

**Universidade da Beira Interior**

# **Detecção do Bocavírus Humano em crianças com infecção respiratória**

**Mestrado em Bioquímica**

*Sandra Sofia Mimoso Pinhancos*

Covilhã 2008

Universidade da Beira Interior

Departamento de Química

Dissertação para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, sob a orientação da Prof. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Domingues da Universidade da Beira Interior e da Dr<sup>a</sup>. Sofia Almeida do Centro Hospitalar da Cova da Beira.

*Sandra Sofia Mimoso Pinhancos*

Covilhã 2008

## Agradecimentos

Aos meus tios, João e Otília  
por todo o carinho e dedicação ao longo destes anos.  
Sois o meu grande exemplo de vida. Muito obrigado, adoro-vos.

A ti Henrique, a quem dedico este trabalho,  
obrigado por tudo Amor.

Ao meu pai, para que continue comigo. À minha avó por tudo que faz por mim.  
Aos meus primos, Carla e Manel, obrigado pelo vosso carinho e disponibilidade. Ao  
meu sobrinho João, à minha prima Patrícia, um agradecimento também muito especial.

A ti mãe porque sei que estás sempre comigo.

Agradeço aos meus orientadores Professora Dr<sup>a</sup> Fernanda Domingues e à Dr<sup>a</sup>. Sofia Almeida, por toda a ajuda na execução deste trabalho.

Ao Dr<sup>o</sup> Ricardo pela ajuda para o desempenho do trabalho.

Um agradecimento especial à Dr<sup>a</sup>. Sofia por toda a paciência e pelo encorajamento ao longo destes meses, por estar sempre ao meu lado na realização de todo o trabalho, enfim por tudo.

Agradeço à Dr<sup>a</sup> Conceição Faria, pela autorização da realização do trabalho no serviço de patologia clínica.

Quero igualmente agradecer aos meus amigas de faculdade, Ângela, Caty, Filo. À D. São por todo a ajuda ao longo destes anos.

Um agradecimento do fundo do coração à Dr<sup>a</sup> Carolina por me acolher tão bem, e às minhas colegas de trabalho da Farmácia Central, onde desejo aprender ainda muito mais e continuar a fazer o que realmente gosto. Obrigado por tudo.

Um Bem-haja à Dr<sup>a</sup> Isabel Curto, e a todos da Farmácia Mousaco Torrão, por todos os ensinamentos e pela oportunidade que me deram de crescer profissionalmente.

## **Abreviaturas**

**AD** - adenovírus

**BPV** - Parvovirus bovino

**HBoV** - bocavírus humano

**IA** - vírus influenza A

**IB** - vírus influenza B

**ITRS** - Infecções do tracto respiratório superior

**MPvH** - metapneumovírus humano

**MVC** - Parvovirus canino

**NP-1** - proteína não-estrutural de função desconhecida

**NS1** - proteína não-estrutural

**ORF** - Open Reading Frames

**PCR** - Reacção em cadeia de polimerase

**RT-PCR** - Reacção em cadeia de polimerase em tempo real

**VSR** - vírus sincicial respiratório

**VPI** - vírus parainfluenza

**VP1** – proteína da cápside 1

**VP2** – proteína da cápside 2

## Índice de Figuras

Figura 1: Esquema resumido da técnica usada para a descoberta do HBoV.....	7
Figura 2: Figura representativa da replicação da família <i>Parvoviridae</i> .....	9
Figura 3: Mapa do genoma do HBoV. ....	10
Figura 4: Número de amostras estudadas em cada mês. ....	22
Figura 5: Representação gráfica do número de crianças por faixa etária.....	23
Figura 6: Plasmídeo comercial pCR-4TOPO (Invitrogen).....	24
Figura 7: Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o HBoV. ....	32
Figura 8: Distribuição das amostras do HBoV por idades. ....	33
Figura 9: Distribuição das co-deteccões entre o HBoV e restantes vírus.....	35
Figura 10: Frequência de cada diagnóstico estabelecido. ....	37
Figura 11: Frequência dos episódios de internamento e urgência e casos positivos totais do HBoV.....	38
Figura 12: Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o VSR.....	42
Figura 13: Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o AD.....	43
Figura 14: Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o IA. ....	44
Figura 15: Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o IB.....	45
Figura 16: Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o MPvH. .	46
Figura 17: Representação da distribuição mensal de cada vírus. ....	48

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Tipos de doenças respiratórias.....	2
Tabela 2: Classificação da família <i>Parvoviridae</i> . Adaptado de: Muñoz. 2006.....	9
Tabela 3: Aplicações dos métodos de diagnóstico de vírus respiratórios. ....	19
Tabela 4: Número de crianças distribuídas pelas faixas etárias. ....	22
Tabela 5: Sequência dos primers desenhados para a 1ª PCR. ....	27
Tabela 6: Sequência dos primers desenhados para a 2ª PCR. ....	27
Tabela 7: Condições utilizadas no programa de PCR. ....	27
Tabela 8: Composição do gel de agarose. ....	29
Tabela 9: Distribuição mensal do número de casos de infecção por HBoV. ....	32
Tabela 10: Distribuição das amostras do HBoV por idades. ....	33
Tabela 11: Número de amostras por sexo para a infecção por HBoV. ....	34
Tabela 12: Casos de co-deteção entre o HBoV e os restantes vírus. ....	35
Tabela 13: Diagnóstico estabelecido pelo clínico para cada criança incluída no estudo. .....	36
Tabela 14: Frequência de episódios internamento e de urgência, e casos positivos totais do HBoV.....	38
Tabela 15: Frequência de episódios internamento e de urgência, e casos positivos apenas do HBoV.....	39
Tabela 16: Frequência de episódios internamento e de urgência, e casos positivos apenas do VSR. ....	40
Tabela 17: Vírus respiratórios analisados.....	41
Tabela 18: Distribuição mensal do número de casos de infecção por VSR.....	41
Tabela 19: Distribuição mensal do número de casos de infecção por AD.....	43
Tabela 20: Distribuição mensal do número de casos de infecção por IA.....	44
Tabela 21: Distribuição mensal do número de casos de infecção por IB.....	45
Tabela 22: Distribuição mensal do número de casos de infecção por MPvH.....	46
Tabela 23: Distribuição mensal do número de casos de infecção por VPI1, VPI2 e VPI3. .....	47
Tabela 24: Distribuição mensal de cada vírus.....	48

# Índice Geral

Agradecimentos.....	III
Abreviaturas.....	V
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tabelas.....	VII
Índice Geral.....	VIII
Resumo.....	XI
Abstract.....	XII
I. Revisão Bibliográfica.....	1
1. <i>Introdução geral</i> .....	1
2. <i>Doenças Respiratórias</i> .....	1
3. <i>Infecções Respiratórias</i> .....	2
4. <i>Infecções respiratórias na criança</i> .....	3
4.1 A bronquiolite na criança.....	3
4.2 Agentes virais responsáveis por infecção respiratória na criança.....	4
5. <i>O Bocavírus Humano (HBoV)</i> .....	6
5.1 Bocavírus Humano - um novo agente de infecção respiratória.....	6
5.1.1 Classificação - a família <i>Parvoviridae</i> .....	8
5.2 Organização genómica do HBoV.....	10
5.3 Epidemiologia.....	10
5.4 Sintomatologia.....	12
5.5 Transmissão.....	13
5.6 Sazonalidade.....	13
5.7 Idade e Sexo.....	14
5.8 Co-infecções.....	14
5.9 Bocavírus Humano e gastroenterites.....	15
6. <i>Métodos de diagnóstico das infecções respiratórias</i> .....	15
6.1 Cultura celular.....	16
6.2 Imunofluorescência.....	16
6.3 Testes rápidos imunoenzímicos e imunocromatográficos.....	17
6.4 Métodos serológicos.....	17
6.5 Métodos biologia molecular.....	18
6.6 Métodos de diagnóstico do Bocavírus Humano.....	19

6.7 Importância do estudo .....	20
II. Objectivos .....	21
III – Materiais e Métodos .....	22
1. População estudada .....	22
2. Preparação das amostras .....	23
3. Transformação de bactérias competentes e selecção – Determinação da sensibilidade da técnica.....	24
4. Pesquisa do DNA do HBoV .....	26
4.1 Extracção e purificação do DNA.....	26
4.2 Detecção do HBoV por nested-PCR .....	26
4.3 Controlo de qualidade.....	28
4.3.1 Prevenção de contaminações das amostras .....	28
4.4 Detecção dos produtos amplificados – Electroforese em gel de agarose .....	29
5. Detecção de outros vírus – VSR, MPvH,.....	30
IV. Apresentação e discussão dos resultados .....	31
1. Infecção por HBoV .....	31
1.1 Sensibilidade do método.....	31
1.2 Prevalência da infecção por HBoV .....	31
1.3 Idade e Sexo .....	33
1.4 Co-infecções .....	35
1.5 Diagnóstico clínico .....	36
1.6 Serviço .....	38
1.6.1 Serviço – HBoV .....	38
1.6.2 Serviço - VSR.....	40
2. Outros vírus respiratórios estudados.....	41
2.1 VSR .....	41
2.1.1 Prevalência do VSR.....	42
2.2 AD .....	43
2.2.1 Prevalência do AD.....	43
2.3 IA .....	44
2.3.1 Prevalência do IA .....	44
2.4 IB .....	45
2.4.1 Prevalência do IB.....	45
2.5 MPvH .....	46

2.5.1 Prevalência do MPvH.....	47
Sendo o número de casos positivos igual a 16, num total de 150 amostras, obtém-se uma taxa de prevalência do MPvH igual a 10,67%. .....	47
2.6 VPI.....	47
2.6.1 Prevalência do VPI .....	47
3. Sazonalidade dos vírus .....	48
V. Conclusões.....	50
VI. Perspectivas Futuras.....	52
VII. Referências Bibliográficas .....	53
VIII. Anexos .....	58

## **Resumo**

**Palavras-chave:** Vírus respiratórios, Bocavírus Humano,

## **Abstract**

**Keywords:** Respiratory viruses, Human Bocavirus,

# **I. Revisão Bibliográfica**

## ***1. Introdução geral***

As infecções respiratórias são a principal causa de morbidade e mortalidade em crianças, sobretudo nos meses de Inverno (Muñoz, 2006). Os vírus, nomeadamente, o vírus sincicial respiratório (VSR), o vírus parainfluenza (VPI), o rinovírus, o adenovirus (AD), o coronavírus, e os vírus influenza A (IA) e B (IB), são os principais responsáveis por este tipo de infecções (Kesebir et al., 2006).

Apesar dos aspectos clínicos das doenças respiratórias serem facilmente reconhecidos, o agente etiológico responsável, muitas vezes não é identificado (Kahn, 2007). No entanto recentemente, com o uso de métodos de biologia molecular, têm sido descobertos vários agentes virais associados a infecções respiratórias, nomeadamente o metapneumovirus humano (MPvH), vários coronavírus, e por último o bocavirus humano (HBoV).

O HBoV pertence à família *Parvoviridae* e foi descrito pela primeira vez em 2005, em Estocolmo, por T. Allander e sua equipa, que verificaram a presença do vírus em 17 num total de 540 amostras de crianças com infecção respiratória (Allander et al., 2005). Desde então, várias equipas de investigadores têm procurado estudar o seu papel nas infecções respiratórias.

## ***2. Doenças Respiratórias***

As doenças respiratórias são, isoladamente, a causa mais frequente de consulta ao clínico geral em quase todos os grupos etários, tendo especial incidência em recém-nascidos, crianças e idosos, com uma importante taxa de morbidade e mortalidade (Allander et al., 2007). Referem-se especificamente àquelas que afectam o tracto e os órgãos do sistema respiratório. Constituem factores de risco para doença do tracto respiratório o tabagismo, a poluição, a exposição profissional a poluentes atmosféricos, as condições alérgicas, entre outros.

Existem vários tipos diferentes de doenças respiratórias, descritas na tabela 1.

**Tabela 1:** Tipos de doenças respiratórias.

<b>Broncopatias</b>	Doenças dos brônquios.
<b>Pneumopatias</b>	Doenças pulmonares (pneumonia e o síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido).
<b>Hipersensibilidade respiratória</b>	Hipersensibilidade que afecta o tracto respiratório (asma, a febre dos fenos e rinite alérgica, e infecções do tracto respiratório).
<b>Doenças nasais</b>	Doenças do nariz em geral (rinite).
<b>Doenças torácicas</b>	Doenças que afectam o tórax.
<b>Fístula do trato respiratório</b>	Passagem anormal na comunicação entre algum componente do trato respiratório.

### ***3. Infecções Respiratórias***

As infecções respiratórias são infecções que afectam o tracto e os órgãos do sistema respiratório. São doenças bastante comuns, que podem atingir a população em geral, provocando desde simples constipações a pneumonias, mas tendem a ser mais graves em indivíduos com o sistema imunológico debilitado, como os idosos, e principalmente, em crianças (Kesson, 2007). Num adulto saudável esse tipo de infecção pode-se manifestar como uma gripe comum, numa criança, é possível que a infecção se manifeste com sintomas mais acentuados, levando a doenças mais graves, como a bronquiolite e a pneumonia.

A infecção do tracto respiratório pode ocorrer pela inalação de aerossóis que contêm o agente infeccioso, formados a partir de secreções respiratórias, pelo contacto próximo com pessoas infectadas ou pelo contacto com objectos ou superfícies contaminadas, sendo frequentes as epidemias em aglomerados de crianças, como os infantários, escolas e hospitais.

As infecções do tracto respiratório podem ser divididas em infecções do tracto respiratório superior e infecções do tracto respiratório inferior. Das infecções do trato respiratório superior podem resultar rinite, sinusite, faringite e laringite. As infecções do tracto respiratório inferior, referem-se de uma forma inespecífica a bronquites, bronquiolites e pneumonias. Estas podem levar a exacerbações de asma, otites e a infecções do tracto respiratório superior (Arnold et al., 2006).

#### ***4. Infecções respiratórias na criança***

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as infecções respiratórias ocupam o segundo lugar nas causas de morte de crianças com idade inferior a cinco anos (Murray et al., 2001). As infecções respiratórias na criança são cerca de duas a três vezes mais frequentes que nos adultos (Kesson, 2007), podendo repetir-se cerca de 3 a 8 vezes por ano (Arnold et al., 2006).

No que diz respeito às infecções do tracto respiratório inferior, a bronquiolite e a pneumonia são as patologias mais frequentes e mais graves. Aproximadamente 3% das crianças são hospitalizadas no primeiro ano de vida devido a infecção viral do tracto respiratório inferior (Kesson, 2007).

As bronquiolites, constituem o principal diagnóstico de crianças hospitalizadas e causam um número elevado de hospitalizações principalmente de lactentes e crianças com idade inferior a 2 anos (Qu et al., 2007).

##### **4.1 A bronquiolite na criança**

A bronquiolite é uma doença respiratória aguda, que resulta da inflamação dos bronquíolos, caracterizada por sibilos (“pieira”, “chieira”). É precedida por um a três dias de sintomas do tracto respiratório, tais como, congestão nasal, febre, perda de apetite e irritabilidade. Passados alguns dias, a doença começa a atingir os bronquíolos, podendo a criança ficar com pieira e/ou dificuldade em respirar (respiração mais rápida, ofegante) (Caballero et al., 2001). A inflamação da parede dos bronquíolos, cujo diâmetro interno é muito pequeno nas crianças, faz com que estes fiquem parcialmente obstruídos e que produzam expectoração em excesso, contribuindo ainda mais para a sua obstrução. A infecção pode provocar necrose das células epiteliais que revestem os bronquíolos, levando a uma infiltração peribrônquica que pode evoluir para uma pneumonia intersticial.

A bronquiolite pode ser de origem viral, ou então, menos frequentemente, de origem bacteriana. É mais comum nos meses de Inverno e muito contagiosa, transmitindo-se pela saliva, secreções, mãos e material contaminado. O VSR constitui a principal causa deste tipo de infecção.

Na terapia farmacológica podem constar bronquidilatadores por inalação, apesar de a sua eficácia ainda estar a ser estudada e corticosteroides cujo efeito anti-inflamatório vai levar à redução da obstrução das vias respiratórias diminuindo o volume bronquiolar, ou seja, vão controlar a broncoconstrição.

Alguns factores são importantes para a decisão do tipo de tratamento, como a idade da criança, estágio e causa da infecção e o sítio da obstrução das vias respiratórias. Nos primeiros estágios, pode ser tratada com fármacos, mas se a doença progredir, então é necessário proceder-se à hospitalização para administração de terapêutica de suporte, como administração de oxigénio ou manutenção da hidratação, uma vez que as crianças com bronquiolites devido à febre e à difícil ingestão de líquidos têm uma grande dificuldade em manter uma hidratação adequada (Caballero et al., 2001).

Factores de risco para a própria doença e/ou para as complicações das bronquiolites incluem: gestação inferior a 37 semanas, idade inferior a 12 semanas, doença pulmonar crónica, cardiopatia congénita, deficiência no sistema imunitário, defeitos anatómicos e congénitos das vias respiratórias e doença neurológica. Factores ambientais, tais como: fumadores passivos e má ventilação da casa, também podem contribuir para a doença.

#### **4.2 Agentes virais responsáveis por infecção respiratória na criança**

Nas crianças, a maioria das infecções do tracto respiratório superior e inferior são de origem viral (Kahn, 2007; Garcia-García, 2007). Assim, os rinovírus, os coronavírus, o VRS, o AD, o IA e o IB, o VPI, e mais recentemente descoberto o MPvH assumem um papel primordial (Allander et al., 2005).

Os rinovírus pertencentes à família *Picornaviridae* são os agentes mais frequentes de infecção do tracto respiratório superior, apesar de recentemente terem sido também associados à infecções do tracto respiratório inferior, incluindo bronquiolites. A infecção caracteriza-se por, após um período de incubação curto de dois a três dias, ocorrer um processo inflamatório local, com edema e infiltração celular, levando à obstrução e rinorreia. Estes vírus transmitem-se por via aérea (nariz, boca ou olhos) e replicam-se a nível das células do aparelho respiratório superior, principalmente a nível

da mucosa nasal. A infecção por este vírus ocorre principalmente durante a Primavera e Outono (Kesson, 2007).

Os coronavírus devem o seu nome ao aspecto de coroa quando observados ao microscópio electrónico. São agentes responsáveis pelas constipações vulgares e por infecções do tracto inferior (pneumonias) afectando principalmente a criança. Podem estar associados a gastroenterites quer em adultos como em crianças. Os coronavírus, nomeadamente, o SARS-coV, foram identificados como o agente responsável pela síndrome da doença respiratória aguda (SARS), que afectou os países Asiáticos durante o Inverno de 2002. O SARS-coV apresenta-se como uma pneumonia grave com uma taxa de mortalidade elevada (3 a 30%). O coronavírus NL63 foi identificado cerca de 1 a 10% em crianças com infecções do tracto respiratório (Kanh, 2007).

Os adenovírus são vírus responsáveis por infecções do aparelho respiratório superior e inferior, principalmente em crianças com menos de 5 anos de idade. São em geral transmitidos pelas vias respiratórias superiores, por via fecal-oral, ou por contacto directo pelas mãos ou material contaminado. São, também, o agente patogénico de gastroenterites, sendo a principal causa de diarreia viral aguda em crianças. O quadro clínico inclui sintomas de constipação comum, faringite, febre, amigdalite, otite, frequentemente associadas a febre. Os adenovirus são excretados por longos períodos de tempos assim, a presença do vírus não está necessariamente associada à doença. O pico de infecção respiratória por adenovírus ocorre no final do Inverno, Primavera e início do Verão, podendo, no entanto, ocorrer infecções durante todo o ano.

O VSR pertencente à família *Paramyxoviridae*, constitui a principal causa de infecções agudas do aparelho respiratório, em recém-nascidos e crianças. A nível de infecções do aparelho respiratório inferior, o VRS é responsável por infecções graves (bronquiolites e pneumonias) que podem conduzir à morte. É um vírus muito contagioso, transmite-se pelas vias aéreas superiores através de aerossóis, e é responsável por rinite e faringite. A infecção por VSR surge após um período de incubação curto de quatro a cinco dias, com sintomas nas vias respiratórias superiores como rinite, faringite e tosse. As re-infecções com este vírus são bastante frequentes. A infecção por VSR ocorre com maior incidência durante o Inverno e início da Primavera (Kesson, 2007).

O vírus influenza ou vírus da gripe, pertence à família *Orthomyxoviridae*, é responsável por grandes epidemias de gripe, uma doença infecciosa aguda do aparelho respiratório, que decorre habitualmente com grande morbidade e uma baixa taxa de

mortalidade. Estão descritos 3 tipos serológicos destes vírus respiratórios: vírus influenza A, B e C, mas apenas os serótipos A e B têm importância clínica na infecção no homem. Este vírus transmite-se por via respiratória, iniciando a sua replicação nas vias aéreas superiores, destrói as células epiteliais secretoras de muco ou cíliadas, eliminando assim a primeira barreira de defesa do organismo. Pela falta de protecção ciliar, a infecção viral primária facilita a propagação bacteriana, sendo frequente observarem-se pneumonias bacterianas graves (Kesson, 2007). Condições como aglomeração de pessoas em ambientes fechados, principalmente durante o inverno, facilitam a transmissão do vírus influenza.

O vírus parainfluenza, que pertence também à família *Paramyxoviridae*, é a seguir ao VSR, a causa mais comum de infecções do tracto respiratório inferior em crianças. Estão descritos 4 tipos serológicos (1 a 4) estando os tipos 1, 2 e 3 frequentemente associados a infecção do aparelho respiratório em crianças, nomeadamente pneumonias. O vírus parainfluenza está geograficamente distribuído por todo o mundo e as infecções ocorrem durante todo o ano, com maior frequência no Outono e Inverno (Kesson, 2007).

O MPvH foi descoberto em 2001 em crianças com infecções do tracto respiratório. A infecção por MPvH está associada a faltas de ar e asma, e estima-se que até aos 5 anos de idade cerca de 90% das crianças já tenham sido infectadas por este vírus. O espectro da infecção por MPvH é semelhante ao VRS (Maertzdorf et al., 2004).

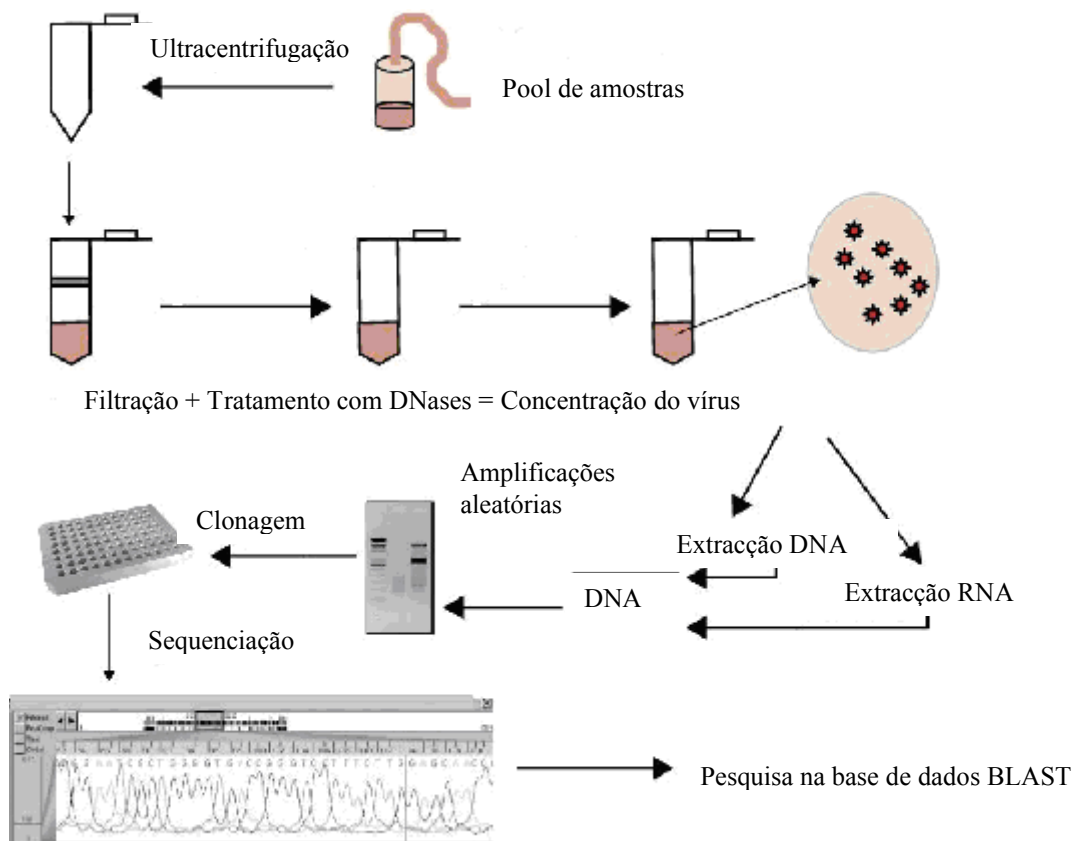
A identificação de novos vírus é importante para o estudo de doenças respiratórias, mas tecnicamente revela-se uma tarefa bastante difícil (Allander et al., 2005).

## **5. O Bocavírus Humano (HBoV)**

### **5.1 Bocavírus Humano - um novo agente de infecção respiratória**

O HBoV foi descrito pela primeira vez em 2005 na cidade de Estocolmo, por Tobias Allander, em aspirados nasofaríngeos de crianças com infecção do tracto respiratório (Allander, 2007). Para identificar o vírus os autores realizaram duas “pools” de sobrenadantes de várias amostras de doentes com infecção respiratória e

concentraram os vírus por ultracentrifugação. Após o passo de concentração, utilizaram um passo de purificação onde pretendiam eliminar DNA contaminante, para tal usaram técnicas de filtração e digestões enzimáticas usando DNases. O material obtido foi sujeito a uma amplificação por Random PCR (PCR aleatória), usando primers com uma extremidade 3' aleatória. Os fragmentos amplificados foram clonados e sequenciados, procedendo-se à sua análise filogenética. Após esta análise, chegaram à conclusão que para além de material genético de origem humana, bacteriana, proveniente de fagos e de vírus conhecidos (IA, RSV, hMPV, TT e coronavírus), detectavam ainda em ambas as pools, DNA de um parvovirus semelhante a 2 parvovirus, um de origem bovina e um de origem canina, pertencentes ao género bocavirus. A seguir, desenharam primers para a detecção específica deste vírus e pesquisaram a sua presença em amostras respiratórias, tendo detectado a sua presença em 17 num total de 540 amostras (Fig. 1) (Kesebir et al., 2006).



**Figura 1:** Esquema resumido da técnica usada para a descoberta do HBoV. Adaptado de: Foulongne et al., 2007.

A descoberta do HBoV foi bem recebida pela comunidade científica, pois permitiu abrir portas para o conhecimento de um novo vírus capaz de causar infecções respiratórias, além de ampliar o conhecimento da família Parvoviridae (Muñoz, 2006).

O HBoV foi o último vírus a ser descoberto, e foi provisoriamente assim denominado devido às suas semelhanças genéticas com o parvovírus bovino (BPV), e com o parvovírus canino (MVC), ambos membros da família *Parvoviridae* e gênero Bocavírus (Lu et al., 2006).

### **5.1.1 Classificação - a família *Parvoviridae***

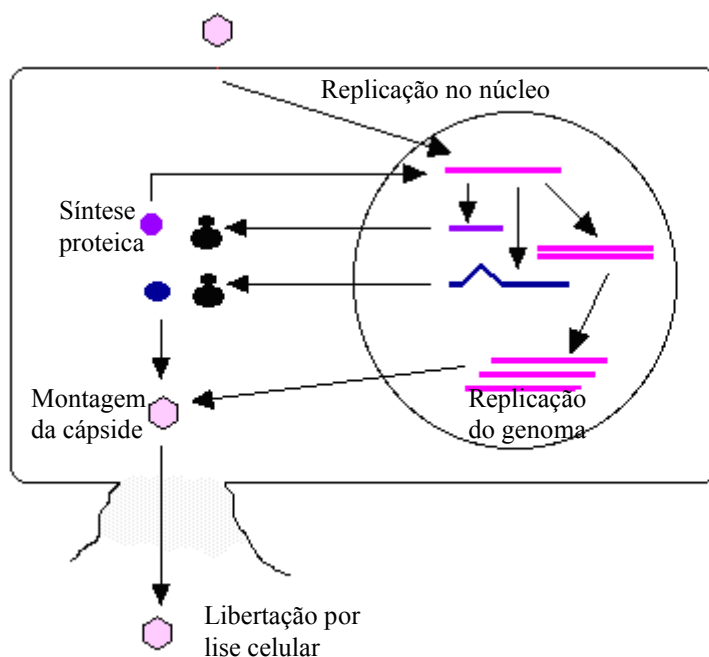
A família *Parvoviridae* abrange duas sub-famílias, a *Parvovirinae*, na qual estão incluídos os vírus que infectam os vertebrados, e a sub-família *Densovirinae*, que infectam os insectos (Tabela 2). Os gêneros da família *Densovirinae*, nomeadamente os *densovirus* e *iteravirus*, não têm interesse para a medicina humana, a não ser talvez na produção de antígenos recombinantes. Os *Parvovirinae* compreendem os gêneros *amdovirus*, *parvovirus*, *dependovirus* e *erithrovirus* (que inclui o parvovírus B19, que é o agente da quinta doença, também patogénico para o homem por infectar e destruir eritrócitos). Os *parvovirus* conseguem replicar-se de forma autónoma, enquanto os *dependovirus* dependem da presença de um vírus auxiliar, que é geralmente (mas nem sempre) um adenovírus, daí serem chamados, também, adenoassociados. Os *eritrovirus* replicam-se apenas em eritrócitos (Allander et al., 2005).

Os Parvovírus estão entre os menores vírus de ADN existentes (*Parvum* é a palavra latina para significar pequeno): têm um diâmetro que varia entre 18 a 26 nanómetros e uma arquitectura simples, sendo constituídos inteiramente por proteínas e DNA de cadeia simples (Kesebir. 2006). São em geral capazes de causar infecção sistémica, a nível do epitélio respiratório e intestinal, e das células hematopoiéticas.

**Tabela 2:** Classificação da família *Parvoviridae*. Adaptado de: Muñoz. 2006.

Sub-família	Hospedeiros	Gênero
<i>Parvovirinae</i>	Vertebrados	<i>Parvovírus</i>
		<i>Eritrovírus</i>
		<i>Dependovírus</i>
		<i>Amdovírus</i>
		<i>Bocavírus</i>
<i>Densovirionae</i>	Artrópodes	<i>Densovírus</i>
		<i>Iterovírus</i>
		<i>Brevidensovírus</i>
		<i>Pefudensovírus</i>

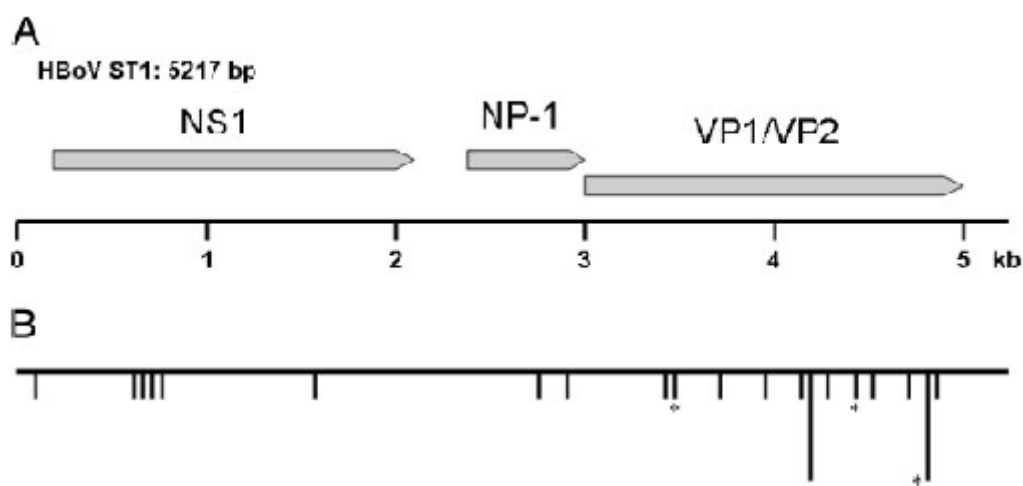
A replicação dos *Parvoviridae* ocorre no núcleo da célula durante a fase S do ciclo celular, onde o vírus parece chegar ainda com cápside. Após a descapsidação, dá-se a libertação do genoma viral, ocorrendo a síntese de DNA complementar, com a formação de DNA de cadeia dupla e a transcrição. As várias proteínas são sintetizadas no citoplasma e posteriormente exportadas para o núcleo onde ocorre a “reunião” do vírus. A libertação dos viriões ocorre por lise celular (Figura 2) (Bastien et al., 2007).



**Figura 2:** Figura representativa da replicação da família *Parvoviridae*. Adaptado de: [www.microbiologybytes.com](http://www.microbiologybytes.com)

## 5.2 Organização genômica do HBoV

A análise genômica do HBoV revelou que este é um vírus de DNA, sem envólucro e tal como todos os membros da sub-família *Parvovirinae*, possui duas principais ORF, do inglês Open Reading Frames, que codificam respectivamente a proteína não-estrutural (NS1) e as duas proteínas da cápside (VP1 e VP2). Contudo, tal como o bocavirus bovino e canino, o HBoV tem, também, uma terceira ORF. No bocavirus bovino e canino, esta ORF codifica uma proteína não-estrutural de função desconhecida, de nome NP-1, com cerca de 47% aminoácidos homólogos com o HBoV (Figura 3).



**Figura 3:** Mapa do genoma do HBoV. (A) Mapa esquemático do isolado ST1 do HBoV com as 3 ORF (setas): NS1, 1920 nt (nucleotídeos 183-2102), 639 aa; NP-1, 660 nt (nucleotídeo 2340-2999), 219 aa; e VP1/VP2, 2016 nt (nucleotídeos 2986-5001), 671 aa. (B) Mapa que mostra a localização dos 26 nucleotídeos que são diferentes entre os dois isolados do HBoV. As linhas horizontais representam a sequência do ST1, e cada linha vertical representa uma diferença de nucleotídeo ao ST2. Os asterisco marcam as 3 diferenças que resultam numa alteração de aminoácido previstos. ORF: Open Reading Frames. Adaptado de: Allander et al., 2005.

## 5.3 Epidemiologia

Desde a sua descoberta o HBoV tem sido identificado em muitos países, nomeadamente, Alemanha (Weissbrich et al., 2006); Japão (Ma et al., 2006); França (Foulongne et al., 2007); Canadá (Bastien et al., 2007); Austrália (Sloots et al., 2006);

Estados Unidos da América (Kesebir et al., 2006). Nos estudos já realizados em secreções respiratórias, de crianças, com infecção do tracto respiratório, a prevalência deste vírus pode ir de 1,5% a 19% (Chieochansin et al., 2007)). A discrepância que existe relativamente às diferentes taxas de infecção por HBoV, pode dever-se às diferenças geográficas dos doentes estudados, em alguns casos incluem exclusivamente crianças hospitalizadas, enquanto outros não, ou porque alguns autores focaram o seu estudo apenas nas infecções do tracto respiratório inferior. As diferenças observadas na incidência da infecção por HBoV podem estar relacionadas não só com os critérios de selecção da amostra, mas também, com as diferenças a nível da sensibilidade dos métodos utilizados na colheita da amostra e no método de identificação do vírus (Pozo et al., 2007).

Alguns autores têm observado que a infecção por HBoV está associada a sintomas de doença respiratória aguda, no entanto, este vírus parece permanecer mais tempo após a infecção primária do que outro tipo de vírus respiratório (Allander, 2007).

Pozo e seus colaboradores detectaram DNA do HBoV em amostras de urina, de crianças hospitalizadas, as quais tinham já resultados positivos de infecção por HBoV em amostras respiratórias. Estas crianças não apresentavam problemas digestivos, diarreia ou dores abdominais. Os autores defendem que a presença de ADN do HBoV, na urina, pode meramente reflectir um modo de excreção do vírus pelo sistema digestivo e urinário à semelhança do que ocorre com outros vírus como o AD, mas, também, pode sugerir outras manifestações da doença associada ao HBoV, que pode não se limitar ao tracto respiratório (Pozo et al., 2007).

A confirmação da relação causa/efeito entre o vírus e os sintomas observados é importante, no entanto, torna-se bastante difícil, sendo necessário realizar novos estudos (Allander et al., 2005). Assim, provar a relevância clínica deste vírus tem-se tornado um desafio, devido à dificuldade de aplicação dos postulados de Koch. Segundo estes:

- A presença do agente deve ser sempre comprovada, em todos os indivíduos que sofram da doença em questão, e a partir daí ser isolada em cultura;
- O agente não poderá ser encontrado em casos de outras doenças;
- Uma vez isolado o agente deve ser capaz de reproduzir a doença em questão após inoculação em animais;
- O mesmo agente deve poder ser recuperado desses animais experimentalmente infectados e de novo isolado em cultura pura.

Os Postulados clássicos de Koch não podem ser aplicados ao HBoV pelo facto de ainda não ser possível o estudo *in vitro*, isolado em cultura e de não se ter um modelo animal adequado (Allander et al., 2005).

A dificuldade no estabelecimento causa/efeito baseia-se também nas várias opções de transmissão entre o organismo hospedeiro. Muitos vírus associados a sintomas não respiratórios podem, no entanto, ser transmitidos através do tracto respiratório e por isso ser lá detectados, como exemplo o vírus do herpes e o parvovírus B19 (Allander et al., 2005). O tracto respiratório humano por estar em contacto directo e exposto aos microrganismos do ar, o local onde se encontram infecções com bastante frequência. Assim, constitui uma boa “fonte” de vírus desconhecidos e um bom ponto de partida para explorar a flora viral humana. Além disso, a elevada taxa de infecções mistas de Bocavírus e outros vírus responsáveis por infecção respiratória, como o VSR, tem posto em causa o estabelecimento de uma relação causa/efeito entre o Bocavírus e as infecções respiratórias.

#### **5.4 Sintomatologia**

Os sintomas clínicos associados à infecção por HBoV incluem: febre (Simon, 2007), tosse (Arnold et al., 2006), arrepios, garganta inflamada (Simon, 2007), dor de cabeça, náusea, mialgia, dispneia, sinusite, bronquiolite, pneumonia e vômitos (Bastien et al., 2007). Outros sintomas comuns incluem dificuldade em respirar, congestão nasal ou rinorreia, e menos comuns conjuntivites e erupções cutâneas (Arnol et al., 2006).

Os sintomas gastrointestinais estão presentes em cerca de 25% dos doentes (Arnold et al., 2006; Kesebir et al., 2006), indicando que o vírus poderá estender-se além do tracto respiratório (Kahn, 2007).

Arnold e seus colaboradores observaram que as infecções por HBoV, do tracto respiratório superior, em crianças, estavam relacionadas com complicações de infecções respiratórias virais, tais como, asma, otites e pneumonia (Arnold et al., 2006).

Num estudo realizado na Noruega, as infecções do tracto respiratório inferior foram diagnosticadas na presença de sinais de obstrução das vias aéreas inferiores (falta de ar) e/ou radiograma positivo (presença de infiltrados), e as infecções do tracto respiratório superior foram diagnosticadas na presença de rinites, faringites e/ou otites (Christensen et al., 2007).

A relativa importância do HBoV na doença respiratória de origem viral não é ainda totalmente conhecida, no entanto, tem sido associada à presença de doença tracto respiratório superior (24%), a bronquiolites (11 a 26%) e pneumonia (17 a 33%) (Arnold et al., 2006; Bastien et al., 2006; Ma et al., 2006).

Kesebir em 2006, verificou que ao incluir crianças assintomáticas obteve uma taxa de incidência de infecção por HBoV nula, fornecendo uma associação entre o vírus e a doença (Kesebir et al., 2006). No entanto, Terrosi verificou que este vírus pode ser identificado em crianças com e sem sintomas respiratórios (Terrosi. et al., 2007).

O risco de complicações clínicas do vírus ainda não é conhecido (Simon et al., 2006).

## **5.5 Transmissão**

O modo de transmissão do HBoV é desconhecido, não sendo possível determinar o modo de infecção em crianças (Kesebir et al., 2006). No entanto, sabe-se que constituem factores de risco para a infecção por HBoV factores como a prematuridade, doença congénita do coração e asma, sendo estes, factores semelhantes à infecção por VSR (Bastien et al., 2007).

## **5.6 Sazonalidade**

Vários estudos verificaram que a distribuição ao longo do ano, da infecção por HBoV, tem um pico mais elevado nos meses de Inverno (Novembro, Dezembro e Janeiro), com uma diminuição nos meses da Primavera e Verão (Pozo et al., 2007; Manning et al., 2006). Estabelecer a prevalência sazonal torna-se por vezes complicado, devido às diferenças no número de amostras que são colhidas nos meses de Inverno relativamente aos meses de Verão, coincidindo com as alterações na incidência de doenças respiratórias (Manning et al., 2006).

O Eritema Infeccioso (ou a Quinta Doença), causado pelo parvovirus B19 (o qual antes da descoberta do HBoV era o único parvovirus associado a doença em humanos), tem também uma distribuição sazonal, apesar do pico máximo se verificar entre a Primavera e Verão (Kesebir. et al., 2006).

## 5.7 Idade e Sexo

Tendo em conta a idade, o perfil da infecção por HBoV e por VRS é semelhante. As infecções estão quase na sua maioria confinadas a recém-nascidos e crianças. Existem associações consistentes tendo em conta a idade dos doentes, entre estudos do Reino Unido (Manning et al., 2006), Suécia (Allander et al., 2005) e Austrália (Sloots et al., 2006), que observaram infecção por HBoV em crianças com idade inferior a 2 anos.

Contudo, um estudo realizado no Canadá, o qual tem menores diferenças na prevalência da infecção por HBoV em diferentes grupos etários, observa 1% infecção em doentes com idade superior a 15 anos e 2,5% em doentes com idade inferior a 15 anos (Bastien et al., 2006).

No que diz respeito à distribuição por sexos, a infecção por HBoV ocorre na sua maioria em crianças do sexo masculino (Kaplan et al., 2006). Num estudo realizado no Canadá, em 58 amostras positivas de infecção por HBoV, o vírus foi detectado em 67% no sexo masculino versus 33% sexo feminino (Bastien et al., 2007; Pozo et al., 2007).

## 5.8 Co-infecções

As co-infecções do HBoV com outros vírus respiratórios são bastante frequentes.

Vicente e seus colaboradores, em Espanha, verificaram que num total de 40 amostras positivas por HBoV, 25 (62,5%) apresentavam co-infecção com outros vírus: VRS em 13, rinovírus em 3, influenza A em 3, coronavirus em 2, AD em 1, influenza B em 1, VSR e coronavirus em 1 e influenza A e rinovírus em 1 indivíduo (Vicente et al., 2007). Num outro estudo realizado na Tailândia, em indivíduos com pneumonia, 4,5% testados foram positivos para o HBoV e foi observada uma taxa de 83% de co-infecções com outros vírus, nomeadamente, rinovírus, VRS e parainfluenza (Fry et al., 2007).

A variabilidade da taxa de co-infecção pode estar relacionada com a sensibilidade dos métodos utilizados, para a detecção do vírus (Bastien et al., 2007).

## **5.9 Bocavírus Humano e gastroenterites**

As gastroenterites devem-se à inflamação do estômago e intestino. As de origem viral resultam em diarreias e vômitos, são contagiosas, e constituem um factor de risco para a desidratação. São muitos os vírus que podem causar gastroenterites, nomeadamente, os rotavirus, noronovirus e adenovírus.

A presença de sintomas gastrointestinais, em crianças com HBoV positivo em amostras respiratórias, levou alguns investigadores a colocarem a questão se o HBoV estaria unicamente associado ao tracto respiratório ou se por outro lado também estaria associado a gastroenterites (Albuquerque et al., 2007). Foi nesse âmbito que em Espanha se realizou o primeiro estudo em fezes humanas em doentes que apresentavam diarreia, sem outros agentes patogénicos intestinais. Obtiveram no grupo de doentes com gastroenterite 9,1% positivos e no grupo de doentes com infecção respiratória 7,7% positivos. A taxa de co-infecção foi de cerca de 62,5% em que 58,3% demonstraram co-infecção com outros patogénicos do tracto gastrointestinal, nomeadamente, com rotavírus, norovírus. Através deste estudo, pela frequência de detecção de HBoV nas fezes das crianças com gastroenterite e a ausência de outros patogénicos intestinais, o HBoV surge como um vírus entérico e respiratório, e a excreção fecal surge como um novo dado acerca do modo de transmissão do vírus. Até agora sabe-se que os anticorpos para HBoV maternos podem proteger a criança até aos cinco meses de idade, ainda que a infecção primária por HBoV possa ocorrer cedo na infância. De facto, os outros dois vírus do género bocavirus, canino e bovino, causam, também, doença entérica (Kesebir et al., 2006).

No entanto, são necessários mais estudos para estabelecer uma associação do HBoV com a gastroenterite (Vicente et al., 2007).

## ***6. Métodos de diagnóstico das infecções respiratórias***

Os vírus respiratórios podem provocar uma série de infecções respiratórias diferentes, da mesma forma que a cada infecção respiratória pode estar associada a qualquer um dos vírus respiratórios. Dada esta falta de especificidade, e apesar do conhecimento da epidemiologia dos vírus respiratórios, é virtualmente impossível fazer um diagnóstico etiológico da maioria das infecções, baseado apenas nos dados clínicos,

sendo necessário o recurso ao laboratório para o esclarecimento do agente etiológico da infecção (Kesson, 2007). Assim, podemos encontrar nos laboratórios vários métodos com diferentes aplicações, sendo da responsabilidade do laboratório a escolha do método mais adequado aos seus objectivos e possibilidades.

## **6.1 Cultura celular**

Um dos métodos tradicionalmente à disposição do laboratório para o diagnóstico de infecções respiratórias é a cultura celular convencional, sendo este o método originalmente usado para o diagnóstico de infecções por vírus respiratórios. A principal vantagem deste método é a capacidade de isolamento e identificação de uma larga variedade de vírus, nomeadamente, o VSR, o vírus PI, AD, enterovirus e rinovírus. A detecção de vírus através de cultura de células é realizada por microscopia electrónica e requer alguma perícia dos técnicos (Kesson, 2007). No entanto, nem todos os vírus conseguem ser isolados por cultura celular.

## **6.2 Imunofluorescência**

Uma vez que a cultura de vírus é difícil e os vírus não se conseguem ver ao microscópio óptico, fez com que fosse necessário procurar métodos alternativos para o diagnóstico das infecções virais. Um método utilizado nos laboratórios clínicos é o método de imunofluorescência, no qual a identificação dos vírus é feita usando anticorpos monoclonais específicos para as proteínas virais (Kesson, 2007).

A imunofluorescência pode usar-se para pesquisar a existência de antigénios em células ou tecidos. Pode ser directa ou indirecta. Na directa, adiciona-se à amostra a estudar uma solução de anticorpo fluoresceinado (ligado a uma substância fluorescente). Depois de incubar e lavar, observa-se ao microscópio de fluorescência, cuja fonte luminosa é a luz ultravioleta. A observação de fluorescência revela a presença do antigénio. Na imunofluorescência indirecta, adiciona-se primeiro um anticorpo específico para o antigénio a pesquisar, visualizando-se depois a reacção através da adição de uma anti-imunoglobulina fluoresceinada, seguida de incubação, lavagem e observação ao microscópio de fluorescência.

A detecção de antígenos tem a vantagem de fornecer resultados rápidos. Contudo, a sua falta de sensibilidade faz com que esteja muito dependente da qualidade da amostra. Assim, a integridade das amostras, nomeadamente o número de células presentes na amostra é crucial para o uso de imunofluorescência. Por este motivo, a pesquisa de vírus respiratórios, nomeadamente, vírus influenza, vírus parainfluenza e adenovírus por imunofluorescência é muito usado em laboratórios, especificamente em doentes pediátricos, nos quais é possível a obtenção de uma maior quantidade de células infectadas e por um período mais longo que nos adultos. Em amostras com poucas células ou com uma quantidade de vírus pequena, esta técnica só pode ser usada após multiplicação do vírus em cultura celular.

### **6.3 Testes rápidos imunoenzimáticos e imunocromatográficos**

Os testes imunoenzimáticos rápidos para vírus respiratórios, podem-se efectuar em cerca de 10 a 20 minutos, nos quais o sistema de teste é uma unidade contida num invólucro individual, que permite efectuar uma determinação isolada de anticorpo num único doente. Este invólucro contém uma membrana na qual os anticorpos víricos estão fixados. Depois da extracção ou filtração da amostra clínica do doente, esta derrama-se sobre a membrana, e o antígeno vírico na amostra é capturado pelos anticorpos ligados à membrana. Na fase seguinte, adicionam-se anticorpos marcados com enzima. Estes ligam-se aos antígenos víricos previamente fixados. Em seguida efectua-se uma lavagem com o objectivo da remoção dos anticorpos não fixados e adiciona-se uma solução de substrato; surge coloração na membrana se a amostra clínica contiver anticorpos.

Os testes imunoenzimáticos (ELISA) são bastante utilizados, na prática clínica, tendo em conta a sua sensibilidade, especificidade e possibilidade de automação, permitindo a análise de um grande número de amostras num intervalo de tempo reduzido.

### **6.4 Métodos serológicos**

Os métodos serológicos referem-se à pesquisa e identificação de anticorpos e/ou antígenos presentes no soro. A serologia reveste-se de grande utilidade se não houver

possibilidade de isolar o vírus em cultura ou se os métodos de detecção de antígenos ou outras tecnologias não estiverem disponíveis. No entanto, para a detecção de vírus não se tornam muito úteis na medida em que numa infecção por vírus a presença de anticorpos só consegue ser detectada numa fase mais tardia, o que iria atrasar o estabelecimento de um diagnóstico.

## 6.5 Métodos biologia molecular

Nos últimos anos, tem-se assistido ao aumento do interesse no estudo de agentes patogénicos respiratórios, bem como a uma crescente inovação e desenvolvimento de métodos de biologia molecular, mais sensíveis que os métodos tradicionais.

Para a confirmação/estabelecimento de um diagnóstico clínico, é cada vez mais comum na prática laboratorial o uso de técnicas de biologia molecular, nomeadamente a técnica de reacção em cadeia de polimerase, do inglês polymerase chain reaction (PCR). Esta permite amplificar sequências específicas de DNA. Para a sua realização são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo, um tampão salino contendo a polimerase, oligonucleótidos iniciadores, os quatro desoxinucleótidos constituintes do DNA e o cofactor  $Mg^{2+}$ . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem na desnaturação do DNA alvo pelo calor (tipicamente 94-96°C), de modo a separar as duas cadeias. Segue-se a associação dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao DNA alvo em cadeia simples. Para permitir essa associação, a mistura de reacção é arrefecida (normalmente a temperaturas entre 50 e 65°C; a temperatura a usar depende da % GC da sequência a amplificar) e extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase (72°C). O processo envolvendo estes três passos, pode ser repetido várias vezes (25 a 35 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de DNA pré-existente.

A nested-PCR é uma variante da PCR convencional, onde são usados dois pares de primers, o que permite aumentar a especificidade da técnica. O primeiro par amplifica uma sequência de DNA, tal como as sequências amplificadas noutra tipo de PCR. O segundo par de primers (*nested primers*) vai-se ligar ao primeiro produto de PCR, numa zona mais interna em relação ao local de ligação dos primers, produzindo um segundo fragmento mais pequeno e mais específico, diminuindo deste modo a

probabilidade de fragmentos inespecíficos serem amplificados. A nested-PCR tem maior possibilidade de contaminações.

Mais recentemente surgiu a PCR em tempo real (RT-PCR), esta técnica permite realizar uma constante detecção e monitorização dos produtos de amplificação, durante toda a corrida. O sistema é baseado na detecção e quantificação de um sinal fluorescente, sendo possível monitorizar as amplificações em tempo real, é mais específico, sensível e reproduzível. No entanto, torna-se mais caro do que a PCR convencional.

Os métodos de biologia molecular apresentam vantagens em relação a outros métodos, nomeadamente aos métodos culturais, que necessitam de manutenção da viabilidade dos microrganismos, dependem da velocidade de crescimento dos mesmos e são muito difíceis de usar em determinados vírus nomeadamente o metapneumovirus humano; aos métodos de detecção antigénica, que apresentam menor especificidade e aos métodos serológicos que dependem da resposta imunológica do hospedeiro; assim, os métodos de biologia molecular são mais rápidos, mais sensíveis e mais específicos.

Assim, e de forma resumida, as principais aplicações dos métodos de diagnóstico referidos aos diferentes vírus respiratórios são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3:** Aplicações dos métodos de diagnóstico de vírus respiratórios.

	<i>Influenza</i>	<i>Parainfluenza</i>	<i>Adenovirus</i>	<i>VSR</i>	<i>Metapneumovirus</i>
<b>Cultura</b>	<i>Investigação</i>				
<b>Imunofluorescência</b>	Diagnóstico de rotina em crianças				
<b>Imunocromatografia</b>	Urgência	Não se aplica	Urgência	Urgência	Não se aplica
<b>Métodos de Biologia Molecular</b>	Diagnóstico de rotina				
<b>Serologia</b>	Estudos epidemiológicos				

## 6.6 Métodos de diagnóstico do Bocavírus Humano

A descoberta do HBoV foi realizado por uma técnica de PCR convencional, com primers específicos e condições de amplificação apropriadas, em que o tamanho do produto esperado era de 354pb do gene NP1 (Allander et al., 2005).

Posteriormente, alguns autores implementaram uma técnica mais sensível e específica para a detecção do HBoV, a nested-PCR. Esta técnica é uma variante da PCR convencional com menor possibilidade de contaminações, em que são usados dois pares de primers, o que nos permite aumentar a especificidade do método de detecção (Pozo et al., 2007).

Até à data ainda não foram realizados estudos do HBoV em cultura, nem foram realizados testes serológicos.

### **6.7 Importância do estudo**

Desde a descoberta do HBoV, muitas são as questões que ainda permanecem sem resposta e sem conclusões científicas e clínicas.

Dada a falta de informação, nomeadamente acerca do tempo que o vírus permanece no organismo, da frequência de re-infecções, bem como, a falta de conclusões finais acerca do espectro de associação à doença, torna-se uma mais-valia um estudo em crianças assistidas no CHCB a fim de compreender melhor alguns destes aspectos.

## **II. Objectivos**

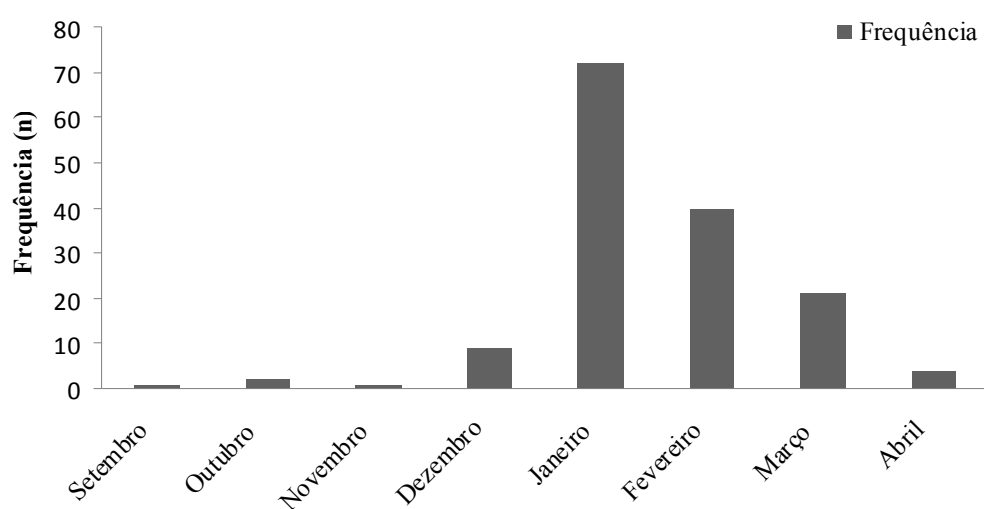
1. Montar uma técnica de biologia molecular para pesquisa de DNA do HBoV, em amostras respiratórias.
2. Determinar a incidência do HBoV em crianças com infecções respiratórias seguidas no Centro Hospitalar da Cova da Beira (CHCB), no período entre Outubro de 2007 e Maio de 2008.
3. Correlacionar a presença deste vírus com outros vírus respiratórios analisados no CHCB.
4. Correlacionar a presença do vírus com os quadros clínicos acompanhantes.

### III – Materiais e Métodos

#### 1. População estudada

Foram estudados 150 aspirados nasofaríngeos, de crianças, admitidas no serviço de urgência pediátrica do CHCB entre Outubro de 2007 e Maio de 2008 (Figura 4).

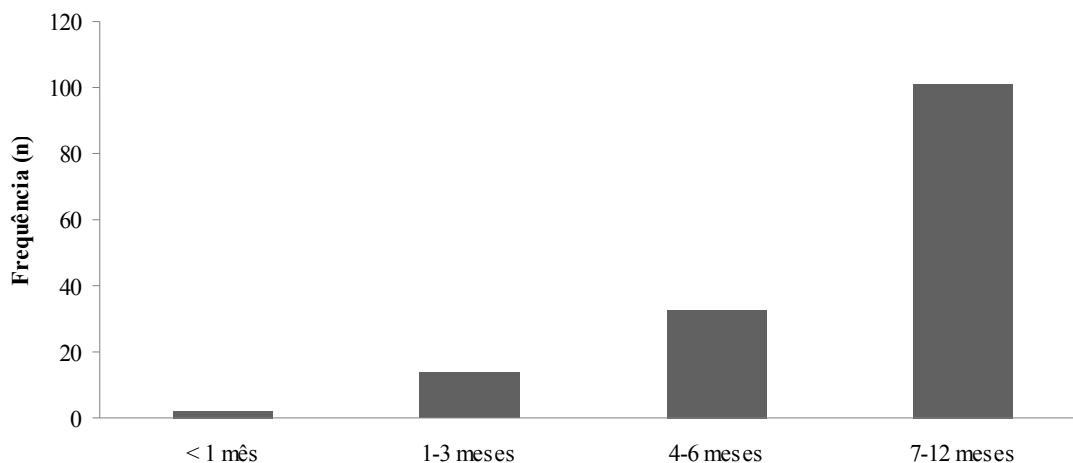
Destas 74 são provenientes de crianças do sexo feminino e 76 de crianças do sexo masculino, com idade inferior a 2 anos (Tabela 4 e Figura 5).



**Figura 4:** Número de amostras estudadas em cada mês.

**Tabela 4:** Número de crianças distribuídas pelas faixas etárias.

Idade (meses)	Frequência (n)
< 1 mês	2
1-3 meses	14
4-6 meses	33
7-12 meses	101



**Figura 5:** Representação gráfica do número de crianças por faixa etária.

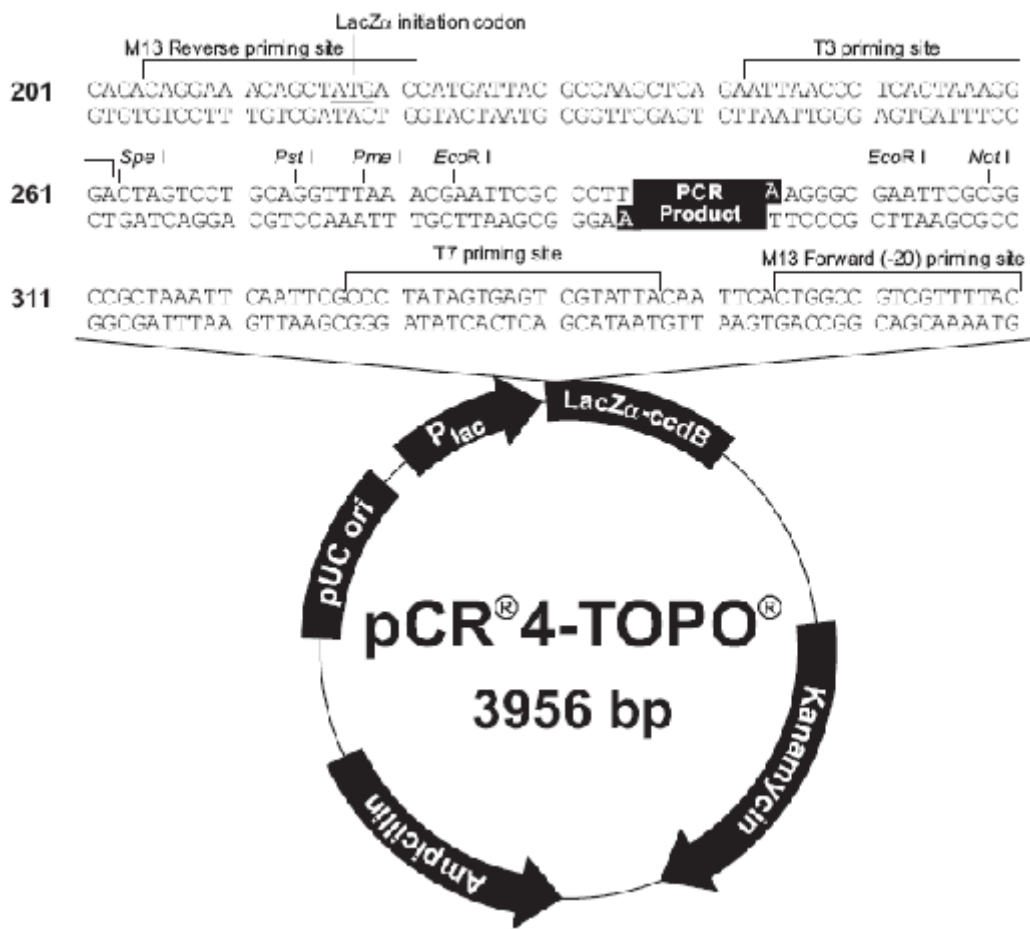
Após a análise do número de crianças por faixa etária, verificou-se que as crianças em estudo apresentavam idades compreendidas entre 16 dias e 12 meses, sendo na sua maioria de 12 meses. A média da idade calculada é igual a 5,68 meses.

## ***2. Preparação das amostras***

Os aspirados nasofaríngeos, foram colhidos na urgência, e enviados para o laboratório de virologia do CHCB, num contentor estéril, e conservadas a 4 °C, até o seu processamento. As secreções foram então, centrifugadas a 700g durante 5 minutos, eliminando-se de seguida o sobrenadante. As células foram lavadas com PBS e após a centrifugação foram de novo ressuspendidas em 1 ml de PBS. A suspensão de células obtida foi divididas em duas aliquotas, uma para pesquisa dos vírus respiratórios pesquisados por rotina no laboratório de virologia do CHCB (vírus influenza, parainfluenza, metapneumovirus, vírus sincical respiratório e adenovírus) e a outra para pesquisa do DNA do HBoV. Esta aliquota foi congelada a -20°C até ao seu processamento.

### 3. Transformação de bactérias competentes e selecção – Determinação da sensibilidade da técnica

A determinação da sensibilidade da técnica foi realizada usando diluições sucessivas de base 10 do plasmídeo comercial pCR-4TOPO (Invitrogen), no qual se encontra clonado o fragmento do HBov, do isolado ST2 (5182 pb de DNA), gentilmente cedido pelo Dr. Allander (Figura 6).



**Figura 6:** Plasmídeo comercial pCR-4TOPO (Invitrogen).

O plasmídeo foi inicialmente inserido em bactérias competentes de uma estirpe de *E.coli* designada DH5 $\alpha$ .

Para transformar as bactérias adicionou-se 53 ng do plasmídeo a 100  $\mu$ l de *E. coli* competentes e incubou-se em gelo durante 30 minutos (no mínimo). De seguida, efectuou-se um choque térmico a 42 °C, durante 2 minutos.

As células transformadas foram plaqueadas por espalhamento em placas de LB agar contendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml), e incubadas a 37 °C, durante 18 horas.

O processo de transformação e todos os passos de manuseamento foram efectuados de acordo com as normas de assepsia aconselhadas.

A transformação de bactérias competentes foi também realizada paralelamente por electroporação para verificar qual das duas técnicas originava melhores resultados.

Após se ter clonado nas bactérias competentes o plasmídeo, realizou-se a extracção e purificação dos plasmídeos.

Aquando da purificação dos plasmídeos torna-se necessário a separação de dois tipos de DNA (Plasmídico e cromossomal). De forma a recolher o plasmídeo procedeu-se à solubilização das membranas celulares, usando-se para tal detergentes, desta forma são libertados não só os dois tipos de DNA, bem como todas os outros organelos celulares, que vão actuar como contaminantes. O DNA cromossomal bem como a maioria das proteínas são precipitadas, pela adição ao lisado de acetato de potássio numa solução de ácido acético, toda esta mistura pode agora ser removida por centrifugação, dando origem a uma nova mistura mais simples.

A partir das bactérias transformadas e seleccionadas nas placas de LB Agar, obtiveram-se culturas em meio líquido (cerca de 2ml), a partir das quais se purificaram os plasmídeos. Para tal, utilizou-se o kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega<sup>®</sup>), cuja metodologia básica se explicou anteriormente, sendo os pormenores da técnica referidos de seguida.

As bactérias foram recolhidas para centrifugação 6000 rpm e ressuspensas com 250  $\mu$ l de solução de ressuspensão, adicionou-se 10  $\mu$ l de solução de protease alcalina e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente, seguidamente adicionou-se 350  $\mu$ l de solução de neutralização e centrifugou-se à velocidade máxima durante 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante, efectuaram-se duas séries de lavagens e eluiu-se o DNA em 100 $\mu$ l de água livre de nucleases. Os plasmídeos foram, então, armazenados a -20°C. De forma a determinar-se a concentração do DNA plasmídico extraído efectuaram-se leituras espectrofotométricas a 260 nm (Ultrospec 3000,

Pharmacia Biotech). Com esta análise é possível determinar a concentração do DNA, pois uma unidade óptica a 260 nm equivale a 38 µg/mL.

#### ***4. Pesquisa do DNA do HBoV***

##### **4.1 Extração e purificação do DNA**

O DNA de cada amostra foi extraído através do Kit Jetquick<sup>®</sup> (Alfagene<sup>®</sup>), segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, para cada amostra pipetou-se inicialmente um volume de 20 µL de protease, 200 µL de amostra e 200 µL do tampão K1 (tampão contendo uma solução detergente), para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Agitou-se o tubo e incubou-se durante 10 minutos, a 58 °C. Seguidamente adicionou-se 200 µL de etanol absoluto e agitou-se no vórtex. Transferiu-se a mistura para as micro-colunas e centrifugou-se durante 1 minuto a 10000g. Rejeitou-se o conteúdo do tubo, adicionou-se 500 µL do tampão KX (primeiro tampão de lavagem) e centrifugou-se, novamente, a 1 minuto a 10000g. Rejeitou-se o conteúdo do tubo que passou através da coluna, e adicionou-se 500 µL do tampão K2 (segundo tampão de lavagem). Centrifugou-se, novamente, segundo as mesmas condições anteriormente utilizadas. O conteúdo do tubo foi rejeitado, e cada coluna foi centrifugada durante 1 minuto à velocidade máxima para remover todo o tampão de lavagem que contém etanol que é um inibidor da Taq DNA polimerase. Seguidamente, adicionou-se 50 µL de tampão Tris-HCl (tampão de eluição) e centrifugou-se a 10000g, durante 2 minutos.

##### **4.2 Detecção do HBoV por nested-PCR**

A pesquisa do DNA do HBoV, foi feita por uma técnica de nested-PCR descrita por Manning et al, 2006, sendo a região a amplificar pertencente ao gene NP-1.

As sequências dos primers usados estão descritas nas tabelas 5 e 6.

**Tabela 5:** Sequência dos primers desenhados para a 1ª PCR.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
<b>“forward” hBoV1</b>	5'-ccagcaagtctctccaaactcacctgc-3'
<b>“reverse” hBoV2</b>	5'-ggagcttcaggattggaagctctgtg-3'

**Tabela 6:** Sequência dos primers desenhados para a 2ª PCR.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
<b>“forward” 188F</b>	5'-gagctctgtaagtactcttac-3'
<b>“reverse” 542R</b>	5'-ctctgtgtgactgaatacag-3'

Para a mistura da PCR foi utilizado o kit puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Bioscience). O kit possui esferas onde os componentes de reacção, nucleótidos, taq Polimerase, tampão de reacção e estabilizadores de temperatura, se encontram liofilizados. Quando a esfera é reconstituída num volume final de 25 µL, a concentração de cada nucleótido é de 200 µM em 100 mM Tris-HCl (pH 9.0 à temperatura ambiente), a concentração de KCl e de MgCl<sub>2</sub> é de 50 mM e 1,5 mM, respectivamente.

Para a realização da primeira PCR, pipetou-se, para cada tubo de reacção, 20 pmol do primer hBoV1 e 20 pmol do primer HBoV2, uma esfera e uma gota de óleo mineral. Seguidamente adicionou-se 5 µL de cada amostra e colocaram-se os tubos no termociclador de acordo com o programa descrito na tabela 7.

**Tabela 7:** Condições utilizadas no programa de PCR.

	<b>Desnaturação Inicial</b>	<b>35 ciclos</b>			<b>Extensão Final</b>
		<b>Desnaturação</b>	<b>Anneling</b>	<b>Extensão</b>	
<b>Temperatura (°C)</b>	94	94	54	72	72
<b>Tempo (minutos)</b>	10	1	1	1	5

Para a segunda PCR, num novo tubo com as esferas, adicionaram-se 20 pmol de cada um dos primers do segundo par de primers (188F e 542R), perfazendo um volume total de 24  $\mu$ L, seguidamente adicionou-se 1  $\mu$ L do produto de PCR obtido na primeira PCR no tubo da segunda PCR. Colocaram-se os tubos no termociclador de acordo com o programa descrito na tabela 7

### **4.3 Controlo de qualidade**

Em cada grupo de amostras processadas, realizou-se também a amplificação de uma amostra contendo os primers e a esfera com água livre de DNases e RNases, para se avaliar a presença de qualquer tipo de contaminação servindo, por isso, de controlo negativo.

O plasmídeo pCR-4TOPO contendo o clone do HBoV foi utilizado como controlo positivo.

A presença de inibidores foi testada em todas as amostras negativas. Para isso 4  $\mu$ L de amostra foram misturados com 1  $\mu$ L de plasmídeo na concentração X tendo esta mistura sido amplificada como se de uma amostra se tratasse. Cada amostra foi processada em duplicado.

#### **4.3.1 Prevenção de contaminações das amostras**

No trabalho laboratorial hospitalar, de pesquisa de ácidos nucleicos, de qualquer vírus, torna-se importante controlar e prevenir contaminações, que nos podem fornecer resultados falsos, levando a um diagnóstico e posterior tratamento errado.

Assim, durante todo o procedimento foram tomadas medidas para prevenir a contaminação das amostras, nomeadamente: as diferentes fases do processamento decorrem em locais fisicamente separados, no laboratório onde se efectuou o estudo, existem quatro áreas de trabalho distintas: a sala de preparação de reagentes, sala de preparação das amostras, sala de amplificação e sala de detecção. As luvas, pipetas, batas e outro material são de uso exclusivo na sala onde se encontram, e não foram usadas para outras actividades ou noutras áreas. Não houve transferência de qualquer elemento do local de detecção para zonas de pré-amplificação. Foram feitas aliquotas de

reagentes e evitou-se a formação de aerossóis e salpicos entre os tubos. O DNA foi o ultimo a ser transferido para o tubo de reacção.

De forma a garantir que todo o procedimento decorresse sem haver contaminações das amostras, em cada sessão de trabalho, usaram-se controlos positivos, controlos negativos e controlos de reagentes.

#### 4.4 Detecção dos produtos amplificados – Electroforese em gel de agarose

O gel de electroforese foi preparado de acordo com a tabela 8, de modo a obter uma dimensão de cerca de 11x 14 cm. Para tal, dissolveu-se num Erlenmeyer a agarose em TBE, por aquecimento numa placa, até ferver. Ajustou-se o volume com água desionizada, de modo a compensar a evaporação. Adicionou-se a brometo de etideo à agarose antes de solidificar, e verteu-se para o suporte com os pentes e deixou-se polimerizar. O suporte com o gel foi colocado na tina de electroforese, previamente cheia com tampão de electroforese TBE.

Adicionou-se 2 µL de tampão de carga do gel (12,5 mg de azul de bromofenol, 1,5 ml de glicerol e 5 ml de agua desionizada) a 10 µL da amostra e aplicou-se no gel. A voltagem foi de 100-150V, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Aplicou-se no gel marcador de peso molecular (REF ver no hospital), com o tampão de carga. O seu padrão de restrição é composto por fragmentos com peso molecular compreendidas entre X E X . A determinação do peso molecular das amostras foi feita por comparação directa com as distâncias de migração do marcador.

Após os 15 minutos o gel foi visualizado à luz ultra-violeta. Os fragmentos da primeira PCR 555pb e da segunda PCR foi 354 pb.

**Tabela 8:** Composição do gel de agarose.

##### Gel de agarose a 3%

TBE (mL)	50
Agarose (g)	1,5
Brometo de Etideo (µL) (C=10mg/dL)	10

### ***5. Detecção de outros vírus – VSR, MPvH,***

A determinação do VSR, AD, IA, IB, VPI 1, VPI 2, VPI 3 e do MPvH foi realizada no laboratório de virologia do CHCB.

O AD, VPI 1, VPI 2, VPI 3 e VSR, foram detectados por imunofluorescência directa usando antigénios recombinantes (Argene<sup>®</sup>).

O MPv e IA e IB foram detectados por RT-PCR em tempo real (técnicas “home-made”).

## **IV. Apresentação e discussão dos resultados**

### ***1. Infecção por HBoV***

#### **1.1 Sensibilidade do método**

A sensibilidade do método nested-PCR utilizado para a detecção do DNA do HBoV foi de 100 cópias por mL. Este valor foi calculado através de sucessivas diluições de base 10 de uma solução do plasmídeo com concentração inicial  $1 \times 10^{13}$  cópias por mL.

Este valor foi adequado para prosseguir o estudo, pois a literatura refere que as amostras positivas têm pelo menos  $10^5$  cópias por mL (Allander et al., 2005).

#### **1.2 Prevalência da infecção por HBoV**

A prevalência para cada vírus estudado é calculada pela razão entre o número de casos positivos e o número total de amostras estudadas.

Assim, neste trabalho, a prevalência da infecção por HBoV, foi calculada segundo o número de amostras positivas, que foi igual a 34, num total de 150 amostras. Assim sendo, a prevalência é de **22,7%** (intervalo de confiança para o nível de significância de 95%; 16% - 29,4%).

A prevalência do HBoV é altamente dependente da sensibilidade do método de PCR capaz de detectar múltiplos isolados. Para este estudo escolhemos o N terminal do gene NP-1 como sequência alvo. Pois esta região é idêntica nos dois isolados ST1 e ST2, sendo uma região altamente conservada do vírus.

A prevalência obtida (22,7%) é mais elevada, relativamente a outros estudos já realizados em secreções respiratórias, de crianças, com infecção do tracto respiratório, em que a prevalência deste vírus pode ir de 1,5% (Bastien et al., 2007) a 19% (Kaplan et al., 2006).

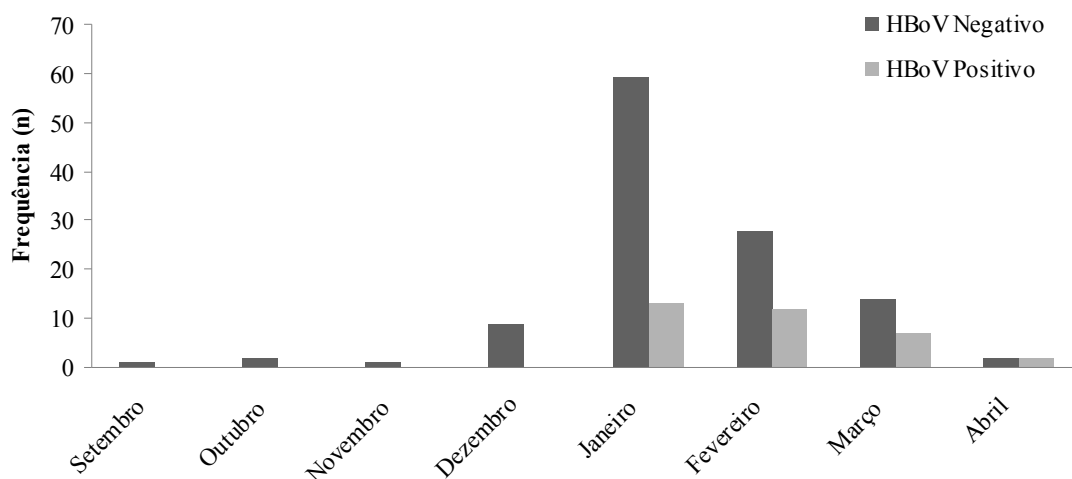
As diferenças observadas na incidência da infecção por HBoV podem estar relacionadas não só com os critérios de selecção da amostra, mas também, com as diferenças a nível dos métodos utilizados na colheita da amostra e na sensibilidade

método de identificação do vírus. Neste trabalho e ao contrário de outros, o DNA foi obtidos a partir de células recolhidas dos aspirados, facto que pode aumentar a sensibilidade.

Para o HBoV foram detectados 34 amostras positivas no total de 150 amostras, distribuídas ao longo dos meses do estudo (Tabela 9).

**Tabela 9:** Distribuição mensal do número de casos de infecção por HBoV.

	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
<b>Negativo</b>	1	2	1	9	59	28	14	2
<b>Positivo</b>	0	0	0	0	13	12	7	2



**Figura 7:** Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o HBoV.

Após a análise dos resultados obtidos observa-se que é durante os meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Abril que se verificam os casos positivos de infecção por HBoV.

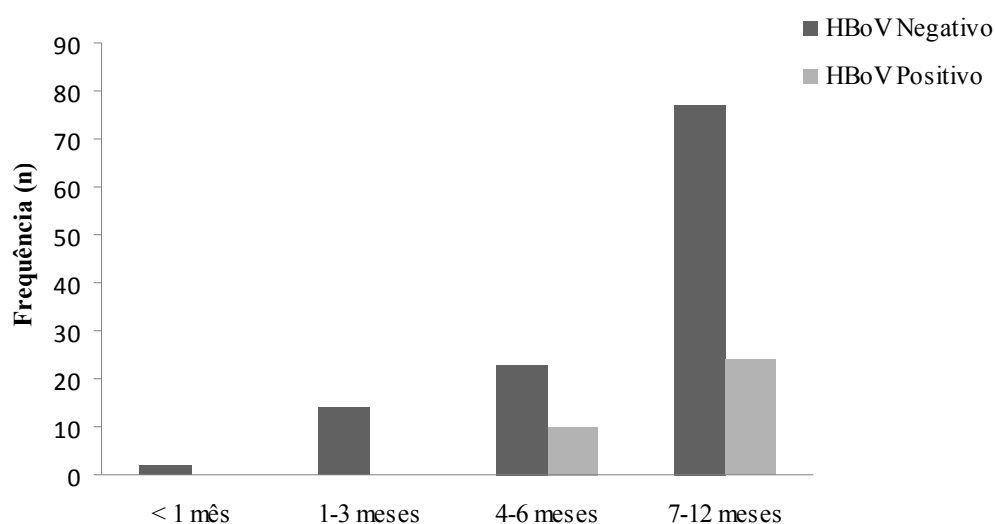
A ocorrência destes resultados, vai ao encontro a estudos anteriores, verificaram que a distribuição ao longo do ano, da infecção por HBoV, tem um pico mais elevado nos meses de Inverno (Novembro, Dezembro e Janeiro), com uma diminuição nos meses da Primavera (Pozo et al., 2007; Manning et al., 2006).

### 1.3 Idade e Sexo

A distribuição das amostras por idades encontra-se na tabela seguinte.

**Tabela 10:** Distribuição das amostras do HBoV por idades.

	< 1 mês	1-3 meses	4-6 meses	7-12 meses
<b>HBoV Negativo (%)</b>	2 (1,3%)	14 (9,3%)	23 (15,3%)	77 (51,4%)
<b>HBoV Positivo (%)</b>	0 (0%)	0 (0%)	10 (6,7%)	24 (16%)



**Figura 8:** Distribuição das amostras do HBoV por idades.

Dos resultados obtidos observa-se que foi na faixa etária dos 7 aos 12 meses que mais casos positivos de infecção por HBoV se verificaram, com 16%, seguidamente a faixa etária dos 4 aos 6 meses com 6,7% dos casos positivos. Nas faixas etárias inferior a 1 mês e de 1 a 3 meses não se observaram casos positivos.

A diferença dos casos positivos de infecção por HBoV, pode-se dever a uma distribuição não uniforme do número de amostras estudadas nas diferentes faixas etárias, pois a faixa etária dos 7 aos 12 meses é a mais representativa com 101 amostras, seguidamente da faixa etária dos 4 aos 6 meses com 33 amostras. Assim, para se estudar

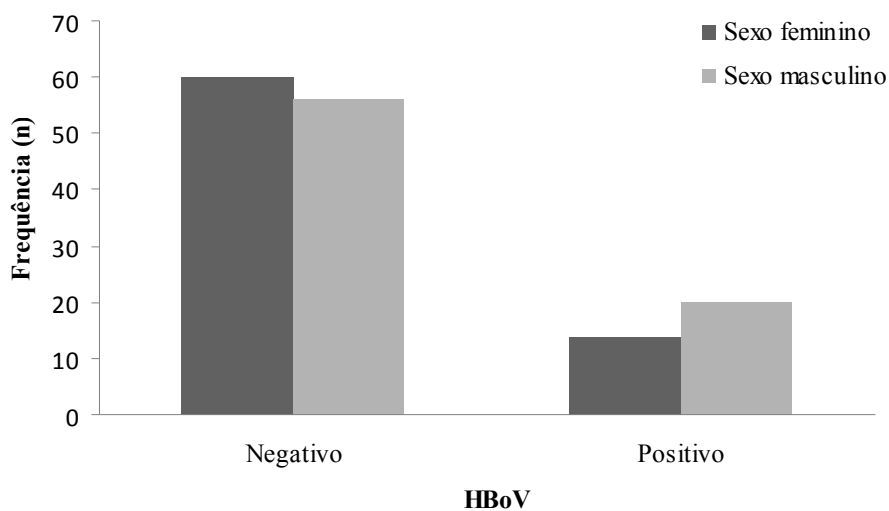
a distribuição da infecção por HBoV, por faixas etárias, seria importante ter uma distribuição mais homogênea do número de amostras.

Ao estudar apenas crianças com idade inferior a 1 ano, os dados obtidos vão de encontro aos que outros autores observaram, sendo este, o grupo onde se observam mais casos de infecção por HBoV (Sloots et al., 2006).

A distribuição do número de amostras por sexo encontra-se na tabela seguinte.

**Tabela 11:** Número de amostras por sexo para a infecção por HBoV.

	Negativo	Positivo	Total
Sexo feminino	60	14	74
Sexo masculino	56	20	76
Total	116	34	150



**Figura 19:** Distribuição das amostras por sexo para a infecção por HBoV.

Após a análise dos resultados obtidos, observa-se mais casos positivos de infecção por HBoV em indivíduos do sexo masculino (n=20; 59%), comparativamente

aos do sexo feminino (n=14; 41%). Foram processadas no total 76 amostras do sexo masculino (50,6%), e 74 amostras do sexo feminino (49,3%).

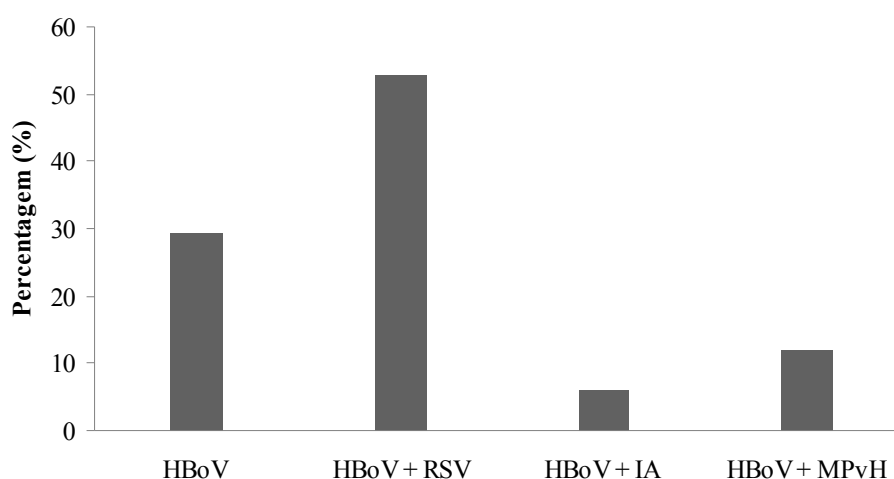
Os dados apresentados estão de acordo com resultados já publicados, que relativamente à distribuição por sexos, nos indicam que a infecção por HBoV ocorre na sua maioria em crianças do sexo masculino 67% versus 33% sexo feminino (Bastien et al., 2007; Pozo et al., 2007).

#### 1.4 Co-infecções

O número de casos de co-infecção para o HBoV e restantes vírus encontra-se discriminado na seguinte tabela.

**Tabela 12:** Casos de co-deteção entre o HBoV e os restantes vírus.

	Frequência (n)
<b>HBoV</b>	10
<b>HBoV + RSV</b>	18
<b>HBoV + IA</b>	2
<b>HBoV + MPvH</b>	4



**Figura 9:** Distribuição das co-deteções entre o HBoV e restantes vírus.

Após análise dos resultados obtidos relativamente às co-infecções do HBoV observa-se que se obtiveram 24 casos de co-infecção, que corresponde a um total de **70,6%**.

À co-infecção por MPvH correspondem **11,8%**, à co-infecção por VSR **52,9%** e **5,9%** de co-infecção por IA.

A literatura diz-nos que as co-infecções do HBoV com outros vírus respiratórios são bastante frequentes, cerca de 62,5% no total, sendo o VSR com maior número de co-infecções, seguidamente do IA (Vicente et al., 2007).

A variabilidade da taxa de co-infecção pode estar relacionada com a sensibilidade dos métodos utilizados, para a detecção do vírus (Bastien et al., 2007), mas existem dados que referem valores de co-infecção entre 18% (Allander et al., 2005) e 72% (Kaplan et al., 2006).

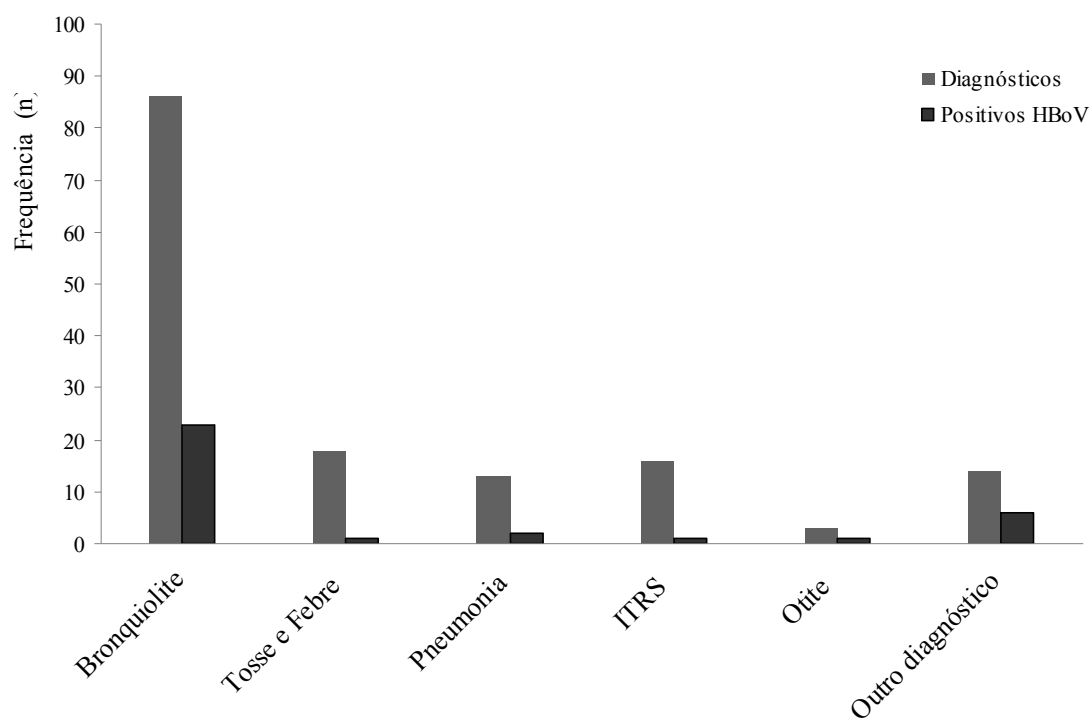
Elevadas taxas de co-infecção não estão em oposição com o papel do HBoV na doença respiratória, pois, num estudo que incluíram crianças assintomáticas obtiveram zero de incidência do HBoV, fornecendo uma associação entre o vírus e a doença (Pozo). A taxa de co-infecção elevada entre HBoV e RSV pode identificar o HBoV como um importante factor para a infecção por RSV.

### 1.5 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico estabelecido pelos clínicos, para os participantes do estudo, encontra-se na tabela 13.

**Tabela 13:** Diagnóstico estabelecido pelo clínico para cada criança incluída no estudo.

Diagnóstico estabelecido pelo clínico	Frequência (número)	Positivos para o HBoV (%)
Bronquiolite Aguda	86	23 (67,8%)
Tosse e Febre	18	1 (2,9%)
Pneumonia	13	2 (5,9%)
Infecções do tracto respiratório superior (ITRS)	16	1 (2,9%)
Otite	3	1 (2,9%)
Outro diagnóstico	14	6 (17,6%)



**Figura 10:** Frequência de cada diagnóstico estabelecido.

A partir dos resultados obtidos observa-se que, no geral, o diagnóstico clínico mais frequente foi o de bronquiolite, com 86 casos, seguidamente de Tosse e Febre com 18 casos e ITRS com 16 casos (Tabela 13).

Para os casos de infecção por HBoV, os diagnósticos mais frequentes foram: bronquiolite com 67,8%, seguido de pneumonia com 5,9%.

Os casos de infecção apenas pela presença do HBoV foram 10, dos quais 6 tinham como diagnóstico bronquiolite, 1 como broncopneumonia, 1 como otite, 1 como gastroenterite e 1 como vômitos.

Dados já publicados indicam que o diagnóstico clínico mais comum para doentes com HBoV positivo, com ou sem co-infecções incluem ITRS, bronquiolites e pneumonia, estando de acordo com os dados obtidos neste estudo. Este espectro clínico é concordante com outras ITRS agudas de causa viral, semelhante às infecções provocadas por RSV (Weigl et al., 2003) e MPvH (Wilkesmann et al., 2006). Assim, para a infecção por HBoV ainda não existe um diagnóstico diferenciável relativamente a outros vírus respiratórios.

Monteny e seus colaboradores, verificaram a presença de febre, por períodos superiores a 5 dias, em doentes infectados com HBoV (Monteny et al., 2007). Allander

observaram que 42% dos casos de infecção por HBoV tinha com diagnóstico clínico otite aguda (Allander et al., 2005).

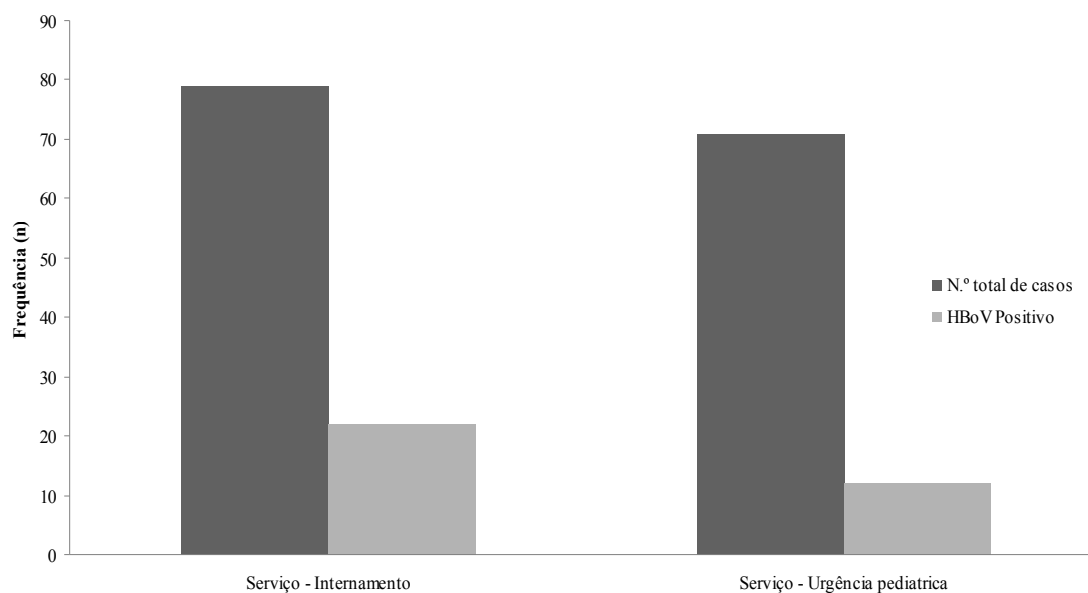
## 1.6 Serviço

### 1.6.1 Serviço – HBoV

A frequência de episódios internamento e de urgência, e casos positivos totais do HBoV encontra-se na seguinte tabela.

**Tabela 14:** Frequência de episódios internamento e de urgência, e casos positivos totais do HBoV.

Serviço	Frequência (n)	HBoV Positivos (n)
<b>Internamento</b>	79	22
<b>Urgência</b>	71	12



**Figura 11:** Frequência dos episódios de internamento e urgência e casos positivos totais do HBoV.

Pela análise dos resultados observa-se que 79 das crianças necessitaram de hospitalização, no serviço de pediatria, e 71 crianças apenas foram observadas na urgência pediátrica do CHCB. No serviço de internamento as crianças foram sujeitas a técnicas terapêuticas que incluíram aerossóis, drenagem postural, cinesiterapia respiratória e readaptação ao esforço individual.

O tempo de internamento variou entre 2 e 55 dias, sendo a média de 6,9 dias. Este valor é relativamente mais elevado tendo em conta dados já publicados que indicam valores médios de internamento de 5 dias (Volz et al., 2007).

Observa-se que existe um número superior de casos positivos de infecção por HBoV em crianças que seguiram para internamento, com 64,7% dos casos positivos, em comparação com os que apenas foram observados no serviço de urgência (35,3%).

O tempo de internamento, das crianças infectadas por HBoV variou entre 1 e 13 dias, sendo a média de 6,7 dias.

A frequência de episódios internamento e de urgência, e casos positivos apenas do HBoV, ou seja, sem as co-infecções, encontra-se na seguinte tabela.

**Tabela 15:** Frequência de episódios internamento e de urgência, e casos positivos apenas do HBoV.

<b>Serviço</b>	<b>Frequência (n)</b>	<b>HBoV Positivos (n)</b>
<b>Internamento</b>	79	5 (14,7%)
<b>Urgência</b>	71	5 (14,7%)

Observa-se para os casos de infecção apenas por HBoV uma distribuição uniforme dos episódios de internamento e de urgência, ambos com 5 casos.

O tempo de Internamento apenas para os casos de HBoV variou entre 3 a 13 dias, sendo a média de 7,6 dias.

### 1.6.2 Serviço - VSR

A frequência de episódios internamento e de urgência, e casos positivos apenas do VSR, ou seja, sem as co-infecções, encontra-se na seguinte tabela.

**Tabela 16:** Frequência de episódios internamento e de urgência, e casos positivos apenas do VSR.

<b>Serviço</b>	<b>Frequência (n)</b>	<b>VSR Positivos (n)</b>
<b>Internamento</b>	79	33 (42,9%)
<b>Urgência</b>	71	23 (29,9%)

Para os casos de infecção apenas por VSR, verifica-se que 42,9% seguiram para o serviço de internamento e 29,9% apenas foram observadas na urgência.

O tempo de Internamento apenas para os casos de VSR variou entre 2 a 10 dias, sendo a média de 6,2 dias.

## 2. Outros vírus respiratórios estudados

Para além do Bocavírus, nas amostras estudadas, foram ainda pesquisados os seguintes vírus respiratórios: (tabela 15)

**Tabela 17:** Vírus respiratórios analisados.

	<b>Positivos (n)</b>	<b>Negativos (n)</b>	<b>Prevalência (%)</b>
<b>VSR</b>	77	73	51
<b>AD</b>	---	150	0
<b>IA</b>	6	144	4
<b>IB</b>	---	150	0
<b>VPI 1</b>	---	150	0
<b>VPI 2</b>	---	150	0
<b>VPI 3</b>	---	150	0
<b>MPvH</b>	135	15	10,67

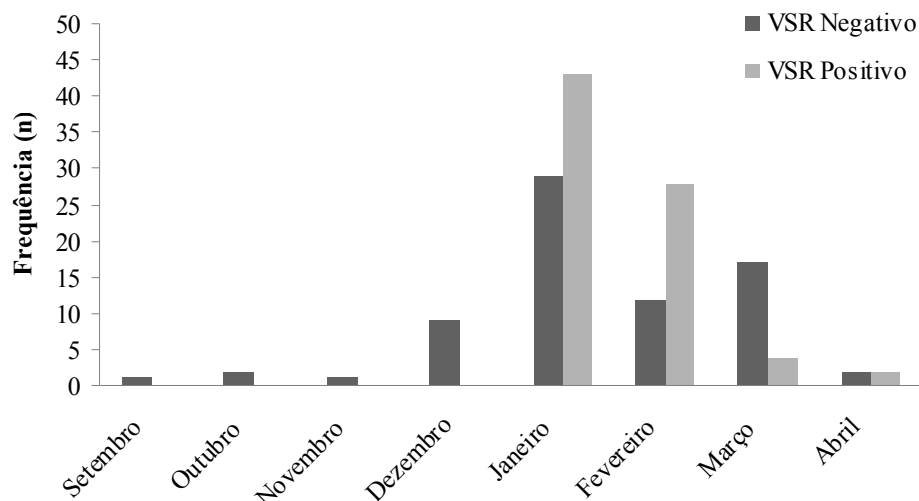
Através da análise da tabela anterior podemos concluir, que o VSR esteve presente em 77 das amostras respiratórias, constituindo o agente viral mais comum (51%), seguido pelo MPvH com 16 casos positivos (10,67%), e por último o IA, com apenas 6 casos positivos (4%). Para os restantes vírus, nomeadamente, AD, IB, VPI 1, VPI 2 e VPI 3, não se verificaram casos positivos.

O facto de o VSR ser o vírus respiratório mais detectado, neste estudo, vai de encontro com outros estudos, que afirmam que este é principal agente associado a infecções do tracto respiratório inferior (Kesebir et al., 2006).

### 2.1 VSR

**Tabela 18:** Distribuição mensal do número de casos de infecção por VSR.

	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
<b>Negativo</b>	1	2	1	9	29	12	17	2
<b>Positivo</b>	0	0	0	0	43	28	4	2



**Figura 12:** Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o VSR.

Após a análise dos resultados obtidos, ao longo dos meses nos quais o estudo decorreu, observa-se que é durante os meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Abril que se verificam mais casos positivos de infecção por VSR.

Estes resultados estão de acordo com a literatura, que nos diz que, a infecção por VSR ocorre com maior incidência durante o Inverno e início da Primavera (Kesson, 2007).

### 2.1.1 Prevalência do VSR

Sendo o número de casos positivos igual a 77 num total de 150 amostras, neste trabalho, a prevalência de infecção por VSR é de 51%.

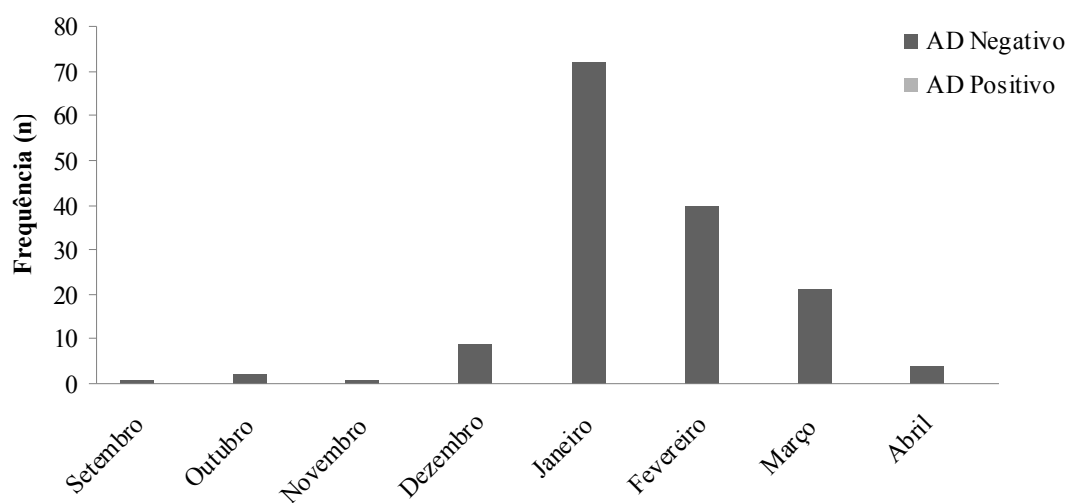
Este resultado é relativamente superior a outros dados já publicados, que indicam valores de prevalência igual 38% (Schmidt et al., 2004).

Uma das justificações para o valor obtido, pode estar relacionada pelo facto de neste estudo 86 das crianças tinha como diagnóstico bronquiolite.

## 2.2 AD

**Tabela 19:** Distribuição mensal do número de casos de infecção por AD.

	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
Negativo	1	2	1	9	72	40	21	4
Positivo	0	0	0	0	0	0	0	0



**Figura 13:** Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o AD.

Após a análise dos resultados obtidos observa-se que não se verificaram casos positivos para o AD.

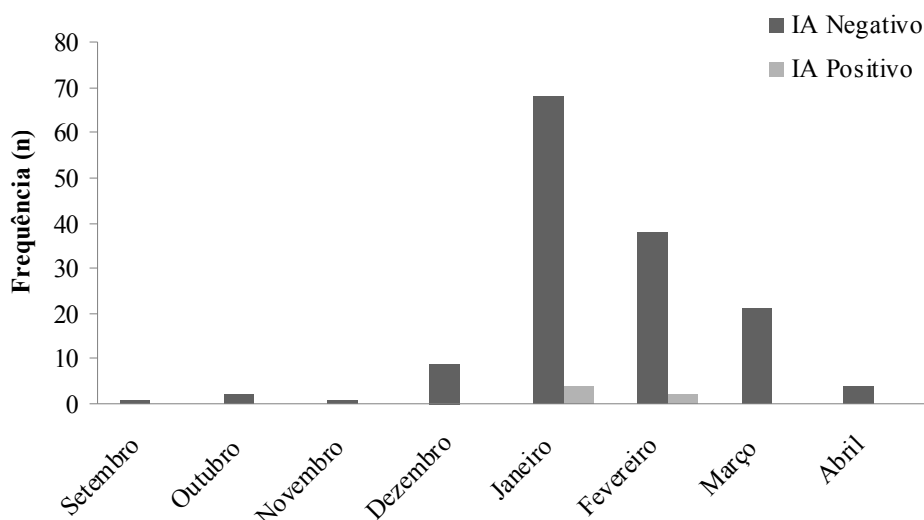
### 2.2.1 Prevalência do AD

Sendo o número de casos positivos igual a zero, obtém-se uma taxa de prevalência do AD igual a zero.

## 2.3 IA

**Tabela 20:** Distribuição mensal do número de casos de infecção por IA.

	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
Negativo	1	2	1	9	68	38	21	4
Positivo	0	0	0	0	4	2	0	0



**Figura 14:** Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o IA.

Após a análise dos resultados obtidos observa-se que é durante os meses de Janeiro e Fevereiro que se verificam os casos positivos de infecção por IA.

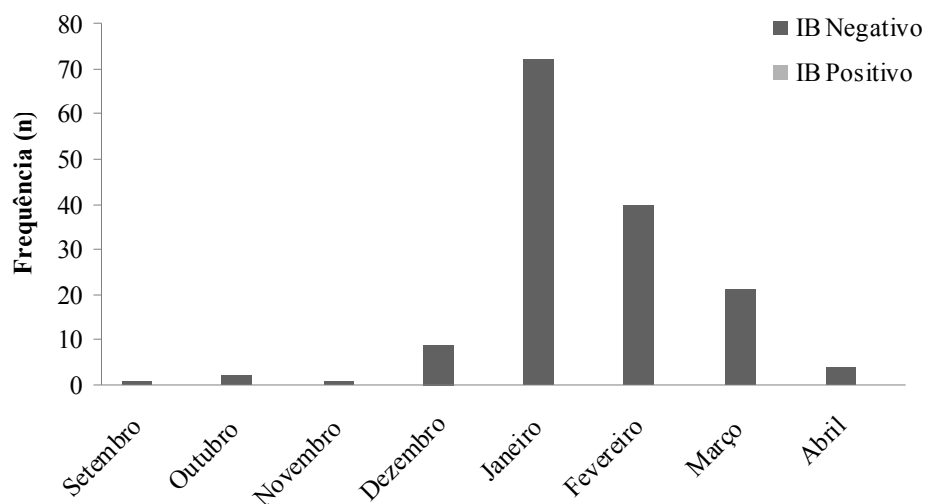
### 2.3.1 Prevalência do IA

Sendo o número de casos positivos igual a 6, num total de 150 amostras, a prevalência do IA é de **4%**.

## 2.4 IB

**Tabela 21:** Distribuição mensal do número de casos de infecção por IB.

	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
Negativo	1	2	1	9	72	40	21	4
Positivo	0	0	0	0	0	0	0	0



**Figura 15:** Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o IB.

Após a análise dos resultados obtidos observa-se que não se verificaram casos positivos para o IB.

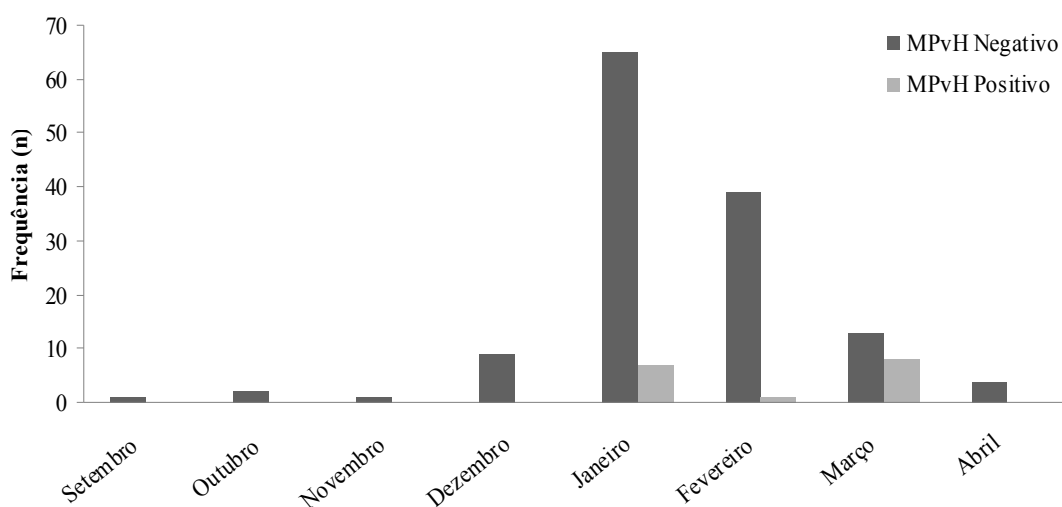
### 2.4.1 Prevalência do IB

Sendo o número de casos positivos igual a zero, obtém-se uma taxa de prevalência do IB igual a zero.

## 2.5 MPvH

**Tabela 22:** Distribuição mensal do número de casos de infecção por MPvH.

	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
<b>Negativo</b>	1	2	1	9	65	39	13	4
<b>Positivo</b>	0	0	0	0	7	1	8	0



**Figura 16:** Representação gráfica dos resultados obtidos mensalmente para o MPvH.

Após a análise dos resultados obtidos observa-se que é durante os meses de Janeiro, Fevereiro e Março que se verificam os casos positivos de infecção por MPvH.

Estes resultados estão de acordo com a literatura, que afirma que o espectro da infecção por MPvH é semelhante ao VRS, ou seja, ocorre com maior incidência durante o Inverno e início da Primavera (Maertzdorf et al., 2004).

### 2.5.1 Prevalência do MPvH

Sendo o número de casos positivos igual a 16, num total de 150 amostras, obtém-se uma taxa de prevalência do MPvH igual a **10,67%**.

Este resultado vai ao encontro ao descrito na literatura, que apresentam taxa de prevalência do **MPvH** igual a 11% (Magi et al., 2007).

### 2.6 VPI

**Tabela 23:** Distribuição mensal do número de casos de infecção por VPI1, VPI2 e VPI3.

	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
<b>Negativo</b>	1	2	1	9	72	40	21	4
<b>Positivo</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

Dos resultados obtidos observa-se que não existiram casos positivos para o VPI 1, VPI 2 e VPI 3.

#### 2.6.1 Prevalência do VPI

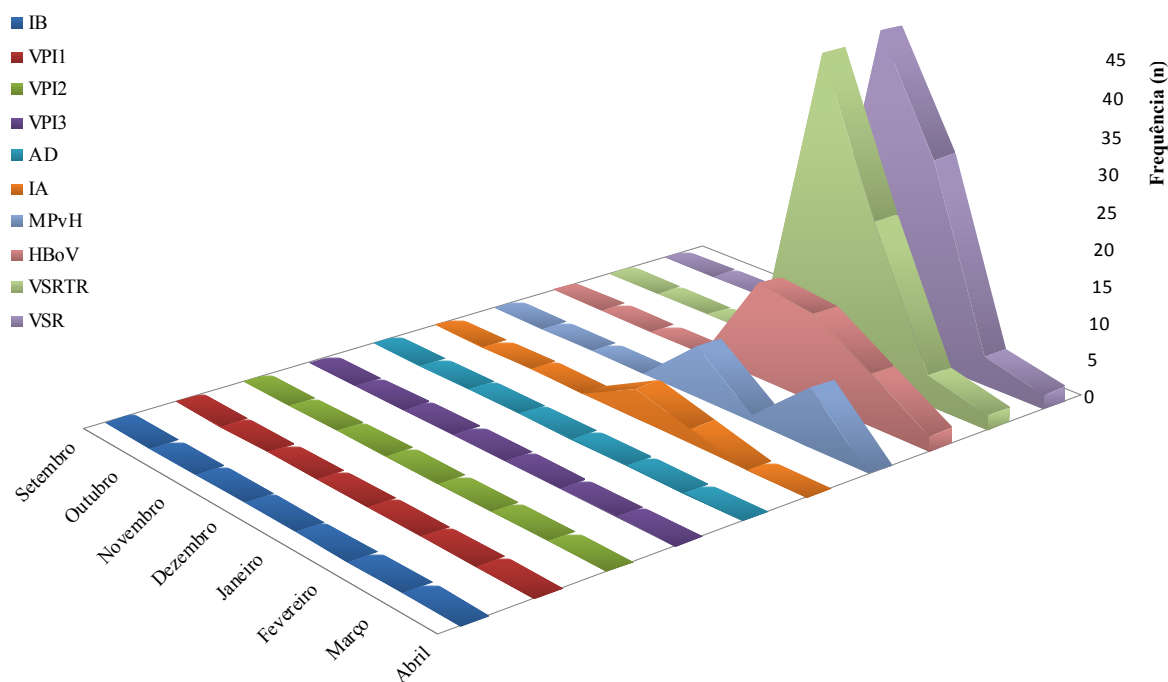
Sendo o número de casos positivos igual a zero, obtém-se uma taxa de prevalência do VPI1, VPI2 e VPI3 igual a zero.

### 3. Sazonalidade dos vírus

A distribuição mensal de cada vírus analisado encontra-se na seguinte tabela e gráfico.

**Tabela 24:** Distribuição mensal de cada vírus.

	<b>IB</b>	<b>VPI1</b>	<b>VPI2</b>	<b>VPI3</b>	<b>AD</b>	<b>IA</b>	<b>MPvH</b>	<b>HBoV</b>	<b>VSR</b>
Setembro	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Outubro	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Novembro	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dezembro	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Janeiro	0	0	0	0	0	4	7	13	43
Fevereiro	0	0	0	0	0	2	1	12	28
Março	0	0	0	0	0	0	8	7	4
Abril	0	0	0	0	0	0	0	2	2



**Figura 17:** Representação da distribuição mensal de cada vírus.

Os resultados para o HBoV, aproximam-se dos obtidos por Manning et al., 2006, nos quais o maior número de casos positivos se verificou nos meses de Janeiro e Fevereiro (Manning et al., 2006).

Podemos observar pelos resultados obtidos que o perfil de distribuição ao longo dos meses, em que se realizou o estudo, dos vírus VSR e HBoV é semelhante, verificando-se mais casos positivos nos meses Janeiro e Fevereiro. Observa-se que a distribuição entre os vírus MPvH e IA é também semelhante, com maior número de casos positivos nos meses Janeiro e Fevereiro.

Dos resultados obtidos, para o AD, verifica-se que não existem casos positivos, assim, nada se pode aferir da sazonalidade deste vírus. Os resultados já publicados, indicam-nos que o pico de infecção respiratória por AD ocorre no final do Inverno, Primavera e início do Verão, podendo, no entanto, ocorrer infecções durante todo o ano.

Não se observaram casos positivos para o VPI 1, VPI 2 e VPI 3. De acordo com a literatura as infecções pelo VPI ocorrem durante todo o ano, com maior frequência no Outono e Inverno (Kesson, 2007).

Estabelecer a prevalência sazonal torna-se por vezes complicado, devido às diferenças no número de amostras que são colhidas nos meses de Inverno relativamente aos meses de Verão, coincidindo com as alterações na incidência de doenças respiratórias (Manning et al., 2006).

## V. Conclusões

Após analisados e discutidos os resultados obtidos podemos tecer algumas conclusões.

Os objectivos propostos inicialmente foram cumpridos.

A sensibilidade do método nested-PCR utilizado para a detecção do DNA do HBoV foi de 100 cópias por mL. Este valor demonstrou ser adequado para o estudo, pois a literatura refere que as amostras positivas têm pelo menos  $10^5$  cópias por mL (Allander et al., 2005).

A prevalência do HBoV foi de 22,7%. Este valor é relativamente superior ao descrito na literatura, que pode ir de 1,5% a 19% (Chieochansin et al., 2007).

No que diz respeito à distribuição da infecção do HBoV por sexo, verificaram-se mais casos positivos em indivíduos do sexo masculino (n=20; 59%), comparativamente aos do sexo feminino (n=14; 41%).

Relativamente à idade, observou-se que a faixa etária dos 7 aos 12 meses apresentou mais casos positivos de infecção por HBoV (n=24), seguidamente a faixa etária dos 4 aos 6 meses com 10 casos positivos. Não se observaram casos positivos em idades iguais ou inferiores a 3 meses.

Tendo em conta a sazonalidade do HBoV verificou-se que os casos positivos se distribuíram pelos meses de Janeiro, Fevereiro, Março e Abril.

Para os casos de infecção por HBoV, os diagnósticos mais frequentes foram o de bronquiolite com 67,8% e de pneumonia com 5,9%.

Nos casos de infecção apenas pela presença do HBoV o diagnóstico mais frequente foi bronquiolite.

Observou-se para os casos de infecção apenas por HBoV houve uma distribuição uniforme dos episódios de internamento e de urgência, ambos com 5 casos. Assim, a presença do HBoV não implicou directamente o aumento do número de internamentos.

Da análise dos restantes vírus, verificou-se que o VSR esteve presente em 77 das amostras respiratórias, constituindo o agente viral mais comum, seguidamente o MPvH em 16 casos positivos, e por último o IA, com apenas 6 casos positivos. Para outros vírus estudados, nomeadamente, AD, IB, VPI 1, VPI 2 e VPI 3, não se verificaram casos positivos.

A prevalência de infecção por VSR foi de 51%; do IA de 4% e do MPvH igual a 10,67%. Os restantes vírus, AD, IB, VPI 1, VPI 2, VPI 3, obteve-se uma taxa de infecção igual a zero.

Os resultados estão de acordo com dados já publicados, que afirmam que o VSR é principal agente associado a infecções do tracto respiratório inferior (Kesebir et al., 2006).

O perfil de distribuição ao longo dos meses, em que se realizou o estudo, dos vírus VSR e HBoV demonstrou ser semelhante, verificando-se mais casos positivos nos meses Janeiro e Fevereiro. A distribuição dos vírus MPvH e IA foi também semelhante, com maior número de casos positivos nos meses Janeiro e Fevereiro.

## **VI. Perspectivas Futuras**

Confirmar a elevada prevalência para o HBoV, ou seja, verificar se a presença do HBoV é responsável pelos sintomas apresentados e diagnóstico estabelecido, ou se por outro lado, aparece como resultado complementar de um resultado positivo para outros vírus do tracto respiratório. Pois os sintomas apresentados pela infecção do HBoV estão também presentes na infecção de outros vírus do tracto respiratório.

No futuro, seria importante fazer a detecção de DNA do HBoV em amostras de urina. Segundo autores, a presença de ADN do HBoV, na urina, pode meramente reflectir um modo de excreção do vírus pelo sistema digestivo e urinário, mas, também, pode sugerir outras manifestações da doença associada ao HBoV, que pode não se limitar ao tracto respiratório (Pozo et al., 2007).

Fazer a colheita de amostras fecais, seria igualmente útil, pois, tal como os outros dois vírus do género bocavirus, canino e bovino, causam, também, doença entérica, e uma vez que um estudo realizado por Vicente e seus colaboradores, obtiveram no grupo de doentes com gastroenterite 9,1% positivos para o HBoV (Vicente et al., 2007).

Alargar o estudo a outros hospitais da região e fazer uma comparação entre resultados.

## VII. Referências Bibliográficas

Albuquerque, M., Rocha, L., Benati, F., Soares, C., Maranhão, A., Ramírez, M., Erdman, D., Santos, N., Human Bocavirus Infection in Children with Gastroenteritis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 2007; **13**:1756-1758.

Allander, T., Human Bocavirus. *Journal of Clinical Virology*, 2008; **4**:29-33.

Allander, T., Tammi, M., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *PNAS*, 2005; **102**:12891-12896.

Allander, T., Jartti, T., Gupta, S., Niesters, H., Lehtinen, P., Osterback, R., Vuorinen, T., Waris, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., Hoogen, B., Hyypia, T., Ruuskanen, O., Human Bocavirus and Wheezing in Children. *Clinical Infectious Diseases*, 2007; **44**: 904-910.

Arnold, J., Singh, K., Spector, S., Sawyer, M., Human Bocavirus: Prevalence and Clinical Spectrum at a Children's Hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 2006; **43**: 283-288.

Bastien, N., Chui, N., Robinson, J., Lee, B., Dust, K., Hart, L., Li, Y., Detection of Bocavirus in Canadian Children in a 1-Year Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007; **45**: 610-613.

Caballero, D., Pérez-Yarza, E., Bronquiolitis aguda: bases para un protocolo racional, *Anales Espanoles De Pediatria*, 2001; **55**: 355-364.

Chieochansin, T., Chutinimitkul, S., Payungporn, S., Hiranras, T., Samransamruajkit, R., Theamboolers, A., Poovorawan, Y., Complete coding sequences and phylogenetic analysis of Human Bocavirus (HBoV). *Virus Research*, 2007; **129**: 54-57.

Christensen. A., Nordbo. S., Krokstad. S., Rognlien. A., Dollner. H., Human Bocavirus involved in multiple viral airway infection. *Journal of Clinical Virology*, 2007; **41**: 34-37.

Foulongne, V., Segondy, M., Le Bocavirus: un nouveau parvovirus humain. *Virologie* 2007, **11**: 97-104.

Fry. A., Chittaganpitch. M., Peret. T., Fischer. J., Dowell. S., Anderson. L., Erdman. D., Olsen. S., Human Bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *Journal of Infectious Disease*, 2007; **195**: 1038-1045.

García-García. M.L., Rey. C., Sánchez. F. Álvarez M., Vergaz. A., Perez-Breña. P., Flecha. I., Infecciones por bocavirus humano en niños españoles: características clínicas y epidemiológicas de un virus respiratorio emergente. *Anales de Pediatría*, 2007; **76**(3): 212-9.

Kahn. J. S., Newly discovered respiratory viruses: significance and implications. *Current Opinion in Pharmacology*, 2007; **7**: 1-6.

Kaplan, N., Dove, W., Abu-Zeid, A., Shamoan, H., Abd-Eldayem, S., Hart, C., Human Bocavirus Infection among Children, Jordan. *Emerging Infectious Diseases*, 2006; **12**: 1418-1420.

Kesebir, D., Vazquez. M., Weibel. C., Shapiro. E.D., Ferguson. D., Landry. M.L., Kahn. J.S., Human Bocavirus Infection in Young Children in the United States: Molecular Epidemiological Profile and Clinical Characteristics of a Newly Emerging Respiratory Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 2006; **194**: 1276-82.

Kesson. A., Respiratory virus infections. *Paediatric respiratory reviews*, 2007; **8**: 240-248.

Lin. F., Zeng. A., Yanh. N., Lin. H., Yang. E., Wan. S., Pintel. D., Qiu. J., Quantification of human bocavirus in lower respiratory tract infection in China. *Infectious Agents and Cancer*, 2007; **2** (3).

Lu. X., Chittaganpitch. M., Olsen. S., Mackay. I., Sloots. T., Fry. A., Erdman. D., Real-Time Assays for Detection of Bocavirus in Human Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006; **44**:3231-35.

Ma. X., Endo. R., Ishiguro. N., Ebihara. T., Ishiko. H., Ariaga. T., Kikuta. H., Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006; **44**: 1132-1134.

Maertzdorf. J., Wang. C., Brown. J., Quinto. J., Chu. M., Graaf. M., Hoogen. B., Spaete. R., Osterhaus. A., Fouchier. R., Real-Time Transcriptase PCR Assay for Detection of Human Metapneumoviruses from All Known Genetic Lineages. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; **42**:981-986.

Manning. A., Russell. V., Eastick. K., Leadbetter. G., Hallam. N., Templeton. K., Simmonds. P., Epidemiological Profile and Clinical Associations of Human and Other Human Parvovirus. *Parvovirus and Respiratory Infection*, 2006;**194**:1283-90.

Maggi. F., Pifferi. E., Meschi. S., Rocchi. J., Bendinelli. M., Human bocavirus in Italian patients with respiratory disease. *Journal of Clinical Virology*, 2007; **38**:321-5.

Monteny. M., Niesters. H., Moll. H., Berger. M., Human bocavirus in febrile children, The Netherlands. *Emergency Infected Disease*, 2007; **13**: 180-182.

Mullis, et al. System for automated performance of the polymerase chain reaction. United States Patent 5,656,493.

Muñoz. C., El Bocavirus humano: un nuevo virus respiratorio. *Iatreia*, 2006; **19**: 71-71.

Murray, C.J.L., Lopez. A.D., Mthers. C.D. Stein. C. The global burden of disease 2000 project: aims, methods and data sources. Global programme on evidence for health policy. Geneva: World Health Organization. 2001.

Pozo, F., García-García. M., Calvo. C., Cuesta. I., Pérez-Breña. P., Casas. I., High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *Journal of Clinical Virology*, 2007; **40**:224-8.

Qu, X., Duan, Z., Qi, Z., Xie, Z., Gao, H., Liu, W., Huang, C., Peng, F., Zheng, L., Hou, Y., Human Bocavirus Infection, People's Republic of China. *Emerging Infectious Diseases*, 2007; **13**: 165-168.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 1988; **239**: 487-491.

Schildgen. O., Muller. A., Allander. T., Mackay. I., Volz. S., Kupfer. B., Simon. A., Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory Tract Infections?. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008; **21**:291- 304.

Schmidt. A., Johnson. T., Openshaw. P., Braciale. T., Falsey. A., Anderson. L., Wertz. G., Groothuis. J., Prince. G., Melero. J., Graham. B., Respiratory syncytial virus and pneumoviruses: a review of the international symposium-RSV 2003. *Virus Research*, 2004; **106**:1-13.

Simon. A., Groneck. P., Kuppfer. B., Kaiser. R., Plum. G., Tillmann. R. Muller. A., Schildgen. O., Detection of bocavirus DNA in nasopharyngeal aspirates of a child with bronchiolitis. *Journal of Infection*, 2007; **54**: 125-127.

Sloots, TP., McErlean. P., Speicher. Dj., Arden. KE., Nissen. MD., Mackay IM., Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *Journal of Clinical Virology*, 2006; **35**: 99-102.

Stockton, J., Ellis, J., Saville, M., Clewley, J., Zambon, C., Multiplex PCR for Typing and Subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; **36**:2990-2995.

Terrosi. C., Fabbiani. M., Cellesi. C., Cusi. M. G., Human Bocavirus detection in an atopic child affected by pneumonia associated with wheezing. *Journal of Clinical Virology*, 2007; **40**: 43-45.

Vicente. D., Cilla. G., Montes. M., Pérez-Yarza. E., Pérez-Trallero. E., Human Bocavirus, a Respiratory and Enteric Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 2007; **3**:636-637.

Völz. S. Schildgen. O., Klinkenberg. D., Ditt. V., Müller. A., Tillmann. R., Kupfer. B., Bode. U., Lentze. M., Simon. A., Prospective study of Human Bocavirus (HboV) infection in a pediatric university hospital in Germany 2005/2006. *Journal of Clinical Virology*, 2007; **40**:229-35.

Weigl,J., Puppe, W., Schmitt. H., Can respiratory syncytial virus etiology be diagnosed clinically? A hospital-based-control study in children under two years of age. *European Journal of Epidemiology*, 2003; **18**: 431-430.

Weissbrich, B., Neske, F., Schubert, J., Tollmann, F., Blath, K., Blessing, K., Wolfgang, H., Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *Infectious Disease*, 2006; **6**.

Wilkesmann. A., Scildgen. O., Eis-Hubinger. M., Geikowski. T., Glatzel. M., Lentze. M., Bode. U., Simon. A., Human metapneuvovirus infectious cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *European Journal of Epidemiology*, 2006; 165: 467-475.

## VIII. Anexos

Anexo 1: Dados para a avaliação do internamento realizado a cada participante do estudo.

Centro Hospitalar Cova da Beira  
Serviço de Pediatria  
Unidade de Neonatologia

### Avaliação para Internamento

<b>Sintomatologia</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>Observações</b>
Febre			
Dispneia			
Tosse			
Tiragem intercostal			
Adejo nasal			
Piera/sibilos			
Sat O <sub>2</sub>			
Rinorreia			
Rash cutâneo			
Diarreia			
Otite			
Exposição Fumo/Tabaco			
Teste rápido secreções			
Conjuntivite			
Outros			