

Índice

	Página
Lista de abreviaturas	4
Lista de figuras	6
Resumo	7
Abstract	9
1. Introdução	11
2. Material e métodos	13
3. Infecções respiratórias virais – contextualização	14
4. Metapneumovírus humano	18
4.1. Descoberta, taxonomia e características biológicas	18
4.2. Epidemiologia	20
4.3. Clínica e diagnóstico	21
4.4. Tratamento	25
5. Coronavírus associado à síndrome respiratória aguda severa, coronavírus NL63 e coronavírus HKU1	27
5.1. Descoberta, taxonomia e características biológicas	27
5.2. Epidemiologia	31
5.3. Clínica e diagnóstico	33
5.4. Tratamento	36
6. Bocavírus humano	38
6.1. Descoberta, taxonomia e características biológicas	38
6.2. Epidemiologia	40
6.3. Clínica e diagnóstico	42

6.4. Tratamento	44
7. Discussão e conclusão	45
Agradecimentos	49
Referências bibliográficas	50

Lista de abreviaturas

ADN – ácido desoxirribonucleico

ARN – ácido ribonucleico

CoV HKU1 – coronavírus HKU1

CoV NL63 – coronavírus NL63

CoV-SARS – coronavírus associado à síndrome respiratória aguda severa

DALYs – anos de vida ajustados por incapacidade

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crónica

ECA – enzima de conversão da angiotensina

ECMO – oxigenação por membrana extracorporal

ELISA – ensaio imunoenzimático

HBoV – bocavírus humano

hMPV – metapneumovírus humano

IC – insuficiência cardíaca

IFN – interferão

IL – interleucina

IRC – insuficiência renal crónica

MHC-I – complexo *major* de histocompatibilidade de classe I

OMA – otite média aguda

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – *open reading frames*

PAC – pneumonia adquirida na comunidade

PCR – reação em cadeia da polimerase

RFLPs – polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição

SARS – síndrome respiratória aguda severa

SDRA – síndrome de dificuldade respiratória aguda (igualmente designada por síndrome de insuficiência respiratória aguda)

UCI – unidade de cuidados intensivos

VIH – vírus da imunodeficiência humana

VSR – vírus sincicial respiratório

Lista de figuras

Figura 1: Cronograma representativo da descoberta de vírus respiratórios.

Figura 2: Comparação entre o mapeamento genómico do hMPV e do VSR.

Figura 3: Comparação entre o mapeamento genómico dos principais coronavírus humanos.

Figura 4: Representação esquemática do virião dos coronavírus.

Figura 5: Mapeamento genómico do HBoV.

Resumo

Introdução e objetivo: Os vírus são responsáveis por uma proporção significativa de infecções respiratórias agudas e considerados uns dos principais fatores de morbimortalidade a nível mundial, afetando sobretudo a população pediátrica, geriátrica e imunodeprimida. O objetivo deste artigo foi efetuar uma revisão bibliográfica referente à descoberta, taxonomia, biologia, epidemiologia, clínica, diagnóstico e tratamento do metapneumovírus humano, do coronavírus associado à síndrome respiratória aguda severa, do coronavírus NL63, do coronavírus HKU1 e do bocavírus humano.

Material e métodos: A pesquisa foi realizada nas bases de dados eletrónicas PubMed® e Medscape®, bem como no endereço eletrónico oficial da OMS, tendo-se privilegiado os artigos científicos originais ou de revisão desde 2001 até 2012, em língua inglesa, francesa e espanhola, com séries numerosas e realizados com a metodologia apropriada.

Resultados / Evidência: Os novos vírus respiratórios foram descobertos, ao longo da última década, com recurso a técnicas modernas de biologia molecular. Genericamente, estes vírus têm sido associados ao desenvolvimento de infeções respiratórias superiores e inferiores, sendo que os métodos moleculares como, por exemplo, a PCR permanecem a melhor opção diagnóstica. Na grande maioria dos casos, não existe nenhum tratamento antiviral específico nem quaisquer vacinas disponíveis.

Conclusão: O diagnóstico virológico é limitado não só pelo número de tipos e subtipos virais, mas também pela dificuldade em adquirir as amostras respiratórias apropriadas. Além disso, é essencial realizar estudos adicionais que permitam estabelecer com precisão a patogénese e as

formas de apresentação das infeções causadas pelos novos vírus descobertos, compreender o seu papel nas infeções múltiplas e criar estratégias que permitam limitar a sua disseminação em condições epidémicas.

Palavras-chave: infeções respiratórias virais, metapneumovírus humano, coronavírus, SARS, bocavírus humano.

Abstract

Background and aim: Viruses are responsible for a significant proportion of acute respiratory infections and considered one of the main factors of morbidity and mortality worldwide, affecting especially the pediatric, geriatric and immunocompromised population. The aim of this study was to perform a literature review on the discovery, taxonomy, biology, epidemiology, clinical presentation, diagnosis and treatment of human metapneumovirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus, coronavirus NL63, coronavirus HKU1 and human bocavirus.

Materials and methods: The research was carried in PubMed® and Medscape® electronic databases, as well as in the WHO official website; original scientific articles or reviews from 2001 to 2012 in English, French and Spanish, with numerous series and performed with appropriate methodology were included.

Results / Evidence: The new respiratory viruses have been discovered, over the last decade, using modern techniques of molecular biology. Generally, these viruses have been associated with upper and lower respiratory infections; molecular methods such as PCR remain the best diagnostic option. In most cases, there is neither specific antiviral treatment nor any vaccines available.

Conclusion: The viral diagnosis is limited not only by the number of types and subtypes of viruses, but also by the difficulty in acquiring appropriate respiratory specimens. Furthermore, is essential to perform additional studies to establish the precise pathogenesis and presentation

forms of infections caused by recently discovered viruses, to understand their role in multiple infections and to create strategies to limit its spread in epidemic conditions.

Keywords: respiratory viral infections, human metapneumovirus, coronavirus, SARS, human bocavirus.

1. Introdução

As três principais causas de mortalidade a nível mundial, em 2002, foram a cardiopatia isquémica (12,6%), os acidentes vasculares cerebrais (9,7%) e as doenças respiratórias agudas (6,9%) [1]. Assim, de acordo com os dados reportados, em 2002, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) [2], o impacto global das infeções respiratórias agudas estima-se em 3,9 milhões de mortes e em cerca de 94 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs), isto é, anos equivalentes de vida saudável perdidos em virtude do indivíduo se encontrar num estado de incapacidade ou défice de saúde [1].

De uma maneira geral, os potenciais agentes etiológicos destas infeções dependem da invasão direta a partir de uma fonte ambiental, da transmissão inter-humana ou do cruzamento de microrganismos entre os animais e os seres humanos [3]. Nesta perspetiva, pode afirmar-se que os vírus respiratórios contribuem para um número substancial de intercorrências agudas, possuem uma distribuição mundial e afetam indivíduos de qualquer faixa etária [4], incidindo particularmente na população pediátrica, geriátrica e naquela cuja resposta imune se encontra comprometida, o que sucede, por exemplo, em doentes sujeitos a transplantes de órgão sólido ou de células precursoras hematopoiéticas.

Além do incremento nas técnicas serológicas disponíveis, os avanços no diagnóstico virológico têm resultado em melhorias significativas no rendimento e na rapidez da cultura celular, dos processos de deteção de antigénios virais e, especialmente, dos métodos baseados na deteção e quantificação de ácidos nucleicos como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Assim, ao longo dos últimos anos e com recurso a técnicas modernas de biologia molecular, foram descobertos novos vírus agentes de infeções respiratórias, entre os quais se destacam o metapneumovírus humano (hMPV), em 2001, o coronavírus associado à síndrome respiratória

aguda severa (CoV-SARS), em 2003, os coronavírus NL63 e HKU1 (CoV NL63 e CoV HKU1), em 2004 e 2005, e o bocavírus humano (HBoV), em 2005 [4-5].

Atualmente, as metodologias de diagnóstico virológico permitem identificar 85 a 95% dos vírus existentes em amostras colhidas de crianças com semiologia respiratória; porém, as taxas de detecção diminuem com a idade, alcançando os 64% nas faixas etárias intermediárias e detendo-se abaixo dos 40% nos idosos [5]. Deste modo, a utilização de tais ferramentas é limitada não só pelo grande número de tipos e subtipos virais, mas também pela dificuldade em adquirir amostras apropriadas, o que faz com que o papel dos novos vírus respiratórios se mantenha pouco investigado e que seja necessária uma maior evidência da forma como estes se relacionam com as infecções respiratórias agudas.

Posto isto, o presente trabalho tem como objetivos fundamentais efetuar uma revisão bibliográfica aprofundada relativa aos novos vírus respiratórios supramencionados, explicitar a sua descoberta, taxonomia, características biológicas, epidemiologia, clínica, diagnóstico e tratamento, auxiliar no planeamento de atividades de intervenção no âmbito deste tipo de infecções e alertar as autoridades de saúde para o seu impacto.

2. Material e métodos

O material bibliográfico consultado durante a redação deste artigo de revisão foi obtido através de diversas pesquisas informáticas efetuadas nas bases de dados eletrônicas PubMed® e Medscape®, bem como no endereço eletrônico oficial da OMS.

A seleção da literatura internacional baseou-se no sistema de indexação disponível e na utilização dos seguintes termos de pesquisa: “acute respiratory infections”, “respiratory viral infections”, “new respiratory viruses”, “human metapneumovirus”, “CoV-SARS”, “CoV NL63”, “CoV HKU1” e “human bocavirus”, entre outros.

Os critérios de inclusão dos artigos científicos abrangeram a data de publicação (desde 2001 até 2012), a língua (inglesa, francesa e espanhola) e o número de citações no âmbito de outras publicações. Assim, privilegiaram-se os artigos científicos originais ou de revisão com dados atualizados, séries numerosas e realizados com a metodologia apropriada.

3. Infecções respiratórias virais – contextualização

A primeira época de descoberta de vírus respiratórios decorreu entre 1933 e 1965, sendo que os vírus influenza, enterovírus, adenovírus, vírus sincicial respiratório (VSR), rinovírus, parainfluenza e coronavírus foram identificados por meio de cultura celular (**Figura 1**) [4]. Após o surgimento de algumas estirpes do coronavírus em 1965, não foram relatados outros vírus respiratórios ou estirpes significativas durante um período de três décadas [5].

Contudo, a partir de 1990, o desenvolvimento de diversas metodologias de diagnóstico virológico permitiu isolar novos agentes patogênicos virais. Neste sentido, a segunda época de descoberta de vírus respiratórios iniciou-se em 2001, tendo sido encontrados o hMPV, CoV-SARS, CoV NL63 e CoV HKU1 e HBoV, entre outros (**Figura 1**) [4-5].

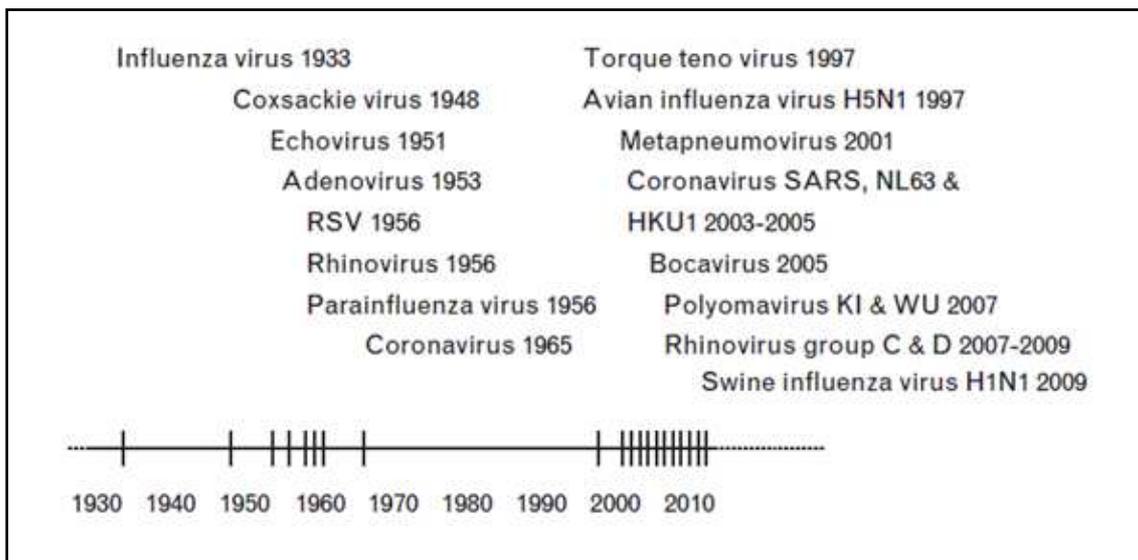


Figura 1: Cronograma representativo da descoberta de vírus respiratórios [4].

Os estudos estimam que, nos países desenvolvidos, os lactentes e as crianças em idade pré-escolar experienciam entre 6 a 10 infecções virais anualmente, enquanto as crianças em idade escolar e os adolescentes têm cerca de 3 a 5 destas infecções por ano [13].

Entre as causas de pneumonia adquirida na comunidade (PAC) grave e com necessidade de internamento hospitalar, os vírus são responsáveis por cerca de 15 a 40% de todos os casos em que a etiologia é conhecida [8]. Desta forma, a PAC é um fator essencial de morbidade e hospitalização em crianças, nos países desenvolvidos, permanecendo uma causa importante em todas as áreas geográficas onde a mortalidade infantil é significativa, nomeadamente nos países em desenvolvimento [6].

Os fatores de risco que afetam as crianças mais desfavorecidas abrangem o baixo peso infantil (associado à desnutrição e ao défice de micronutrientes), a ausência de condições habitacionais (sobretudo a escassez de água potável, a falta de higiene e de saneamento básico e a má qualidade do ar interior), bem como as condições socioeconómicas e culturais [1, 6]. Assim, a instituição de algumas intervenções nutricionais como, por exemplo, a promoção do aleitamento materno e a suplementação com zinco em crianças deficitárias parecem impedir o desenvolvimento de uma proporção expressiva de infeções respiratórias inferiores; por outro lado, a suplementação com ferro ou vitamina A além do período neonatal não parece reduzir nem a incidência nem a mortalidade associada a este tipo de patologia [7].

Na população pediátrica, a definição do conceito de pneumonia tem-se revelado muito difícil, especialmente na presença de determinadas doenças, já que as crianças com malária fatal geralmente apresentam sinais de dificuldade respiratória [6]. Além disso, a identificação da pneumonia como uma importante causa de mortalidade infantil é dificultada pelo facto de as crianças debilitadas em resultado da desnutrição, da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) ou de danos neurológicos decorrentes de lesões prévias serem mais propensas à morte no decurso deste tipo de infeção [6].

A ausência de um tratamento eficaz tem maior repercussão nas taxas de mortalidade por pneumonia bacteriana do que viral, uma vez que a antibioterapia só afeta significativamente a evolução clínica da primeira. Todavia, devido à incapacidade de identificar com precisão a

minoria de pacientes que possui infecções bacterianas graves, uma grande parte das crianças hospitalizadas acaba por receber antibioterapia [13].

Por outro lado, ao longo das últimas décadas, não só a esperança média de vida tem vindo a aumentar, mas também o número de idosos com algum grau de imunossenescência se tem amplificado drasticamente [3,5]. Assim, a maior suscetibilidade às infecções respiratórias virais relaciona-se sobretudo com um defeito na imunidade inata, sendo que as principais alterações que alargam esta propensão englobam a produção de anticorpos de baixa afinidade e a reduzida capacidade de fagocitose e de resposta das células T CD4 + [3]. A evidência científica atual permite ainda afirmar que a regulação da resposta pró-inflamatória se torna progressivamente menor nos idosos.

Na população geriátrica, as infecções respiratórias virais devem-se geralmente a quadros de reinfeção, na medida em que estes indivíduos aparentam possuir algum grau de imunidade; no entanto, devido a anticorpos de mucosa e sistémicos pré-existentes, estes têm quantidades menores de secreções respiratórias e cargas virais mais reduzidas do que as crianças [5].

Os fatores de risco que afetam os idosos compreendem a insuficiência cardíaca (IC), a insuficiência renal crónica (IRC), a diabetes *mellitus* e a corticoterapia inalada (neste caso, o ligeiro aumento do risco é compensado pelos efeitos benéficos que lhe são atribuídos) [3].

Os recetores de transplante de órgão sólido ou de células precursoras hematopoiéticas e aqueles submetidos a quimioterapia por doença maligna estão claramente predispostos a uma grande variedade de infecções virais. Genericamente, estas podem ser adquiridas através da comunidade, do órgão cedido pelo dador ou da reativação de vírus endógenos latentes, sendo que muitos surtos têm ocorrido devido a mecanismos de transmissão horizontal [9, 13].

Além dos efeitos diretos nocivos de muitos destes vírus, devem salientar-se outras ações de modulação imunológica e inflamatória que podem causar efeitos indiretos importantes, tais como a rejeição aguda ou crónica do enxerto e o favorecimento de infecções oportunistas [9].

Atualmente, a transmissão nosocomial de vírus respiratórios é um enorme problema de Saúde Pública, na medida em que a necessidade prática de agrupar os doentes e a deterioração inevitável das unidades prestadoras de cuidados de saúde vão assegurar que os surtos hospitalares se mantenham no futuro [3, 13]. Além disso, a ausência de um resultado do diagnóstico virológico expõe os indivíduos a um risco substancial de adquirirem um novo vírus durante a permanência hospitalar, sendo que a disposição dos doentes de acordo com o vírus implicado facilitaria a redução deste risco [13].

Por fim, deve ainda salientar-se que as infecções virais e bacterianas podem ter ações sinérgicas, já que existe evidência de uma provável infecção mista em até 45% das crianças e em cerca de 15% dos adultos com PAC [4-5]. Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao desenvolvimento destas infecções abrangem a destruição do epitélio respiratório pela infecção viral, o que pode conduzir ao aumento da adesão bacteriana; a imunossupressão induzida pelo vírus, o que pode originar superinfecções bacterianas; e a resposta inflamatória à infecção viral, o que pode regular de forma positiva a expressão de moléculas que as bactérias utilizam como recetores [4-5].

4. Metapneumovírus humano

4.1. Descoberta, taxonomia e características biológicas

O hMPV foi inicialmente relatado na Holanda, em 2001, por van den Hoogen *et al.* [4, 14-16, 18, 33], tendo sido isolado a partir de amostras de secreções respiratórias recolhidas em 28 crianças com infecções respiratórias agudas [14].

A distinção deste agente patogénico sobreveio após a evidência de que os principais métodos de diagnóstico virológico, tais como os ensaios imunológicos com anticorpos virais específicos e a PCR com *primers* genómicos virais específicos se revelavam incapazes de identificar a sua presença [16]. No entanto, a análise retrospectiva de amostras de secreções respiratórias antigas revelou que este vírus, ou outro antígenicamente muito semelhante, já se encontraria em circulação na população humana há várias décadas [4, 16].

A caracterização genética do hMPV, realizada com recurso a técnicas modernas de biologia molecular, concluiu que este vírus pode ter sido originado a partir das aves, na medida em que parece estar intimamente relacionado com o pneumovírus aviário, um dos membros do género *Metapneumovirus* [14-16]. Assim, de acordo com os dados obtidos através da sequenciação genómica, este agente patogénico humano foi incluído no género *Metapneumovirus*, uma das divisões da subfamília *Pneumovirinae*, família *Paramyxoviridae* e ordem *Mononegavirales*.

O VSR, vírus pertencente ao género *Pneumovirus*, é o agente patogénico humano mais estreitamente relacionado com o hMPV, não só através do genoma, mas também do ponto de vista da fisiopatologia e do espectro de manifestações clínicas que produzem. Por um lado, ambos possuem invólucro e um genoma constituído por ácido ribonucleico (ARN) de cadeia simples e polaridade negativa; por outro lado, os dois contêm genes estruturais com *open*

reading frames (ORF) que codificam três proteínas do envólucro viral (**Figura 2**) – a proteína de fusão (F), a de ligação (G) e a hidrofóbica curta (SH), embora a ordem seja distinta [16].

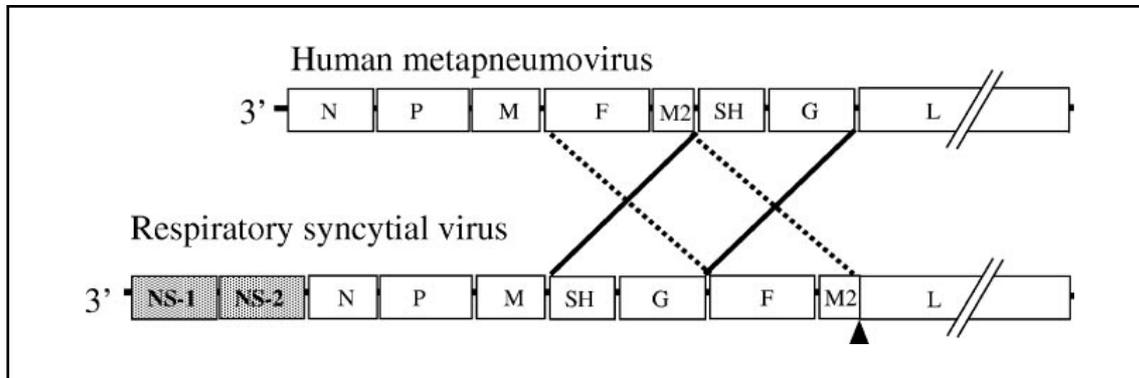


Figura 2: Comparação entre o mapeamento genômico do hMPV e do VSR [16].

Enquanto o gene F é o mais altamente preservado entre os dois vírus, o gene G torna-se o mais inconstante, sendo esta variabilidade provavelmente relacionada com a evasão do vírus ao sistema imunitário do hospedeiro. As sequências de aminoácidos do gene G indicam que este codifica glicoproteínas ancoradas do tipo II, sendo que a proteína G putativa do hMPV é consideravelmente menor do que a homóloga do VSR. O domínio citoplasmático amino-terminal intracelular da proteína G de ambos os vírus é relativamente curto e encontra-se adjacente ao domínio transmembranar hidrofóbico. O gene SH do hMPV codifica uma proteína bastante mais longa do que a correspondente do VSR, mantendo-se a função das proteínas SH dos dois vírus desconhecida. Tal como sucede no caso do VSR, os genes G e SH podem ser excluídos do genoma viral do hMPV sem suprimir a capacidade do vírus se replicar *in vitro* ou *in vivo*, levantando assim questões relativamente ao seu papel na interação com as células infetadas e/ou o sistema imune do hospedeiro [16].

O gene M2 do hMPV contém duas ORF denominadas M2-1 e M2-2, podendo ambas ser expressas durante o processo de infeção viral. Paralelamente ao que se verifica no caso do VSR, o gene M2-2 parece controlar a ARN polimerase viral [17].

A última diferença significativa entre os genomas do VSR e do hMPV é a ausência de dois genes não estruturais, intitulados NS-1 e NS-2, na extremidade 3' deste último (**Figura 2**), sendo que a sua relevância na patogénese do hMPV permanece incógnita.

Atualmente propõe-se a existência de dois génotipos (A e B) e de vários subgénotipos, pelo que é pouco provável que a infeção por qualquer um deles confira imunidade protetora cruzada [4-5, 15-18]. Apesar da organização genómica dos dois génotipos virais ser quase idêntica, as principais diferenças entre ambos são polimorfismos de nucleótidos localizados maioritariamente nas proteínas G e SH. Em 2004, com recurso a *primers* dirigidos ao gene N, foi detetada uma variante do hMPV que aparenta ser geneticamente divergente; contudo, são necessários estudos adicionais com recurso à sequenciação, de maneira a confirmar se esta representa de facto um génotipo diferente [16].

4.2. Epidemiologia

O HMPV possui uma distribuição mundial [4-5, 18-19] e afeta indivíduos de todas as faixas etárias, incidindo sobretudo em crianças abaixo dos 5 anos de idade.

Em média, a prevalência da infeção pelo hMPV estima-se em cerca de 5% das crianças, 2 a 5% dos adultos e 1 a 2% dos idosos [4]; além disso, foi detetada em 2% dos pacientes com exacerbações agudas da doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) [5]. Do mesmo modo, Falsey *et al.* verificou que até 10% dos indivíduos internados por doença cardiorrespiratória aguda tinham evidência serológica da infeção desencadeada por este vírus; todavia, apesar de ter ocorrido uma variabilidade considerável entre os dois anos de estudo, a prevalência foi comparativamente menor na população geriátrica em ambulatório [11].

A seroprevalência alcança valores superiores a 90% por volta dos 5 anos de idade e próximos dos 100% ao longo da idade adulta; em lactentes com mais de 3 meses de idade,

apresenta igualmente valores superiores a 90%, o que pressupõe a presença de anticorpos de origem materna [16].

Durante a fase de surtos em idosos institucionalizados, a taxa de incidência pode atingir os 72% e a taxa de mortalidade os 50%, sendo que até cerca de 31% dos indivíduos podem desenvolver uma pneumonia confirmada radiologicamente [4-5]. Posto isto, pode afirmar-se que o hMPV causa uma morbidade e uma mortalidade bastante valorizáveis.

Tal como acontece no caso do VSR, as estirpes de hMPV em circulação na comunidade são suscetíveis de variar anualmente, sendo que as infeções provocadas por este vírus ocorrem sobretudo ao longo do inverno [16, 18-19]. Contrariamente a esta evidência, alguns autores referem que a maioria dos episódios desencadeados pelo HMPV é diagnosticada durante a primavera e que este agente patogénico humano pode desempenhar um papel significativo nas admissões hospitalares que se verificam entre os meses de fevereiro a abril [10, 21].

Além dos extremos das faixas etárias e da institucionalização, os fatores de risco para a ocorrência de patologia severa compreendem a imunossupressão e a doença cardiopulmonar crónica [5]. Assim, o défice da resposta humoral e a modificação da resposta dos linfócitos T CD4+ parecem estar associados a um aumento da gravidade desta infeção [4].

4.3. Clínica e diagnóstico

O hMPV provoca infeções respiratórias superiores e inferiores, sendo que a maioria dos pacientes infetados possui um decurso clínico relativamente leve e a existência de infeções assintomáticas é extremamente rara [5].

Segundo Kahn, este agente patogénico pode encontrar-se associado a cerca de 5 a 15% dos episódios de infeção respiratória superior em crianças [16], percentagem essa que é menor do que aquela relacionada com as infeções ocasionadas pelos vírus influenza, parainfluenza,

adenovírus e VSR na mesma localização. Genericamente, as infecções respiratórias superiores motivadas pelo hMPV podem caracterizar-se através de um conjunto de entidades clínicas, entre as quais se distinguem a conjuntivite, a otite média aguda (OMA), a coriza aguda, a faringite e a estomatite [16].

No estudo realizado por Williams *et al.* [21], a análise através de PCR em tempo real com transcriptase reversa detetou a presença do hMPV em cerca de 6% das amostras de lavado nasofaríngeo recolhidas em crianças com diagnóstico primário de OMA, verificando que estas são secundárias a uma infecção respiratória anterior. A presença de bactérias como, por exemplo, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *H. influenzae* não tipáveis e *S. aureus* no fluido obtido do ouvido médio destes pacientes enfatiza a importância dos agentes bacterianos no aparecimento da OMA. Neste sentido, a resposta inflamatória ao vírus pode conduzir ao bloqueio incompleto ou completo da tuba auditiva, favorecendo o processo de invasão bacteriana [16]. No entanto, em cerca de 25% das crianças infetadas com hMPV não foi possível isolar quaisquer agentes bacterianos, sugerindo que este vírus pode estar associado ao desenvolvimento de OMA de forma isolada [21].

Por outro lado, o hMPV tem sido implicado numa proporção substancial de infecções respiratórias inferiores em lactentes e crianças abaixo dos 5 anos de idade [13, 16, 18-19], tendo-se tornado o segundo agente etiológico de bronquiolite nas faixas etárias consideradas e surgindo imediatamente a seguir ao VSR. Esta patologia caracteriza-se por inflamação aguda, edema, necrose das células epiteliais de revestimento dos bronquíolos e aumento da produção de muco [13], conduzindo a uma série de sinais e sintomas, tais como febre, tosse, taquipneia, broncospasmo, sibilância, hiper-expansão pulmonar e hipoxia [13, 16].

Nos últimos anos, o hMPV tem ainda sido associado a exacerbações agudas da asma e a episódios de pneumonia [4, 13, 20]; desta forma, mostrou desencadear infecções respiratórias idênticas às aquelas ocasionadas pelo VSR, em crianças [10, 12].

A radiografia do tórax dos doentes com infeções respiratórias inferiores incitadas pelo hMPV exhibe geralmente infiltrados pulmonares bilaterais, hiperinsuflação pulmonar e algum grau de congestão peribrônquica [16].

No entanto, estas infeções tendem a ser tão ou menos severas do que aquelas causadas pelo VSR [4, 16] ou pelo vírus influenza [4]. Assim, na população pediátrica, a percentagem de casos com clínica grave e necessidade de internamento em unidades de cuidados intensivos (UCI) e/ou ventilação mecânica é reduzida [10, 20].

Apesar de pouco frequentes, têm sido descritos alguns casos de síndrome de dificuldade respiratória aguda (SDRA) associados à infeção pelo hMPV [20], nomeadamente em crianças com fatores de risco tais como antecedentes de prematuridade, doença cardiorrespiratória ou imunodepressão [16]. Numa fase inicial, a maioria destes doentes exhibe um quadro clínico semelhante a uma bronquiolite com rinite, tosse e dificuldade respiratória progressiva. Numa fase posterior, com base quer no agravamento da dificuldade respiratória quer nos achados radiológicos, é geralmente instituído o diagnóstico de SDRA. A deterioração do estado dos doentes inclui o desenvolvimento de falência multiorgânica, hipotensão arterial dependente de catecolaminas, insuficiência renal aguda com necessidade de terapêutica de substituição renal contínua, hepatite, leucopenia e coagulopatia com trombocitopenia [20]. Embora se opte pela utilização de uma oxigenação por membrana extracorporeal (ECMO), a mortalidade pediátrica por SDRA permanece elevada [20].

Além disso, as crianças com uma coinfeção pelo VSR e hMPV aparentam ter um risco dez vezes maior de necessitar de ventilação mecânica, quando comparadas com aquelas que possuem uma infeção isolada pelo VSR [18, 20].

Nos adultos e nos idosos, a infeção pelo hMPV cursa normalmente com sintomas idênticos aos causados pelo vírus influenza, entre os quais se destacam a rinite, a odinofagia e a tosse [4-5, 16]. Todavia, os idosos são mais propensos a desenvolver semiologia respiratória

inferior como, por exemplo, dispneia e sibilância [4-5], sendo que nesta população a doença provocada pelo hMPV aparenta ser menos severa do que aquela produzida quer pelo VSR quer pelo vírus influenza [5].

Além das manifestações supramencionadas, o hMPV tem ainda sido relacionado com exacerbações agudas da asma e da DPOC, bem como a casos de pneumonia [16]. Os fatores de risco em indivíduos adultos que não possuem antecedentes de DPOC são a idade avançada e a presença de doença cardiorrespiratória subjacente [16].

Nos recetores de transplante de órgão sólido ou de células precursoras hematopoiéticas, a infecção pelo HMPV produz uma grande diversidade de manifestações clínicas, abrangendo infecções respiratórias superiores e inferiores. Assim, é possível identificar desde condições de expressão escassa ou oligoassintomáticas (definidas apenas por febre e por virémia detetável), até processos extremamente graves, como a hemorragia alveolar difusa e a pneumonia [9]. A radiografia do tórax destes doentes expõe um padrão alvéolo-intersticial bilateral, associando-se com frequência a insuficiência respiratória grave ou SDRA [9].

No que concerne ao diagnóstico virológico, a sensibilidade da cultura celular para a detecção do hMPV em amostras do trato respiratório é reduzida [12, 16]; assim, a replicação de hMPV *in vitro* está restrita a um número muito limitado de linhas celulares e requer a suplementação do meio de cultura com tripsina [16].

Atualmente, a detecção rápida do hMPV em amostras nasofaríngeas pode conseguir-se por meio de técnicas de imunofluorescência com recurso a anticorpos específicos [22]. Além disso, estão ainda descritas metodologias *shell vial* que permitem combinar a cultura celular e as técnicas de imunofluorescência, nomeadamente a imunofluorescência direta, tornando a identificação do vírus mais precoce do que o método convencional [22].

No entanto, nenhuma técnica de diagnóstico laboratorial é tão sensível na detecção deste vírus como a PCR com transcriptase reversa, pelo que este é o método mais frequentemente

empregue [4-5, 16, 23]. Os *primers* que se ligam a regiões específicas dos genes N e L têm-se revelado altamente sensíveis na amplificação genética e na subsequente detecção de ambos os genótipos de hMPV descritos [16, 23].

O diagnóstico virológico por métodos serológicos encontra-se identicamente disponível, apesar de muitas vezes não ser prático durante a fase aguda da doença [4-5].

4.4. Tratamento

O recurso a medidas gerais de prevenção como, por exemplo, a lavagem e a desinfecção das mãos, a boa higiene da tosse e o isolamento dos pacientes infetados é fundamental para controlar a transmissão deste e de outros vírus respiratórios [4].

A abordagem terapêutica dos doentes com infeções respiratórias virais varia de acordo com o agente patogénico e a severidade do quadro clínico, embora a maior parte apresente semelhanças que permitem estabelecer uma estratégia minimamente padronizada.

A maioria das infeções respiratórias superiores causadas pelo hMPV possui um decurso autolimitado, enquanto as infeções respiratórias inferiores podem controlar-se em ambulatório ou conduzir a um internamento hospitalar.

O tratamento inclui essencialmente medidas de suporte como, por exemplo, a vigilância da temperatura, da condição respiratória (apneia, hipoxemia ou insuficiência respiratória), da nutrição e da hidratação, bem como a oxigenoterapia [8].

Na população pediátrica, a abordagem de uma bronquiolite inicia-se através de algumas atitudes de carácter geral, tais como a elevação da cabeceira da cama a 30° e a reduzida manipulação das crianças. A nutrição através de sonda nasogástrica só deve ser utilizada nos casos de taquipneia severa, de forma a prevenir a aspiração pulmonar dos alimentos ingeridos por via oral. A fluidoterapia parenteral torna-se necessária quando as crianças têm dificuldade

em manter uma hidratação adequada. A oxigenoterapia por cânula nasal ou máscara facial deve ser aplicada sempre que a saturação de oxigênio seja persistentemente inferior a 94%.

Outros aspetos mais controversos referem-se não só à administração de corticosteróides, mas também à terapêutica aerossol com broncodilatadores ou ribavirina [8]. Este último é um nucleósido sintético com atividade virustática contra diversos vírus, incluindo o VSR, sendo que a sua eficácia ainda não foi suficientemente demonstrada no que concerne ao hMPV [9, 12]. Contudo, segundo Kahn [16], a inibição da replicação do hMPV após a administração de ribavirina é idêntica à observada no caso do VSR. De acordo com o mesmo autor, o composto NMSO3, um lípido sialil sulfatado que tem demonstrado atividade antiviral contra o VSR em cultura celular, tem provado algum efeito contra o hMPV *in vitro* [16].

Os doentes com infeções respiratórias severas carecem de medidas de suporte intensivas como, por exemplo, a fluidoterapia parenteral, a administração de aminos e a terapêutica de substituição renal; além disso, estes sofrem geralmente lesões pulmonares graves, facto que os conduz à necessidade de ventilação mecânica com ECMO [8].

Nos indivíduos imunodeprimidos, além de não existir qualquer quimioprofilaxia efetiva, o tratamento das infeções respiratórias com fármacos antivirais deve ser complementado com uma redução no grau e na intensidade da supressão imunológica [9].

Presentemente encontram-se em investigação uma série de candidatos ao surgimento de uma vacina [4-5, 16]; porém, têm sido referidas muitas limitações ao seu desenvolvimento, nomeadamente o facto deste agente patogénico ser altamente restrito ao ser humano, o que invalida a maioria dos estudos em pequenos animais, bem como a impossibilidade de prever a segurança e a eficácia de uma possível vacina recombinante [16].

5. Coronavírus associado à síndrome respiratória aguda severa, coronavírus NL63 e coronavírus HKU1

5.1. Descoberta, taxonomia e características biológicas

A pandemia originada pelo CoV-SARS teve início em novembro de 2002, na província de Guangdong (China) [5, 25-27, 29, 31], sendo que este vírus foi rapidamente identificado noutras províncias da China, no Vietnã, em Singapura e no Canadá durante o princípio do ano de 2003 [8, 13]. Estes doentes eram essencialmente familiares e profissionais de saúde em contato com os casos índice; além disso, muitos tinham ligações epidemiológicas ao comércio de animais vivos [25-26]. Embora a doença tivesse sido caracterizada como uma pneumonia atípica rapidamente progressiva, a evolução clínica e a ausência de resposta à antibioterapia com macrólidos contra-argumentaram o possível envolvimento de *Chlamydia* spp. [26].

Entretanto, esta entidade clínica foi denominada pela OMS como síndrome respiratória aguda severa (SARS) sendo que, a 18 de março de 2003, esta organização constituiu uma rede virtual de laboratórios para investigar a sua etiologia. A identificação do novo CoV-SARS foi efetuada por três laboratórios autónomos através da observação por microscopia eletrónica de células infetadas pelo vírus e de preparações coradas negativamente a partir de sobrenadantes de culturas celulares. A confirmação da identidade do vírus foi obtida por sequenciação de fragmentos do genoma viral [24-26]; esta análise confirmou que o CoV-SARS era um vírus completamente novo, não tinha sido obtido por recombinação entre coronavírus previamente descritos e não se tinha gerado artificialmente como agente de bioterrorismo [26].

A SARS aumentou exponencialmente o interesse pela investigação científica em todas as áreas relacionadas com os coronavírus [27, 33] sendo que, desde então, foram descobertos

cerca de dezasseis vírus, entre os quais se distinguem dois agentes patogénicos humanos, o CoV NL63 e o CoV KU1 [25-26, 28-31].

O CoV NL63 foi inicialmente descrito na Holanda, em 2004, por van der Hoek *et al.* [4-5, 13, 25, 28-29], tendo sido isolado a partir de amostras de aspirado nasofaríngeo colhidas num lactente de 7 meses de idade com semiologia compatível com uma infeção respiratória viral, nomeadamente febre, conjuntivite e coriza aguda; além disso, a radiografia do tórax deste doente apresentava características típicas de uma bronquiolite [29]. A identificação do novo vírus foi executada através de uma técnica cognominada VIDISCA, que consiste na amplificação rápida de genomas desconhecidos com base nos polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs) do ADN complementar amplificado [29].

O CoV KU1 foi relatado em Hong Kong, em 2005, por Woo *et al.* [4-5, 13, 25, 30-31], tendo sido identificado em secreções respiratórias obtidas num doente do sexo masculino com 71 anos de idade que manifestava uma pneumonia [13, 29].

Os coronavírus possuem invólucro e um genoma constituído por ARN de cadeia simples e polaridade positiva [8, 25-31], incluindo-se na subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae* e ordem *Nidovirales*. Na medida em que expõem um mecanismo de replicação viral único, apresentam uma elevada frequência de recombinação e o maior genoma entre todos os vírus de ARN conhecidos (26 a 32 kb) [25, 31].

Tradicionalmente, com recurso a estudos antigénicos e genéticos, os coronavírus eram classificados em três grupos (1, 2 e 3), sendo os grupos 1 e 2 constituídos pelos coronavírus derivados dos mamíferos e o grupo 3 pelos coronavírus aviários [25-31].

Em 2011, o Comité Internacional de Taxonomia de Vírus propôs uma nova subdivisão em 4 géneros (*Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*), de modo a substituir os três grupos supracitados [40]. Enquanto o CoV NL63 foi inserido no

género *Alphacoronavirus* [devido à similaridade genómica com o CoV 229E (**Figura 3**)], o CoV-SARS e o CoV KU1 foram ambos incluídos no género *Betacoronavirus* [40].

Todos os coronavírus apresentam genes estruturais com ORF que permitem codificar cinco proteínas importantes (**Figuras 3 e 4**) – a proteína replicase (ORF 1a e 1b) codifica as enzimas necessárias à replicação do ARN viral [29]; a proteína *spike* (S), uma glicoproteína do tipo I localizada no invólucro, concede ao vírus a sua morfologia típica em coroa (quando observado ao microscópio eletrónico) e serve como proteína de ligação e de fusão; a proteína do envelope (E) atravessa a membrana, sendo um componente minoritário; a proteína da membrana (M), altamente hidrofóbica, é a proteína mais abundante do invólucro, atravessa a membrana, tem um ectodomínio amino-terminal curto e uma cauda citoplasmática e parece estar envolvida no processo de ligação; a proteína da nucleocápside (N) forma uma cápside helicoidal localizada no interior da membrana viral [24-25, 27].

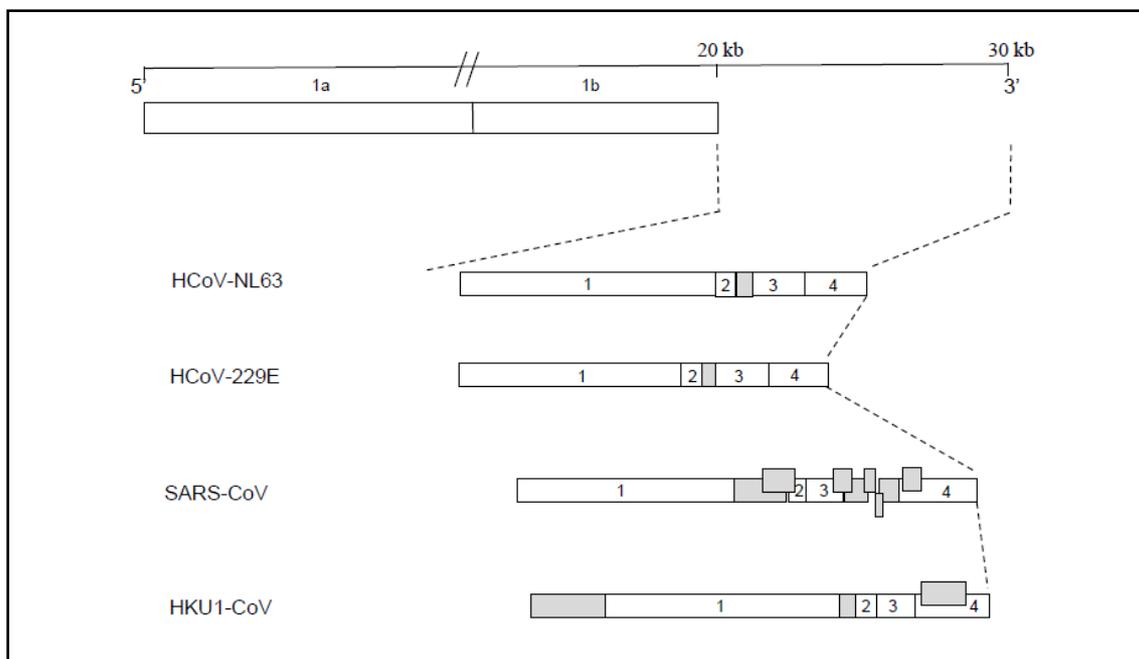


Figura 3: Comparação entre o mapeamento genómico dos principais coronavírus humanos: os genes estruturais correspondem a S (1), E (2), M (3) e N (4) e os genes acessórios estão sombreados a cinzento [29].

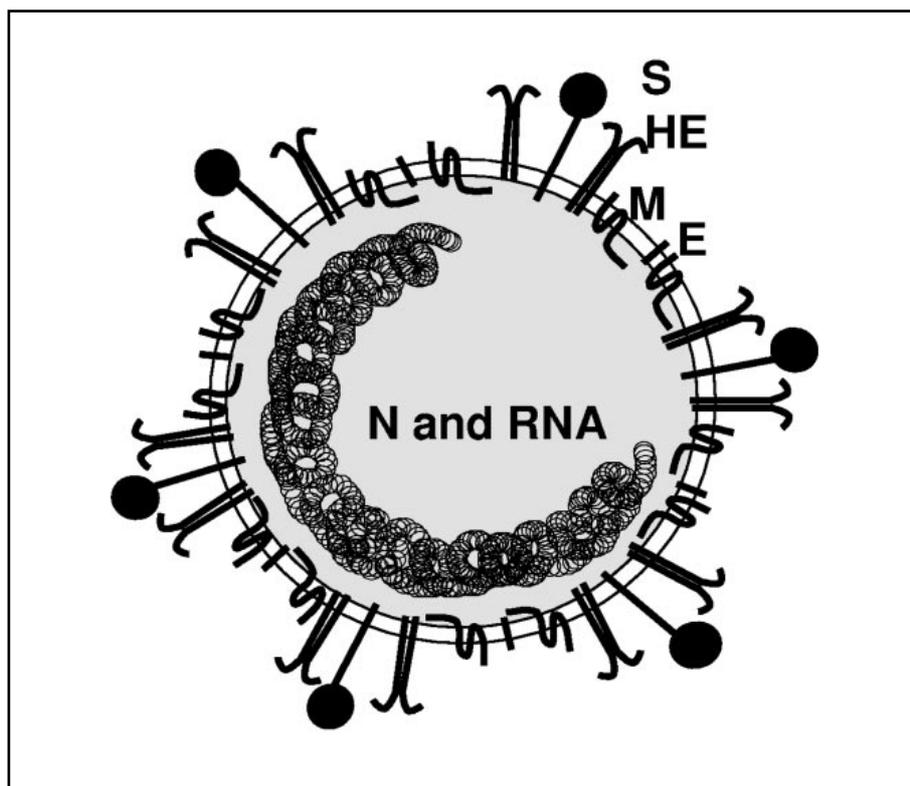


Figura 4: Representação esquemática do virião dos coronavírus [25].

Os genes acessórios específicos de cada subgrupo podem ser encontrados entre os genes estruturais (**Figura 4**), variando em número e localização [24, 29]. O CoV NL63 tem apenas um gene deste tipo, sendo designado ORF 3. Os coronavírus do gênero *Betacoronavirus* como, por exemplo, o CoV KU1 têm dois genes acessórios que codificam duas proteínas adicionais – hemaglutinina esterase (HE) e interna (I) [29-31], sendo que a proteína HE não é codificada no genoma do CoV-SARS [25]. Alguns estudos recentes demonstraram que os genes acessórios conferem uma vantagem adaptativa na infecção *in vivo* e na patogenicidade dos coronavírus no hospedeiro natural [29].

Atualmente sabe-se que o CoV-SARS e o CoV NL63 invadem as células do hospedeiro através de um recetor presente na superfície celular, a enzima de conversão da angiotensina 2 (ECA 2) [25, 29]; esta interação depende da capacidade de ligação da proteína S de cada um dos vírus, sendo que a proteína do CoV NL63 possui uma interação mais fraca do que a do

CoV-SARS [29]. Após a invasão celular, o CoV-SARS recorre a estratégias específicas para evadir e antagonizar a deteção e a sinalização da via do interferão [27].

Relativamente ao CoV HKU1, é possível considerar a existência de três genótipos (A, B e C), sendo que a recombinação homóloga inter-genotípica entre o genótipo A e B conduziu à formação do genótipo C [30-31]. Além disso, alguns autores sugerem que a molécula C do complexo *major* de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) está envolvida na ligação do CoV HKU1 às células epiteliais alveolares humanas, tornando-se assim uma facilitadora do processo de invasão celular [31].

5.2. Epidemiologia

Além de ter afetado mais de 8000 indivíduos mundialmente, o CoV-SARS provocou 774 mortes em todas as faixas etárias, durante um período de tempo de doze meses [5, 25-26]. Mais de metade destas infeções foi diretamente atribuída a um paciente que aterrou em Hong Kong, a 21 de fevereiro de 2003, após ter adquirido a doença em Guangdong [26]. Assim, a taxa de mortalidade associada a este vírus foi de aproximadamente 10%, sendo muito mais expressiva em indivíduos com mais de 65 anos de idade [8, 29].

Alguns coronavírus idênticos ao CoV-SARS foram isolados de determinados animais, tais como o gato-de-argália (*Paguma larvata*), o guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*) e o texugo-furão-chinês (*Melogale moschata*), tendo demonstrado uma homologia superior a 99% com o CoV-SARS humano; a diferença fundamental reside no facto deste último possuir uma deleção na ORF 8 [25-26].

Segundo Hagemeyer *et al.* [41], o CoV-SARS emergiu na população humana a partir de um reservatório animal, muito provavelmente o morcego, tendo o gato-de-argália agido como hospedeiro intermediário.

A propagação do CoV-SARS ocorreu sobretudo através de aerossóis contaminados e do contato direto com o vírus [8, 25], tendo sido sugerida a transmissão sanguínea e fecal-oral em pelo menos um dos casos índice [25].

A idade avançada e as doenças crónicas subjacentes parecem ampliar significativamente o risco de infeção grave pelo CoV-SARS [5].

A pandemia foi controlada por meio de um esforço global coordenado pela OMS sendo que, a partir de 5 de julho de 2003, não foram reportados mais casos de transmissão humana do vírus [25-26]. Assim, desde a contenção mundial do CoV-SARS, apenas foram descritos episódios isolados de infeção associada à sua manipulação laboratorial [13, 29].

O CoV NL63 e o CoV HKU1 possuem uma distribuição mundial [5, 28-31] e podem ser detetados numa pequena percentagem de indivíduos em todas as faixas etárias [4-5, 29-31], particularmente em crianças, idosos e imunodeprimidos.

Nesta perspetiva, alguns relatos demonstraram que o CoV NL63 pode ser recuperado com uma frequência relativamente baixa de amostras respiratórias de crianças e adultos com semiologia respiratória [12]. Por outro lado, um estudo recente revelou que a idade média dos doentes com PAC e deteção viral compatível com o CoV HKU1 era de 72 anos de idade, sendo que a maioria destes possuía múltiplas comorbilidades [5].

Segundo Woo *et al.*, a incidência média da infeção por coronavírus é de 1,1% no caso do CoV NL63 e de 0,9% no caso do HKU1 [31]. Enquanto um estudo alemão em dadores de sangue saudáveis revelou, respetivamente, uma seroprevalência de 60% e 48%, um estudo norte-americano demonstrou valores de 91,8% e 59,2%; no entanto, foram observadas taxas significativamente discrepantes entre indivíduos de diferentes raças, hábitos tabágicos e níveis socioeconómicos [31]. Genericamente, a seroprevalência do CoV HKU1 parece aumentar ao longo da vida, podendo encontrar-se próxima dos 0% abaixo dos 10 anos de idade e deter-se nos 22% na faixa etária entre os 31 e os 40 anos de idade [31].

Embora as infecções por CoV NL63 e CoV HKU1 possuam um pico de incidência ao longo do inverno [5, 29, 31], ambos os vírus não são afetados por variações de temperatura, podendo ocorrer no decurso de todo o ano [5, 29]; por outro lado, alguns autores salientam a possibilidade destes provocarem epidemias irregulares a cada 2 ou 3 anos [4-5].

Além dos extremos das faixas etárias e da institucionalização, os fatores de risco para a ocorrência de patologia severa desencadeada pelos CoV NL63 e CoV HKU1 compreendem a imunossupressão e as doenças crónicas subjacentes sendo que, em determinadas condições, estes conduzem ao aparecimento de casos fatais [4-5].

O CoV NL63 tem ainda sido associado ao desenvolvimento de coinfeções com outros vírus respiratórios, entre os quais se destacam outros coronavírus, o vírus influenza A, o VSR, o vírus parainfluenza, o hMPV e o HBoV [29].

5.3. Clínica e diagnóstico

A SARS é amplamente considerada uma pneumonia viral com decurso clínico bifásico. As manifestações prodrómicas incluem febre, calafrios, cefaleias, mialgias e náuseas [5, 8, 26]; a presença de tosse é muito comum, sendo a dispneia de instalação tardia [5, 26]. Após cerca de sete a oito dias, estes sintomas progridem para uma hipoxemia grave (em cerca de 45% dos casos), podendo desenvolver-se uma SDRA (em 20% dos casos) [8].

Além disso, os indivíduos infetados podem apresentar sintomas gastrointestinais como, por exemplo, diarreia (em 30 a 40% dos doentes), bem como outras alterações importantes, nomeadamente linfadenopatias, atrofia esplénica, linfopenia, trombocitopenia ligeira, tempos de coagulação prolongados e elevação das enzimas hepáticas séricas [25]. Deste modo, alguns autores têm proposto que a SARS é uma doença sistémica com disseminação extrapulmonar

generalizada [25], sendo que a morte acontece vulgarmente por insuficiência respiratória ou por uma síndrome relacionada com a disseminação sistémica do vírus [5].

No que concerne ao diagnóstico virológico, a eficácia da cultura celular para a deteção do CoV-SARS em amostras do trato respiratório é reduzida [4-5, 8]. A deteção laboratorial deste vírus pode assim conseguir-se por meio da imunofluorescência com recurso a anticorpos específicos ou por técnicas de ELISA [8].

No entanto, devido à elevada sensibilidade e especificidade, o diagnóstico da infeção pelo CoV-SARS é geralmente realizado através da PCR com transcriptase reversa e de outros métodos de deteção e quantificação de ácidos nucleicos [8, 24-26, 29]. Os *primers* que se ligam a regiões específicas das ORF 1a e 1b ou dos genes S e N têm sido os mais utilizados na amplificação genética [24-26, 29].

Apesar do desenvolvimento de métodos serológicos para as infeções pelo CoV-SARS, este procedimento nem sempre é prático durante a fase aguda da doença [4-5].

O CoV NL63 provoca infeções respiratórias superiores e inferiores [4-5, 13, 29], tendo sido associado a casos de laringite estridulosa, bronquiolite e pneumonia [13, 29]. Os doentes com infeções respiratórias superiores têm sintomas ligeiros, tais como febre, rinorreia e tosse, enquanto aqueles com crupe apresentam faringite, odinofagia e rouquidão [29].

Recentemente tem sido debatida a associação controversa entre o CoV NL63 e a doença de Kawasaki, uma vasculite infantil que se caracteriza por febre, exantema polimorfo, eritema orofaríngeo e conjuntivite bilateral; assim, enquanto um estudo descreve esta relação em até 73% dos doentes, a maioria dos grupos de investigação nega a sua existência [29].

O CoV HKU1 origina infeções respiratórias superiores sobreponíveis às descritas para o CoV NL63 e outros vírus respiratórios [4-5, 13, 30-31], sendo também o agente etiológico de infeções respiratórias inferiores que cursam com febre, tosse produtiva e dispneia [30-31].

O potencial papel do CoV HKU1 no surgimento de convulsões febris, gastroenterites e hepatites permanece atualmente indeterminado [31].

Ambos os vírus têm sido implicados na origem de sintomas gastrointestinais como, por exemplo, dores abdominais e diarreia [4-5], bem como em surtos respiratórios nosocomiais e em exacerbações agudas de doenças cardiorrespiratórias, em idosos [12].

Nos recetores de transplante de órgão sólido ou de células precursoras hematopoiéticas, os coronavírus não SARS podem causar infecções respiratórias superiores e inferiores [9].

Na medida em que os CoV NL63 e HKU1 dificilmente crescem em cultura celular [4-5, 12, 29-31], o diagnóstico virológico destes agentes patogénicos humanos é rotineiramente executado com base nas restantes técnicas laboratoriais disponíveis.

A deteção de anticorpos específicos contra o CoV NL63 em amostras de soro sanguíneo humano pode efetuar-se por meio de técnicas de ELISA; no entanto, o CoV-SARS parece estimular reações cruzadas de anticorpos para outros coronavírus humanos, incluindo o CoV NL63, pelo que foram descritos alguns falsos positivos não só para as técnicas de ELISA, mas também para a imunofluorescência e para os testes de fixação do complemento [29].

Nesta perspetiva, a identificação laboratorial do CoV NL63 resume-se vulgarmente à utilização de metodologias de PCR com transcriptase reversa, recorrendo-se à cultura celular apenas para confirmar a etiologia [4-5, 24-26, 29].

Por outro lado, o diagnóstico virológico da infeção pelo CoV HKU1 pode ser realizada através da deteção de antigénios virais em amostras de aspirado nasofaríngeo, com recurso a anticorpos monoclonais; da deteção de anticorpos em amostras de soro sanguíneo, com base em antigénios N recombinantes por meio de técnicas de *Western blot* e ELISA; e de testes de neutralização de anticorpos [31].

Contudo, os procedimentos laboratoriais mais comumente empregues na identificação do CoV HKU1 em amostras respiratórias, principalmente aspirados nasofaríngeos, são a PCR com transcriptase reversa convencional e em tempo real [4-5, 30-31].

Recentemente, a introdução da técnica de *microarrays* de ADN permitiu implementar a deteção do CoV HKU1 e de outros coronavírus humanos com uma sensibilidade semelhante aos protocolos individuais de PCR em tempo real com transcriptase reversa [31].

5.4. Tratamento

Durante o surto da SARS, as extensas campanhas da OMS com o intuito de reduzir a disseminação de aerossóis (através da boa higiene da tosse e da evicção laboral durante os períodos de infeção aguda), bem como a utilização de máscaras de proteção tiveram um efeito bastante significativo nas taxas de incidência de todas as infeções respiratórias virais [13].

O tratamento da infeção pelo CoV-SARS é fundamentalmente sintomático e de suporte, sendo que a administração de corticosteróides pode modular a desregulação de citocinas [25] e tornar-se útil nos episódios de SDRA [5, 8], enquanto a antibioterapia pode prevenir as infeções bacterianas secundárias [25]. Tendo em atenção a sua atividade virustática alargada, alguns autores sugerem a terapêutica aerossol com ribavirina [5, 25]; no entanto, em cultura celular, este nucleósido sintético só parece inibir eficazmente a replicação do CoV-SARS em concentrações superiores aos níveis plasmáticos obtidos nos indivíduos tratados [25].

O uso de anticorpos antivirais, inibidores da entrada celular, inibidores das proteínases, inibidores das calpaínas, inibidores da protease do VIH-1 e de pequenos segmentos de ARN de interferência tem sido igualmente relatado [25]. Embora nenhuma terapia seja totalmente eficaz, a utilização de interferão (IFN), sobretudo o IFN- β , demonstrou impedir a replicação do vírus em cultura celular [5, 25]. O plasma humano adquirido na fase de convalescença da

SARS foi também administrado sob a forma de imunoterapia e aparentemente possui um efeito benéfico na fase inicial da doença [25].

Por um lado, vários estudos relataram que os anticorpos monoclonais humanos podem conferir proteção relativamente à SARS [25]; por outro lado, encontram-se em investigação uma série de estratégias de imunização ativa contra o CoV-SARS [5, 25, 32], nomeadamente viriões inativados, antígenos recombinantes, vacinas de ADN, vetores de adenovírus, vetores de vírus vaccinia Ankara modificado, vetores de vírus parainfluenza recombinante do tipo 3 e vetores de baseados em rabdovírus [25]. Os alvos preferenciais destas vacinas são as proteínas estruturais S, M e N do CoV-SARS [25, 32]. Apesar dos resultados pré-clínicos promissores, a eficácia das abordagens supracitadas ainda não foi estudada em seres humanos [5].

A maioria das infeções respiratórias determinadas pelo CoV NL63 e pelo CoV HKU1 é autolimitada [31], sendo que o tratamento é essencialmente sintomático e de suporte.

Outras abordagens terapêuticas da infeção pelo CoV NL63 incluem a administração de imunoglobulina por via endovenosa e a utilização de segmentos de ARN de interferência e de análogos dos nucleosídeos pirimidinas. Atualmente não estão descritas vacinas que permitam prevenir as infeções pelo CoV NL63 e pelo CoV HKU1 [4-5].

6. Bocavírus humano

6.1. Descoberta, taxonomia e características biológicas

O HBoV (recentemente designado HBoV1) foi inicialmente descoberto na Suécia, em 2005, por Allander *et al.* [4, 13, 33-36], tendo sido isolado através de um sistema alargado de deteção molecular de vírus em amostras nasofaríngeas, após remoção do ADN do hospedeiro, amplificação aleatória por PCR, sequenciação e análise bioinformática [4, 33, 35].

Na medida em que mostrava semelhanças com os parvovírus bovino e canino do género *Bocavirus*, nomeadamente nas sequências de aminoácidos deduzidas [35], este novo agente patogénico humano foi denominado bocavírus humano (HBoV) [4, 33-36]. Segundo os dados adquiridos através da sequenciação genómica, este foi incluído no género *Bocavirus*, uma das divisões da subfamília *Parvovirinae*, família *Parvoviridae* [33-36].

Entre os anos de 2009 e 2010, foram identificadas três estirpes adicionais (HBoV 2, 3 e 4) em amostras de fezes humanas [4-5, 13, 35-39].

Os HBoV são vírus pequenos sem invólucro que possuem um genoma constituído por ADN linear de cadeia simples [4, 13, 34-35] e um capsídeo de formato icosaédrico [34]. No que concerne à replicação viral, uma vez que o seu genoma não codifica polimerases, estes vírus tornam-se altamente dependentes das funções celulares do hospedeiro, principalmente das ADNs polimerases [4, 35].

O genoma dos HBoV contém três ORF (1, 2 e 3) [34-36], sendo que estas permitem codificar duas formas de proteínas não estruturais – a proteína não estrutural 1 (NS1) e a fosfoproteína nuclear 1 (NP1) – assim como duas proteínas estruturais do capsídeo – as proteínas estruturais virais 1 (VP1) e 2 (VP2) [34-36]. O gene NP1 sobrepõe-se ao começo do gene VP1 por treze nucleótidos e o gene VP2 é colinear com este (**Figura 5**).

Quando comparados com os restantes parvovírus, os genes não estruturais mostraram as regiões mais conservadas do genoma, enquanto os genes estruturais revelaram as principais variações observadas [34].

A proteína NS1 parece estar envolvida em inúmeras funções reguladoras, tais como a transativação de promotores virais e celulares e a indução da apoptose [34]; a proteína NP1 é altamente fosforilada, sendo que a sua função não é totalmente compreendida [34, 36].

As proteínas estruturais virais VP1 e VP2 são idênticas em sequência e apenas diferem no amino-terminal da proteína VP1, que contém uma fosfolipase-A denominada região única da VP1 (VP1u – **Figura 5**) [34, 36].

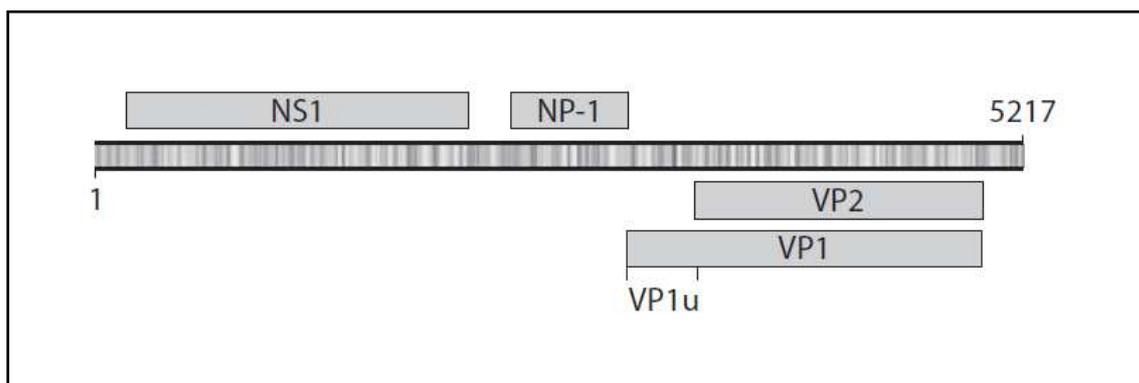


Figura 5: Mapeamento genómico do HBoV [34].

Em alguns estudos *in vitro*, as proteínas estruturais VP2 do HBoV 1 mostraram induzir uma resposta das células T CD4 + por meio das interleucinas 10 e 13 (IL-10 e IL-13) e do IFN- γ . Por outro lado, um conjunto de amostras de aspirados nasofaríngeos de crianças com bronquiolite demonstrou que a presença do ADN do HBoV1 está associada a uma resposta dos linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th 1 e 2) através da IL-2, da IL-4 e do IFN- γ [34-35].

Apesar dos mecanismos de invasão celular e o espectro de hospedeiros potencialmente afetados *in vivo* se manterem desconhecidos, o HBoV 1 parece provocar uma resposta imune semelhante àquela tipicamente induzida por outros vírus respiratórios [34-35].

6.2. Epidemiologia

O HBoV 1 tem uma distribuição mundial [5, 34-35, 37-38] e atinge indivíduos de todas as faixas etárias, incidindo preferencialmente em crianças [4] e sendo considerado um agente etiológico pouco frequente em adultos e idosos [5, 35]. Assim, a infecção primária é adquirida geralmente entre os 6 e os 48 meses de idade [4-5, 35].

O ADN do HBoV 1 foi detetado sobretudo em amostras respiratórias e fecais humanas, embora tenha sido igualmente isolado em amostras de soro sanguíneo, salivares, tonsilares e urinárias [4-5, 13, 34-35], bem como na água dos rios e dos esgotos [5, 35]. A difusão passiva do HBoV 1 do trato respiratório para o trato gastrointestinal é muito provável, na medida em que os níveis de ADN deste vírus presentes nas fezes são baixos, as taxas de deteção entre indivíduos com e sem semiologia gastrointestinal são análogas e a identificação concomitante de outros agentes patogénicos tem sido elevada [35]. Por outro lado, o ADN dos HBoV 2, 3 e 4 parece encontrar-se maioritariamente em amostras fecais humanas e, mais raramente, em amostras respiratórias [4, 34-35].

A prevalência da infecção pelo HBoV 1 foi difícil de determinar até ao desenvolvimento dos métodos serológicos, entre 2007 e 2008 [35, 38]. Presentemente, a prevalência do ADN deste vírus pode variar, em média, entre os 1,5 e os 19% das amostras respiratórias [5], sendo que as taxas de deteção em adultos aparentam ser mais baixas do que em crianças [35, 38].

O facto de o ADN do HBoV1 ter sido encontrado em amostras respiratórias de crianças assintomáticas gerou algumas questões relativamente à causalidade do vírus; contudo, alguns

estudos demonstraram que o isolamento do HBoV 1 foi mais comum em indivíduos doentes e que as cargas virais foram claramente superiores nas infecções isoladas, quando comparadas com as coinfeções [13]. Deste modo, a evidência científica suporta o papel deste vírus como um verdadeiro agente patogénico humano [5, 13] e permite afirmar que este pode persistir em locais específicos do organismo do hospedeiro durante vários meses [4-5, 35]. Ainda assim, permanece desconhecido se o HBoV é capaz de estabelecer infecções latentes e se a coinfeção por outros vírus pode auxiliar a reativação do seu genoma [35].

A seroprevalência do HBoV 1 pode alcançar valores na ordem dos 94% em indivíduos adultos, indicando necessariamente o contato com o vírus em algum momento e comprovando que estas infecções são extremamente comuns; todavia, alguns estudos recentes mostraram que a reatividade cruzada com os HBoV 2, 3 e 4 pode diminuir esta grandeza [4-5, 37]. Em lactentes com menos de 2 meses de idade, a presença de anticorpos de origem materna induz um estado de seropositividade que vai declinando gradualmente [35, 37].

Embora as infecções pelo HBoV 1 tenham um pico de incidência no inverno, sobretudo em novembro e dezembro [9-10], e na primavera [34-35], este vírus pode detetar-se durante todas as estações do ano [4-5, 34-35].

Atualmente, as vias de transmissão dos diferentes HBoV mantêm-se incertas, sendo provável que estas sejam idênticas às de outros parvovírus, sobretudo através de aerossóis contaminados ou do contato com expectoração, fezes ou urina contaminadas [35].

Além dos extremos das faixas etárias e da institucionalização, os fatores de risco para a ocorrência de patologia severa incluem a imunossupressão, a doença cardiopulmonar crónica (lesões cardíacas congénitas, IC, asma e DPOC) e a doença pulmonar crónica associada à prematuridade [35]. Entre as crianças abaixo dos 2 anos de idade, os principais fatores de risco considerados são os hábitos tabágicos maternos, o nascimento durante o inverno e a predisposição familiar para a asma [35].

O HBoV 1 tem ainda sido associado a altas taxas de coinfeção com outros vírus e bactérias do trato respiratório, entre os quais se destacam os rinovírus humanos, o adenovírus, o VSR e o *Streptococcus* spp. [34-35].

6.3. Clínica e diagnóstico

O HBoV 1 tem vindo a ser envolvido num conjunto de infeções respiratórias superiores e inferiores [4-5, 10, 33-34], assim como infeções potencialmente fatais [4]. Desta forma, as entidades clínicas mais frequentemente associadas a este vírus são a coriza aguda, a OMA, a sibilância aguda, a bronquiolite, as exacerbações agudas da asma, a pneumonia e até mesmo a bronquite plástica [35]; além disso, tem sido debatida a relação controversa entre o HBoV 1 e a doença de Kawasaki [35].

O quadro clínico dos doentes é normalmente caracterizado por febre, tosse, rinorreia, dispneia [34-35] e, mais raramente, conjuntivite ou erupções cutâneas [34]. Ao exame físico, torna-se relativamente frequente a presença de cianose, taquipneia e alterações da auscultação pulmonar, principalmente sibilos e ferveores [35]. A radiografia do tórax dos indivíduos com infeções respiratórias inferiores apresenta geralmente infiltrados pulmonares bilaterais [34-35], hiperinsuflação pulmonar, congestão peribrônquica e atelectasias [35].

Apesar da grande maioria das infeções respiratórias ser clinicamente indistinguível, o HBoV 1 parece desencadear uma hipoxia e uma neutrofilia mais severas do que o VSR, em crianças com infeções respiratórias inferiores [35].

Segundo um estudo conduzido por García-García *et al.*, o HBoV 1 foi frequentemente identificado nos casos graves de sibilância; na verdade, foi o terceiro vírus mais comum em lactentes e o quarto em crianças em idade pré-escolar [10]. Além disso, os casos descritos

partilhavam semelhanças com os associados à infecção pelo VSR sendo que, notavelmente, a proporção de doentes com hipoxia foi menor no grupo do HBoV 1 [10].

Embora as infecções causadas pelo HBoV 2, 3 e 4 sejam ainda pouco conhecidas [4], os dois primeiros parecem estar associados ao desenvolvimento de gastroenterites [35].

Nos recetores de transplante de órgão sólido ou de células precursoras hematopoiéticas, os HBoV podem desencadear febre, tosse, rinorreia, diarreia e infecções disseminadas [9].

Até ao presente, o diagnóstico virológico das infecções causadas pelo HBoV 1 não pode ser realizado por cultura celular, na medida em que este vírus apenas foi cultivado em células epiteliais respiratórias primárias humanas, as quais não se encontram indicadas na realização deste procedimento laboratorial [4, 34].

Nesta perspetiva, a pesquisa de HBoV 1 cinge-se essencialmente à aplicação de técnicas de PCR [4, 34-35, 39] em dois tipos diferentes de amostras, designadamente soro sanguíneo ou aspirados nasofaríngeos. No entanto, a sensibilidade da deteção do ADN do HBoV 1 no soro sanguíneo ainda não foi determinada, o que também acontece com a duração da virémia associada à infecção primária por este agente patogénico [35]. Por outro lado, alguns estudos têm identificado uma possível correlação entre os valores mais elevados de carga viral e o desenvolvimento de sintomas respiratórios e de virémia detetável, pelo que se tem discutido o interesse da quantificação dos ácidos nucleicos ao longo do diagnóstico virológico [35].

Os estudos serológicos demonstraram que a mera presença do ADN deste vírus em amostras respiratórias como, por exemplo, os aspirados nasofaríngeos não prova a existência de uma infecção primária aguda [5, 35]; assim, a PCR em soro sanguíneo parece ultrapassar os falsos positivos devidos à persistência do ADN do vírus na nasofaringe [4, 35, 39].

Na impossibilidade de colher amostras de soro sanguíneo, a melhor opção é a utilização de uma PCR quantitativa com um ponto de corte de mais de 10^4 genomas/ml de ADN de HBoV1, em aspirados nasofaríngeos [4, 39].

Assim, a confirmação da infecção primária aguda pelo HBoV 1 requer geralmente a utilização de uma PCR em soro sanguíneo, uma PCR quantitativa em aspirados nasofaríngeos e também métodos serológicos [4-5, 34-35, 39].

O ensaio imunoenzimático com medição da avidéz da imunoglobulina G foi criado no sentido de permitir uma caracterização mais precisa da infecção pelo HBoV 1; deste modo, torna-se possível distinguir entre as infecções agudas e passadas, bem como entre as infecções primárias, secundárias e imunotivações (mais frequentes em adultos) [35].

Alguns relatos recentes têm descrito a detecção de anticorpos específicos contra o HBoV 1 em soro sanguíneo por meio de técnicas de *Western blot* ou de imunofluorescência [34].

6.4. Tratamento

Embora a infecção pelo HBoV 1 tenha vindo a ser associada a sintomas respiratórios inferiores, a maioria dos indivíduos possui um decurso autolimitado, sendo que o tratamento é essencialmente sintomático e de suporte [35]. Assim, a abordagem inicial inclui a vigilância da temperatura, da condição respiratória (apneia, hipoxemia ou insuficiência respiratória), da nutrição e da hidratação, bem como a oxigenoterapia [8]. A terapêutica da bronquiolite e das infecções respiratórias em indivíduos imunodeprimidos é sobreponível à anteriormente descrita para aquelas causadas pelo hMPV (confrontar com as páginas 25 e 26).

Num ensaio clínico randomizado em crianças com manifestações típicas de sibilância, a administração de corticosteróides, tais como a prednisolona, não foi considerada uma opção eficaz no tratamento das infecções provocadas pelo HBoV 1 [35].

Atualmente, não existem estudos comparativos relativamente à utilização de fármacos antivirais nem quaisquer vacinas disponíveis para este agente patogénico [9, 35].

7. Discussão e conclusão

Os vírus são responsáveis por uma percentagem significativa de infeções respiratórias agudas e considerados uns dos principais fatores de morbimortalidade a nível mundial; além disso, a constante modificação dos seus genomas acaba por garantir um suprimento regular de múltiplos agentes patogénicos [3].

Ao longo dos últimos anos, os avanços nos diversos métodos de diagnóstico virológico, especialmente os baseados na deteção e quantificação de ácidos nucleicos, têm resultado em melhorias na deteção laboratorial dos vírus respiratórios emergentes [3, 4-5, 8]. Neste sentido, perspectiva-se que um conjunto de outros vírus venha a ser igualmente descoberto pela mesma metodologia o que, aliás, é compatível com a proporção atual de infeções respiratórias que se mantém sem etiologia conhecida.

Estes agentes patogénicos podem causar infeções respiratórias superiores e inferiores em todas as faixas etárias, incidindo particularmente na população pediátrica, geriátrica e imunodeprimida [4-5, 8]; além destes, os indivíduos com doenças crónicas subjacentes estão em maior risco de desenvolver complicações graves no decurso das suas infeções [12].

Na população pediátrica, o diagnóstico das infeções respiratórias virais é complicado pela dificuldade em determinar a causalidade, já que o estado de portador nasofaríngeo de potenciais agentes patogénicos é comum em crianças saudáveis, e pelo facto de a coinfeção com dois ou mais microrganismos ser relativamente frequente [13].

Na população geriátrica, o estabelecimento do diagnóstico das infeções respiratórias virais é um processo desafiante, na medida em que o quadro clínico pode ser bastante variável (desde sintomas pouco específicos ou mesmo atípicos, tais como ausência de febre, anorexia, confusão, tonturas e quedas, até insuficiência pulmonar e IC); por outro lado, alguns doentes podem não ser capazes de articular os seus sintomas claramente [5].

Em ambos os grupos, a detecção viral precisa e atempada tem benefícios consideráveis, destacando-se a melhoria da terapêutica instituída e a diminuição dos custos associados aos cuidados de saúde [13]; contudo, os aspirados nasofaríngeos tradicionalmente recolhidos em crianças não são bem tolerados em adultos e idosos [5], pelo que não só o tipo de amostra e o momento ideal para proceder à sua colheita continuam desconhecidos, como também as taxas de detecção declinam bastante com a idade [4-5].

Genericamente, os métodos moleculares são a melhor opção diagnóstica nos casos de infeções respiratórias virais, já que são técnicas com elevada sensibilidade, especificidade e capacidade de resposta. Além disso, a quantificação viral pode ser útil para estabelecer se um dado agente patogénico está associado ao desenvolvimento de doença grave [13]. Apesar da PCR *multiplex* parecer uma solução atraente, a sensibilidade adquirida na identificação de um vírus isoladamente pode perder-se em comparação com a PCR convencional [5].

À exceção do HBoV, é geralmente aceite que a presença de ácidos nucleicos do hMPV, do CoV-SARS, do CoV NL63 e do CoV HKU1 em secreções do trato respiratório indica a uma infeção recente, pois estes vírus normalmente não originam infeções latentes [12].

Praticamente todos os vírus disseminados na comunidade podem provocar infeções em recetores de transplante de órgão sólido ou de células precursoras hematopoiéticas sendo que, nos últimos anos, tem sido concedida uma atenção especial aos vírus respiratórios [9].

Em consequência da utilização de fármacos com acentuado efeito imunossupressor, as infeções respiratórias virais alcançaram uma relevância considerável neste grupo específico de doentes; além disso, o espectro de infeções virais graves está a aumentar entre os pacientes que, até há algum tempo atrás, geralmente não possuíam este tipo de manifestações. Assim, nos imunodeprimidos, o tratamento das infeções respiratórias virais deve ser complementado com uma redução no grau e na intensidade da supressão imunológica [9].

Embora algumas infecções respiratórias virais possam ser evitadas através de medidas gerais de prevenção, tais como a lavagem das mãos e o isolamento dos doentes infetados, a propagação entre espécies e a disseminação entre seres humanos infetados não são facilmente controláveis. No entanto, torna-se imprescindível limitar ao máximo a exposição a estes vírus, nomeadamente no que diz respeito à transmissão horizontal.

Na medida em que não existe nenhum tratamento antiviral específico e que é possível estabelecer uma estratégia terapêutica padronizada para todas as infecções respiratórias virais, a realização do diagnóstico virológico é geralmente dispensada; contudo, a deteção viral pode ter uma importância prática extrema não só no isolamento de doentes infetados, mas também na redução dos casos de antibioterapia desnecessária [4-5].

No futuro próximo, tendo em consideração a incomparável capacidade de adaptação dos vírus respiratórios é provável que, independentemente dos fármacos antivirais que se venham a desenvolver, o surgimento de resistências seja inevitável [3]; por outro lado, à medida que o número de indivíduos vulneráveis aumentar, perspectiva-se que as infecções respiratórias virais se mantenham um problema de Saúde Pública extremamente importante.

O recurso a medidas gerais de prevenção aliadas à vigilância clínica, epidemiológica e a novas abordagens diagnósticas e terapêuticas poderá reduzir os encargos socioeconómicos associados a estas infecções. Desta forma, na avaliação de novas metodologias de diagnóstico, o médico deve ser capaz de interpretar um resultado positivo, integrando-o de acordo com a epidemiologia, as manifestações clínicas do doente e outras informações relevantes, sendo que esta é a única maneira de instituir o plano de ação mais adequado. Idealmente, os novos métodos supramencionados deverão ser capazes de revolucionar o comportamento médico e melhorar o prognóstico dos pacientes [13].

Entretanto, é imprescindível realizar estudos epidemiológicos adicionais que permitam estabelecer com precisão a patogénese e os modos de apresentação dos vírus respiratórios

recentemente descobertos e compreender o papel das infecções múltiplas nos casos de infecções respiratórias inferiores.

Por fim, torna-se ainda indispensável executar investigações que incidam nas diferentes formas de limitar a propagação dos vírus respiratórios na comunidade, em ambiente hospitalar e em instituições de acolhimento a idosos, sobretudo em circunstâncias epidêmicas.

Agradecimentos

Agradeço ao Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e, muito especialmente, à Doutora Célia Nogueira pela orientação científica, pela disponibilidade demonstrada, pelos sábios conselhos e, acima de tudo, por ser um elemento determinante para que o presente artigo mantivesse o máximo de rigor e de qualidade.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo apoio contínuo e pelo enorme sacrifício.

Agradeço aos meus amigos pelo companheirismo, pela compreensão e pelo incentivo à concretização dos meus objetivos pessoais e profissionais.

Referências bibliográficas

1. Lopez AD, Mathers CD. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006;100:481-99.
2. World Health Organization (WHO). Acute respiratory infections [documento *online*]. Genebra: WHO; 2012. Disponível em http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/
3. Waterer G, Wunderink R. Respiratory infections: A current and future threat. *Respirology*. 2009;14: 651-655.
4. Jartti T, Jartti L, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M. New respiratory viral infections. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2012;18:271-278.
5. Jartti L, Langen H, Söderlund-Venermo M, Vuorinen T, Ruuskanen O, Jartti T. New respiratory viruses and the elderly. *Open Respir Med J*. 2011;5:61-69.
6. Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions. *Pediatric Pulmonology* 2003;36:469-474.
7. Roth D, Caulfield L, Ezzati M, Black R. Acute lower respiratory infections in childhood: opportunities for reducing the global burden through nutritional interventions. *Bulletin of the World Health Organization* 2008;86:356-364.
8. Díaz A, Zaragoza R, Granada R. Acute viral infections in immunocompetent patients. *Med Intensiva*. 2011;35(3):179-185.
9. Salavert M, Granada R, Díaz A. Role of viral infections in immunosuppressed patients. 2011;35(2):117-125.
10. García-García ML, Calvo C, Falcón C, Pozo F, *et al*. Role of emerging respiratory viruses in children with severe acute wheezing. *Pediatric Pulmonology* 2010;45:585-591.
11. Beckham JD, Cadena A, Lin J, Piedra PA, *et al*. Respiratory viral infections in patients with chronic, obstructive pulmonary disease. *Journal of Infection* 2005;50:322-330.

12. Garbino J, Gerbase MW, Wunderli W, Deffernez C, *et al.* Lower respiratory viral illnesses: improved diagnosis by molecular methods and clinical impact. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1197-1203.
13. Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clinical Infectious Diseases* 2011;52:284-289.
14. van den Hoogen BG, Jong JC, Groen J, Kuiken T, *et al.* A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory disease. *Nat Med* 2001;7:719-724.
15. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;7:3043-3045.
16. Kahn J. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clinical Microbiology Reviews* 2006;546-557.
17. Buchholz UJ, Biacchesi S, Pham QN, Tran KC, *et al.* Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *J. Virol.* 2005;79:6588-6597.
18. Manoha C, Espinosa S, Ahob SL, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *Journal of Clinical Virology* 2007;38:221-226.
19. Heikkinen T, Österback R, Peltola V, Jartti T, *et al.* Human metapneumovirus infections in children. *Emerging Infectious Diseases* 2008.
20. Schlapbach LJ, Agyeman P, Hutter D, Aebi C, *et al.* Human metapneumovirus infection as an emerging pathogen causing acute respiratory distress syndrome. *Journal of Infectious Diseases* 2011;203:294-295.
21. Williams JV, Tollefson SJ, Nair S, Chonmaitree T. Association of human metapneumovirus with acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70:1189-1193.

22. Percivalle E, Sarasini A, Visai L, Revello MG, Gerna G. Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;7:3443-3446.
23. Mackay IM, Jacob K, Woolhouse D, Waller K, *et al.* Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;1:100-105.
24. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen K. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses* 2010;2:1804-1820.
25. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Review* 2005;12:635-664.
26. Poon LLM, Guan Y, Nicholls JM, Yuen KY, *et al.* The aetiology, origins, and diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Infect Dis* 2004;4:663-71.
27. Frieman M, Heise M, Baric R. SARS coronavirus and innate immunity. *Virus Res.* 2008;133(1):101-112.
28. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, *et al.* Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004; 10:368–373.
29. Abdul-Rasool S, Fielding BC. Understanding human coronavirus HCoV-NL63. *The Open Virology Journal* 2010;4:76-84.
30. Lau SKP, Woo PCY, Yip CCY, Tse H, *et al.* Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;6:2063-2071.
31. Woo PCY, Lau SKP, Yip CCY, Huang Y, *et al.* More and more coronaviruses: human coronavirus HKU1. *Viruses* 2009;1:57-71.
32. World Health Organization (WHO). International workshop on development of vaccines for SARS and new human influenza vaccines [documento *online*]. China: WHO; 2004. Disponível em http://www.who.int/vaccine_research/diseases/sars/events/2004/03/en/

33. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:12891-12896.
34. Lindner J, Modrow S. Human bocavirus – a novel parvovirus to infect humans. *Intervirology* 2008;51:116-122 .
35. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O *et al.* Human bocavirus – the first 5 years. *Rev. Med. Virol.* 2012;22:46-64.
36. Chen AY, Cheng F, Lou S, Luo Y, *et al.* Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. *Virology* 2010;403(2):145-154.
37. Kantola K, Hedman L, Arthur J, Alibeto A, *et al.* Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4. *The Journal of Infectious Diseases* 2011;204:1403-12.
38. Karalar L, Lindner J, Schimanski S, Kertai M, *et al.* Prevalence and clinical aspects of human bocavirus infection in children. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:633-639.
39. Kantola K, Sadeghi M, Antikainen J, Kirveskari J, *et al.* Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(11):4044-4050.
40. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Virus Taxonomy: 2012 Release (current)* [documento *online*]. United States of America: ICTV; 2012. Disponível em <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
41. Hagemeyer M, Rottier P, Haan CAM. Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures. *Viruses* 2012;4;3245-3269.