1N1) sem o uso de EPI (Equipamento de proteção individual) ou que utilizaram de maneira inadequada;
- Os trabalhadores de saúde que estiveram envolvidos na realização de procedimentos invasivos (geradores de aerossóis) ou manipulação de secreções de um caso suspeito ou confirmado de infecção pela nova Influenza A(H1N1) sem ou uso de EPI ou que utilizaram de maneira inadequada;

**b.1) ) Dosagem recomendada: 75 mg uma vez ao dia, por dez dias.**

### c) Informações adicionais

Os pacientes que desenvolvem efeitos colaterais gastrointestinais graves podem reduzir a absorção oral do Oseltamivir. Porém, atualmente, não há nenhuma evidência científica para sugerir o aumento da dose ou do período de utilização do antiviral, nesta situação.

Para os pacientes que vomitam até uma hora após a ingestão do medicamento, pode ser administrada uma dose adicional, conforme esquema acima.

Tão importante quanto o tratamento específico para a doença respiratória aguda grave é imperativo a adoção oportuna de todas as medidas de suporte clínico ao paciente, segundo avaliação médica de cada caso, além do uso das medidas não farmacológicas.

Importante:

- Se for afastado o diagnóstico de infecção por qualquer vírus influenza, suspender a administração do Oseltamivir;
- Na ficha de notificação, atualizar ou incluir no campo “informações adicionais” as atualizações sobre data de início do tratamento com Oseltamivir e as medidas complementares adotadas.
- A notificação de eventos adversos ao medicamento deve ser feita à ANVISA por meio do endereço eletrônico [anvisa@saude.gov.br](mailto:anvisa@saude.gov.br). Maiores informações acesse [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).

## 6. MEDIDAS DE PRECAUÇÃO E CONTROLE A SEREM ADOTADAS NA ASSISTÊNCIA

### a) Informações gerais

Com o aumento do número de casos de influenza A(H1N1), o que gerou um maior conhecimento sobre a epidemiologia viral, observou-se a necessidade de revisão das medidas de precaução e controle a serem instituídas nos serviços de saúde.

Atualmente, as evidências sugerem que o vírus da influenza A(H1N1) está apresentando uma dinâmica de transmissão semelhante à da influenza sazonal. Sendo assim, recomenda-se que sejam instituídas medidas de precaução para gotícula e precaução padrão na assistência a casos suspeitos e confirmados de infecção pelo vírus da influenza A(H1N1) nos serviços de saúde. Entretanto, para procedimentos com risco de geração de aerossol, enfatiza-se que deve-se incluir as precauções para aerossóis.

### b) Medidas preventivas

É importante destacar que a adoção de medidas de precaução devem estar sempre associada a outras medidas preventivas, tais como:

- Freqüente higienização das mãos.
- Utilizar lenço descartável para higiene nasal;
- Cobrir nariz e boca quando espirrar ou tossir;
- Evitar tocar mucosas de olhos, nariz e boca;
- Higienizar as mãos após tossir ou espirrar;

- Evitar tocar superfícies com luvas ou outro EPI contaminados ou com mãos contaminadas. As superfícies envolvem aquelas próximas ao paciente (ex. mobiliário e equipamentos para a saúde) e aquelas fora do ambiente próximo ao paciente, porém relacionadas ao cuidado com o paciente (ex. maçaneta, interruptor de luz, chave, caneta, entre outros);
- Não circular dentro do hospital usando os EPI; estes devem ser imediatamente removidos após a saída do quarto, enfermaria ou área de isolamento;
- Restringir a atuação de profissionais de saúde com doença respiratória aguda na assistência ao paciente.

### **c) Quem deve adotar as medidas de precaução**

- Todos os profissionais de saúde que prestam assistência direta ao paciente (ex.: médicos, enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem, fisioterapeutas, equipe de radiologia, entre outros);
- Toda a equipe de suporte, que necessite entrar no quarto, enfermaria ou área de isolamento, incluindo pessoal de limpeza, nutrição e responsáveis pela retirada de produtos e roupas sujas da unidade de isolamento. Porém recomenda-se que o mínimo de pessoas entre no isolamento;
- Todos os profissionais de laboratório, durante coleta, transporte e manipulação de amostras de pacientes com infecção por influenza A(H1N1);
- Familiares e visitantes que tenham contato com pacientes com infecção por influenza A(H1N1);
- Os profissionais de saúde que executam o procedimento de verificação de óbito.
- Outros profissionais que entram em contato com pacientes com infecção por influenza A(H1N1).

**Nota 1:** Os pacientes com infecção por Influenza A(H1N1) devem utilizar máscara cirúrgica desde o momento em que for identificada a suspeita da infecção até a chegada no local de isolamento.

**Nota 2:** Ressalta-se a necessidade do uso racional de EPI nos serviços de saúde.

### **d) Equipamentos de Proteção Individual - EPI**

#### **d.1) Máscara cirúrgica**

Deve ser utilizada para evitar a contaminação do profissional por gotículas respiratórias, quando o mesmo atuar a uma distância inferior a 1 metro do paciente suspeito ou confirmado de infecção pelo vírus da influenza.

### **d.2) Máscara de proteção respiratória (Respirador Particulado)**

Quando o profissional atuar em procedimentos com risco de geração de aerossol nos pacientes com infecção por influenza deve utilizar a máscara de proteção respiratória (respirador particulado) com eficácia mínima na filtração de 95% de partículas de até 0,3 $\mu$  (tipo N95, N99, N100, PFF2 ou PFF3).

São exemplos de procedimentos com risco de geração de aerossóis: a intubação traqueal, a aspiração nasofaríngea e nasotraqueal, broncoscopia, a autópsia envolvendo tecido pulmonar e a coleta de espécime clínico para diagnóstico etiológico da influenza, dentre outros.

A máscara de proteção respiratória deverá estar apropriadamente ajustada à face. A forma de uso, manipulação e armazenamento deve seguir as recomendações do fabricante. Deve ser descartada após o uso.

### **d.3) Luvas**

As luvas procedimentos não cirúrgicos devem ser utilizadas quando houver risco de contato das mãos do profissional com sangue, fluidos corporais, secreções, excreções, mucosas, pele não íntegra e artigos ou equipamentos contaminados, de forma a reduzir a possibilidade de transmissão do vírus da influenza para o profissional, assim como, de paciente para paciente por meio das mãos do profissional.

Quando o procedimento a ser realizado no paciente exigir técnica asséptica, deve ser utilizada luvas estéreis (de procedimento cirúrgico).

As recomendações quanto ao uso de luvas por profissionais de saúde são:

- Troque as luvas sempre que entrar em contato com outro paciente;
- Troque também durante o contato com o paciente se for mudar de um sítio corporal contaminado para outro, limpo, ou quando esta estiver danificada;
- Nunca toque desnecessariamente superfícies e materiais (tais como telefones, maçanetas, portas) quando estiver com luvas para evitar a transferência vírus para outros pacientes ou ambientes;
- Não lavar ou usar novamente o mesmo par de luvas (as luvas não devem ser reutilizadas);
- O uso de luvas não substitui a higienização das mãos;
- Proceder à higienização das mãos imediatamente após a retirada das luvas, para evitar a transferência do vírus para outros pacientes ou ambientes;
- Observe a técnica correta de remoção de luvas para evitar a contaminação das mãos, abaixo descrita:
- Retire as luvas puxando a primeira pelo lado externo do punho com os dedos da mão oposta;
- Segure a luva removida com a outra mão enluvada;
- Toque a parte interna do punho da mão enluvada com o dedo indicador oposto (sem luvas) e retire a outra luva.

#### **d.4) Protetor Ocular ou Protetor de Face**

Os óculos de proteção (ou protetor de face) devem ser utilizados quando houver risco de exposição do profissional a respingo de sangue, secreções corporais e excreções.

Os óculos devem ser exclusivos de cada profissional responsável pela assistência, devendo, após o uso, sofrer processo de limpeza com água e sabão/detergente e desinfecção. Sugere-se para a desinfecção álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 1% ou outro desinfetante recomendado pelo fabricante.

#### **d.5) Gorro descartável**

O gorro deve ser utilizado pelo profissional de saúde apenas em situações de risco de geração de aerossol em pacientes com infecção por influenza A (H1N1).

#### **d.6) Capote/avental**

O capote ou avental deve ser usado durante procedimentos onde há risco de respingos de sangue, fluidos corpóreos, secreções e excreções, a fim de evitar a contaminação da pele e roupa do profissional.

O capote ou avental deve ser de mangas longas, punho de malha ou elástico e abertura posterior. Além disso, deve ser confeccionado de material de boa qualidade, não alergênico e resistente; proporcionar barreira antimicrobiana efetiva, permitir a execução de atividades com conforto e estar disponível em vários tamanhos.

O capote ou avental sujo deve ser removido após a realização do procedimento. Após a remoção do capote deve-se proceder a higienização das mãos para evitar transferência do vírus A (H1N1) para o profissional, pacientes e ambientes.

#### **e) Higienização das mãos**

As mãos dos profissionais que atuam em serviços de saúde podem ser higienizadas utilizando-se: água e sabonete, preparação alcoólica e anti-séptica degermante.

Os profissionais de saúde, pacientes e visitantes devem ser devidamente instruídos e monitorados quanto à importância da higienização das mãos.

##### **e.1. Higienização das mãos com água e sabonete**

A higienização das mãos com água e sabonete é essencial quando as mãos estão visivelmente sujas ou contaminadas com sangue ou outros fluidos corporais. A higienização das mãos com água e sabonete deve ser realizada:

- Antes e após o contato direto com pacientes com influenza, seus pertences e ambiente próximo, bem como na entrada e na saída de áreas com pacientes infectados;
- Imediatamente após retirar as luvas;
- Imediatamente após contato com sangue, fluidos corpóreos, secreções, excreções e/ou objetos contaminados, independentemente se o mesmo tiver ocorrido com ou sem o uso de luvas (neste último caso, quando se tratar de um contato inadvertido).

- Entre procedimentos em um mesmo paciente, para prevenir a transmissão cruzada entre diferentes sítios corporais;
- Em qualquer outra situação onde seja indicada a higienização das mãos para evitar a transmissão da influenza para outros pacientes ou ambientes.

### **e.2. Técnica “Higienização Simples das Mãos com Água e Sabonete”**

- Retirar acessórios (anéis, pulseiras, relógio), uma vez que sob estes objetos acumulam-se microrganismos não removidos com a lavagem das mãos;
- Abrir a torneira e molhar as mãos, evitando encostar-se na pia;
- Aplicar na palma da mão quantidade suficiente de sabonete líquido para cobrir todas as superfícies das mãos (seguir a quantidade recomendada pelo fabricante).
- Ensaboar as palmas das mãos, friccionando-as entre si;
- Esfregar a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa;
- Entrelaçar os dedos e friccionar os espaços interdigitais;
- Esfregar o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta, segurando os dedos, com movimento de vai-e-vem e vice-versa;
- Esfregar o polegar direito, com o auxílio da palma da mão esquerda, utilizando-se movimento circular e vice-versa;
- Friccionar as polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita, fechada em concha, fazendo movimento circular e vice-versa;
- Esfregar o punho esquerdo, com o auxílio da palma da mão direita, utilizando movimento circular e vice-versa;
- Enxaguar as mãos, retirando os resíduos de sabonete. Evitar contato direto das mãos ensaboadas com a torneira;
- Secar as mãos com papel toalha descartável, iniciando pelas mãos e seguindo pelos punhos. No caso de torneiras com contato manual para fechamento, sempre utilize papel toalha.
- Duração do Procedimento: 40 a 60 segundos.

### **e.3. Higienização das mãos com preparação alcoólica**

Sabe-se que o vírus da influenza sazonal é rapidamente inativado em 30 segundos após anti-sepsia das mãos com álcool 70%. Determinados vírus envelopados (ex: herpes simples, HIV, influenza, vírus respiratório sincicial) são susceptíveis ao álcool quando testados in vitro.

Deve-se higienizar as mãos com preparação alcoólica (sob as formas gel ou solução) quando estas não estiverem visivelmente sujas.

A higienização das mãos com preparação alcoólica (sob a forma gel ou líquida com 1-3% glicerina) deve ser realizada nas situações descritas a seguir:

- Antes de contato com o paciente;
- Após contato com o paciente;
- Antes de realizar procedimentos assistenciais e manipular dispositivos invasivos;
- Antes de calçar luvas para inserção de dispositivos invasivos que não requeiram preparo cirúrgico;
- Após risco de exposição a fluidos corporais;
- Ao mudar de um sítio corporal contaminado para outro, limpo, durante o cuidado ao paciente;
- Após contato com objetos inanimados e superfícies imediatamente próximas ao paciente;
- Antes e após remoção de luvas.

#### **e.4. Técnica “Fricção Anti-séptica das Mãos (com Preparações Alcoólicas)”**

- Aplicar na palma da mão quantidade suficiente do produto para cobrir todas as superfícies das mãos (seguir a quantidade recomendada pelo fabricante);
- Friccionar as palmas das mãos entre si;
- Friccionar a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa;
- Friccionar a palma das mãos entre si com os dedos entrelaçados;
- Friccionar o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta, segurando os dedos e vice-versa;
- Friccionar o polegar direito, com o auxílio da palma da mão esquerda, utilizando-se movimento circular e vice-versa;
- Friccionar as polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita, fazendo um movimento circular e vice-versa;
- Friccionar os punhos com movimentos circulares;
- Friccionar até secar espontaneamente. Não utilizar papel toalha.
- Duração do Procedimento: 20 a 30 segundos.

Publicações e materiais sobre o tema se encontram no seguinte endereço eletrônico:

<http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/publicacoes.htm>

## **7. MEDIDAS A SEREM IMPLEMENTADAS NO ATENDIMENTO AMBULATORIAL E PRONTO ATENDIMENTO**

As seguintes medidas devem ser observadas pelos serviços de saúde que prestam atendimento ambulatorial e pronto atendimento a casos de síndrome gripal ou doença respiratória aguda grave.

- Estabelecer critérios de triagem para identificação e pronto atendimento dos casos;
- Orientar os profissionais do serviço quanto às medidas de precaução a serem adotadas;
- Colocar máscara cirúrgica nos pacientes suspeitos de doença respiratória aguda grave, desde que a situação clínica do caso permita;
- Pacientes suspeitos de doença respiratória aguda grave devem utilizar máscara cirúrgica desde o momento da triagem até o encaminhamento para o hospital de referência;
- Orientar os pacientes a adotar as medidas de e higienizar as mãos após tossir ou espirrar;
- Prover lenço descartável para higiene nasal na sala de espera.
- Prover lixeira, preferencialmente, com acionamento por pedal para o descarte de lenços e lixo;
- Prover dispensadores com preparações alcoólicas para as mãos (sob as formas gel ou solução) nas salas de espera e estimular a higienização das mãos após contato com secreções respiratórias;
- Prover condições para higienização simples das mãos: lavatório/pia com dispensador de sabonete líquido, suporte para papel toalha, papel toalha, lixeira com tampa e abertura sem contato manual;
- Manter os ambientes ventilados;
- Realizar a limpeza e desinfecção das superfícies do consultório e de outros ambientes utilizados pelo paciente;
- Realizar a limpeza e desinfecção de equipamentos e produtos para saúde que tenha sido utilizado na atenção ao paciente;
- Se houver necessidade de encaminhamento do paciente para outro serviço de saúde, notificar previamente o serviço referenciado.

## **8. MEDIDAS A SEREM IMPLEMENTADAS NO TRANSPORTE DE PACIENTES**

- Os profissionais envolvidos no transporte devem adotar as medidas de precaução para gotícula e precaução padrão.
- Melhorar a ventilação do veículo para aumentar a troca de ar durante o transporte.
- As superfícies internas do veículo devem ser limpas e desinfetadas após a realização do transporte. A desinfecção pode ser feita com álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 1% ou outro desinfetante indicado para este fim.
- Notificar previamente o serviço de saúde para onde o paciente será encaminhado.

## **9. ORIENTAÇÕES PARA ISOLAMENTO NO AMBIENTE HOSPITALAR**

### **a) Isolamento em quarto privativo dos casos de doença respiratória aguda grave**

O isolamento, quando indicado, deve ser realizado em um quarto privativo com vedação na porta e bem ventilado.

**b) Isolamento por coorte**

Considerando a possibilidade de aumento do número de casos com complicações, se o hospital não possuir quartos privativos disponíveis em número suficiente para atendimento de todos aqueles que requeiram internação, deve ser estabelecido o isolamento por coorte, ou seja, separar em uma mesma enfermaria ou unidade os pacientes com infecção por influenza. Se existir um grande número de pacientes infectados, deve ser definida área específica do hospital para isolamento dos casos. É fundamental que seja mantida uma distância mínima de 1 metro entre os leitos.

Os profissionais de saúde que atuam na assistência direta de pacientes com influenza suspeita ou confirmada devem ser organizados para trabalhar somente na área de isolamento de influenza, não podendo circular em outra área de assistência.

**c) Outras orientações**

- O quarto, enfermaria e área de isolamento devem ter a entrada sinalizada com alerta referindo isolamento para doença respiratória, a fim de evitar a passagem de pacientes e visitantes de outras áreas ou de profissionais que estejam trabalhando em outros locais do hospital. O acesso deve ser restrito aos profissionais envolvidos na assistência;
- Também deve estar sinalizado quanto às medidas de precaução (gotículas e padrão) a serem adotadas;
- Imediatamente antes da entrada do quarto, enfermaria e área de isolamento devem ser disponibilizadas: condições para higienização das mãos: dispensador de preparação alcoólica (gel ou solução a 70%), lavatório/pia com dispensador de sabonete líquido, suporte para papel toalha, papel toalha, lixeira com tampa e abertura sem contato manual;

**10. PROCESSAMENTO DE PRODUTOS PARA SAÚDE****a) Informações gerais**

Não há uma orientação especial quanto processamento de equipamentos, produtos para saúde ou artigos utilizados na assistência a pacientes com infecção por influenza, sendo que o mesmo deve ser realizado de acordo com as características e finalidade de uso e orientação dos fabricantes e dos métodos escolhidos.

Equipamentos, produtos para saúde ou artigos para saúde utilizados em qualquer paciente deve ser recolhidos e transportados de forma a prevenir a possibilidade de contaminação de pele, mucosas e roupas ou a transferência de microrganismos para outros pacientes ou ambientes. Por isso é importante frisar a necessidade da adoção das medidas de precaução na manipulação dos mesmos.

O serviço de saúde deve estabelecer fluxos, rotinas de retirada e de todas as etapas do processamento dos equipamentos, produtos para saúde ou artigos utilizados na assistência.

**b) Limpeza e desinfecção**

A orientação sobre a limpeza e desinfecção de superfícies em contato com pacientes com infecção por influenza A(H1N1) é a mesma utilizada para outros tipos de doença respiratória.

Recomenda-se que a limpeza das áreas de isolamento para influenza seja concorrente, imediata ou terminal. A limpeza concorrente é aquela realizada diariamente; a limpeza terminal é aquela realizada após a alta, óbito ou transferência do paciente; e a limpeza imediata é aquela realizada em qualquer momento, quando ocorrem sujidades ou contaminação do ambiente e equipamentos com matéria orgânica, mesmo após ter sido realizado a limpeza concorrente.

A desinfecção de superfícies das unidades de isolamento deve ser realizada após a sua limpeza. Os desinfetantes com potencial para desinfecção de superfícies incluem aqueles à base de cloro, alcoóis, alguns fenóis e alguns iodóforos e o quaternário de amônio. Sabe-se que o vírus da influenza sazonal é inativado pelo álcool a 70% e pelo cloro. Portanto, preconiza-se a limpeza das superfícies do isolamento com detergente neutro seguida da desinfecção com uma destas soluções desinfetantes.

No caso da superfície apresentar matéria orgânica visível deve-se inicialmente proceder à retirada do excesso com papel/tecido absorvente e posteriormente realizar a limpeza e desinfecção desta. Ressalta-se a necessidade da adoção das medidas de precaução.

### **c) Processamento de roupas**

Não é preciso adotar um ciclo de lavagem especial para as roupas provenientes desses pacientes, podendo ser seguido o mesmo processo estabelecido para as roupas provenientes de outros pacientes em geral. Ressaltam-se as seguintes orientações:

- Na retirada da roupa suja deve haver o mínimo de agitação e manuseio, observando-se as medidas de precauções descritas anteriormente
- Roupas provenientes do isolamento não devem ser transportadas através de tubos de queda.
- Devido ao risco de promover partículas em suspensão e contaminação do trabalhador não é recomendada a manipulação, separação ou classificação de roupas sujas provenientes do isolamento. As mesmas devem ser colocadas diretamente na lavadora.

### **d) Tratamento de resíduos**

O vírus da influenza sazonal é enquadrado como agente biológico classe 2 e o risco de transmissibilidade deste agente a partir dos resíduos é baixo. Portanto, os resíduos provenientes da atenção a pacientes suspeitos ou confirmados de infecção pelo vírus influenza A (H1N1) devem ser enquadrados na categoria A4, conforme Resolução RDC/Anvisa nº 306, de 07 de dezembro de 2004 (disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php> <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/home.php>). Os mesmos devem ser acondicionados, em saco branco leitoso, que devem ser substituídos quando atingirem 2/3 de sua capacidade ou pelo menos 1 vez a cada 24 horas e identificados pelo símbolo de substância infectante, com rótulos de fundo branco, desenho e contornos pretos. Os sacos devem estar contidos em recipientes de material lavável, resistente à punctura, ruptura e vazamento, com tampa provida de sistema de abertura sem contato manual, com cantos arredondados e ser resistente ao tombamento.

Estes resíduos podem ser dispostos, sem tratamento prévio, em local devidamente licenciado para disposição final de resíduos sólidos de serviços de saúde. Ressalta-se que conforme a RDC/Anvisa nº 306/04 os serviços de saúde devem elaborar um plano de gerenciamento de resíduos.

## 11. ANEXO

**Figura 1. Procedimentos para colocação e retirada de EPI em unidades de isolamento (OMS, 2006)**

