

# Epidemiologia molecular de cepas de rinovírus humano circulantes na Cidade de Belém, Estado do Pará, Brasil

## Molecular epidemiology of rhinovirus strains circulating in Belém, Pará State, Brazil

Stéphany Teixeira Lima, Mauro Victor Brabo Vergueiro, Edivaldo Costa Souza Júnior, Deimy Lima Ferreira, Edna Maria Acunã de Souza, Wyller Alencar de Mello, Rita Catarina Medeiros Sousa, Mirleide Cordeiro dos Santos

Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Seção de Virologia, Ananindeua, Pará, Brasil

### RESUMO

O rinovírus humano (HRV) é o mais comum entre os agentes virais associados a infecções no trato respiratório superior, sendo reconhecido como o principal patógeno causador de resfriado comum. Com o objetivo de detectar e caracterizar cepas de HRV associadas a casos de síndrome respiratória aguda grave (SRAG) na Cidade de Belém, Estado do Pará, Brasil, foram analisadas 224 amostras de pacientes com SRAG atendidos em unidades hospitalares no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2014. A análise das amostras foi desenvolvida utilizando-se três etapas principais: a) extração do RNA viral (RNAv); b) amplificação do RNAv pelas técnicas de reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) em tempo real e RT-PCR convencional; e c) sequenciamento do genoma viral. Entre as 224 amostras analisadas, 59 (26,3%) foram positivas para HRV; dessas, em 22 foi possível realizar a caracterização das espécies de HRV por sequenciamento, sendo 13 (59%) classificadas como HRV-A, oito (36,3%) como HRV-C; uma foi classificada como enterovírus humano D68 (EV-D68). A distribuição por faixa etária evidenciou que os adultos foram os mais acometidos pelo HRV, representando 45,7% (n = 27) dos casos positivos. Notou-se ainda a grande concentração de casos positivos para o vírus no grupo de 0–4 anos de idade durante o período estudado (n = 23, 39%). Quanto à distribuição mensal do HRV em Belém, foi verificada a circulação predominantemente no primeiro semestre do ano, a qual costuma estar associada ao período de maior pluviosidade na região. Os resultados obtidos expressam uma taxa de infecção por HRV relevante, mostrando que esse vírus é um agente importante no que diz respeito às infecções respiratórias em Belém.

**Palavras-chave:** *Rhinovirus*; Síndrome Respiratória Aguda Grave; Variação Genética.

### ABSTRACT

Human rhinovirus (HRV) is the most common viral agent associated with infections of the upper respiratory tract and is the main causative agent of the common cold. This study aimed to detect and characterize HRV strains associated with severe acute respiratory syndrome (SARS) in Belém, Pará State, Brazil, by analyzing samples from 224 SARS patients admitted to hospitals between January 2013 and January 2014. Sample analysis was performed in three stages: (a) viral RNA isolation (vRNA); (b) amplification of vRNA using conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction; and (c) viral genome sequencing. Among the 224 analyzed samples, 59 (26.3%) were HRV-positive, of which 22 HRV species could be characterized through sequencing. Thirteen (59%) were classified as HRV-A and eight (36.3%) as HRV-C; one sample was classified as human enterovirus D68 (EV-D68). Distribution by age revealed that adults were the most affected by HRV, accounting for 45.7% (n = 27) of total positive cases. There was an increased number of HRV-positive cases in the 0–4-year-old group (n = 23, 39%) during the study period. Relating to monthly HRV distribution in Belém, circulation was predominant during the first semester, which is typically associated with increased rainfall. The results indicate a high HRV infection rate; thus indicating that the pathogen is an important agent of respiratory infections in Belém.

**Keywords:** *Rhinovirus*; Severe Acute Respiratory Syndrome; Genetic Variation.

### Correspondência / Correspondence:

Stéphany Teixeira Lima

Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia

Rodovia BR-316 km 7, s/n. Bairro: Levilândia – CEP: 67030-000 – Ananindeua, Pará, Brasil – Tel.: +55 (91) 3214-2024 / 3214-2012

E-mail: stephanylima21@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

O rinovírus humano (HRV) é o mais comum entre os agentes virais associados a infecções no trato respiratório superior, sendo reconhecido como o principal patógeno causador de resfriado comum. Essas infecções estão entre as principais causas de morbidade em crianças menores de 5 anos de idade e apresentam considerável impacto econômico, em virtude do elevado número de consultas médicas e absenteísmo laboral atrelados a elas<sup>1,2</sup>.

Integrante da família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*, o HRV está dividido em três espécies, HRV-A, HRV-B e HRV-C. Com base nas características antigênicas e genéticas, hoje já são descritos mais de 100 sorotipos de HRV. A análise das sequências de nucleotídeos, principalmente das regiões codificadoras das proteínas VP1 e VP2/VP4, permitiu agrupar os sorotipos entre as três espécies, sendo que atualmente 80 sorotipos compõem a espécie HRV-A, 32 pertencem à espécie HRV-B e 55 à espécie HRV-C. A partícula viral mede de 25 a 30 nm de diâmetro e apresenta simetria icosaédrica. O capsídeo é formado por 60 cópias de cada uma das quatro proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4) e envolve o material genético, que é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva não segmentado (+ssRNA), com aproximadamente 7.200 pb, e possui uma única região de leitura aberta (*open reading frame*)<sup>3</sup>.

O desenvolvimento de métodos moleculares proporcionou a realização de estudos sobre a diversidade do HRV e, com isso, a caracterização das diferentes cepas que circulam no mundo. Tais investigações vêm ampliando o conhecimento sobre esse vírus, possibilitando a descrição de novas espécies e sorotipos, bem como a associação das diferentes espécies aos distintos quadros de infecção respiratória desencadeados por HRV<sup>4,5,6,7,8</sup>.

Este estudo objetivou realizar a epidemiologia molecular e a caracterização genética do HRV em amostras de pacientes hospitalizados com síndrome respiratória aguda grave (SRAG) na Cidade de Belém, Estado do Pará, Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população do estudo compreendeu 224 indivíduos, dos quais 130 (58%) eram do sexo feminino e 94 (42%) do masculino, em diferentes faixas etárias, com queixas sugestivas de infecção respiratória aguda, hospitalizados em unidades de saúde de Belém, no

período de janeiro de 2013 a janeiro de 2014, triados pela Rede de Vigilância da Gripe, cujo diagnóstico para o vírus influenza mostrou-se negativo.

### AMOSTRAS

A coleta do espécime clínico foi realizada em pacientes que apresentavam sinais e sintomas de infecção respiratória com até cinco dias de evolução. Tal coleta foi realizada mediante aspirado de nasofaringe, utilizando-se bomba a vácuo acoplada a um tubo coletor contendo meio de transporte (Hanks e gelatina a 0,5%) ou por swab combinado (narina/garganta), que foram colocados em tubos contendo meio de transporte e encaminhados sob refrigeração (4° C) ao Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Evandro Chagas, devidamente rotulados com nome do paciente e data de coleta.

### PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

#### Extração do RNA viral

O RNA viral (RNA<sub>v</sub>) foi extraído a partir do espécime clínico, utilizando-se o PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA), seguindo-se as orientações do fabricante, e posteriormente estocado a -70° C, quando não submetido de imediato à etapa de detecção.

#### Detecção de HRV por rRT-PCR

A detecção do genoma viral foi realizada através da reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa em tempo real (rRT-PCR); foram empregados o kit comercial AgPath-ID™ One Step RT-PCR Kit (Ambion, Life Technologies, Austin, EUA), sondas e oligonucleotídeos iniciadores específicos para HRV (Quadro 1), de acordo com o protocolo desenvolvido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC)<sup>9</sup>.

#### Amplificação dos genes VP4/VP2 e região 5' NCR por RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), em um único tubo, foi realizada utilizando-se AgPath-ID™ One Step RT-PCR Kit (Ambion, Life Technologies, Austin, EUA) e oligonucleotídeos iniciadores específicos (Quadro 2), que produzem um fragmento de 549 pb, que compreende os genes VP4 e VP2 e a parte hipervariável da região 5' NCR, como descrito por Savolainen et al<sup>4</sup>. Cada conjunto de amostras submetido à amplificação foi acompanhado de um controle negativo (água livre de DNase e RNase) e um positivo (RNA de HRV clonado em plasmídeo), os quais foram produzidos e cedidos pelo CDC<sup>4</sup>.

Iniciador	Sequência dos oligonucleotídeos 5'–3'	Tamanho do <i>amplicom</i>
HRV For	CPXGCCXGCGTGGC	207 pb
HRV Rev	GAAACACGGACACCCAAAGTA	
HRV Pro	FAM-TCCTCCGGCCCCCTGAATGYGG C-BHQ1	

X: base modificada (LNA – *locked nucleic acid* – ácido nucleico bloqueado); P: pirimidina derivada (base degenerada mimetizando uma mistura de bases C/T); FAM: 6-carboxifluoresceína; BHQ1: Black Hole Quencher®-1.

**Quadro 1** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação da região não codificadora (*noncoding region* – NCR) de HRV

Iniciador	Sequência dos oligonucleotídeos 5'-3'	Tamanho do amplicom
HRV F	GCATCIGGYARYTTCCACCACCANCC	549 pb
HRV R	GGGACCAACTACTTTGGGTGTCCGTGT	

I: inosina; Y: T, C; R: G, A; N: A, C, G, T.

**Quadro 2** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação da região NCR e genes VP4/VP2 dos HRV

Para amplificação, a mistura de reação foi inicialmente incubada a 45° C por 30 min e 94° C por 5 min, seguindo-se 40 ciclos de 94° C por 45 s, 61° C por 45 s e extensão a 72° C por 1 min. A etapa de extensão final foi feita a 72° C por 10 min. As etapas de RT-PCR foram realizadas em termociclador automático MasterCycler EP Gradient S (Eppendorf, Birkmann Instrument, Hamburgo, Alemanha).

### Eletrforese em gel de agarose

Ao término da amplificação, os produtos da RT-PCR foram analisados por meio de eletrforese horizontal em gel de agarose 1,5% corado por GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA5, EUA). Os produtos foram submetidos à migração no gel, junto com o marcador de peso molecular 200 lines SmartLadder (EUROGENTEC, San Diego, EUA), inicialmente por 5 min a 80 V, seguindo-se de 25 min a 110 V. A visualização dos amplicons, impregnados pelo corante, foi feita em transiluminador com luz UV e fotografado com o auxílio do sistema Vilber Loumart.

### Purificação e quantificação do produto da RT-PCR

Nas amostras em que foi observada a banda no tamanho esperado (549 pb), procedeu-se à purificação do produto amplificado. Para tal procedimento, foi utilizado o kit comercial QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Maryland, EUA), sendo seguidas as instruções do fabricante. Ao final do processo, o produto eluído foi quantificado, seguindo-se instruções do fabricante do marcador de peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Assim, a concentração de cada amostra foi determinada comparando-se a intensidade das bandas do marcador com a banda das amostras, sendo o resultado expresso em nanogramas.

### Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, Life Technologies, Carlsbad, EUA). Foram preparadas misturas de reação com volume final de 10 µL, composta por 2 µL de Big Dye®, 1 µL de tampão 5X Running Buffer, 5 µL de DNA (50 ng) e 0,5 µM de oligonucleotídeos específicos (Quadro 2). Essa mistura foi processada em termociclador automático (MasterCycler EP Gradient S, Eppendorf, Birkmann Instrument, Hamburgo, Alemanha), tendo sido executado um ciclo a 94° C por 2 min, seguido de 25 ciclos, cada um composto por 94° C por 45 s, 50° C por 30 s e 60° C por 4 min.

### Precipitação e eletrforese do produto da reação de sequenciamento

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram submetidas à precipitação com isopropanol e etanol, com a finalidade de se retirar o excesso de nucleotídeos marcados não incorporados na reação de sequenciamento. Foram adicionados 40 µL de isopropanol 65% ao produto da reação; incubou-se por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada centrifugação a 4.500 rpm durante 45 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 200 µL de etanol 70%; seguiu-se centrifugação a 4.500 rpm por 20 min. O sobrenadante foi desprezado. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi secado em termobloco a 60° C por 5 min e ressuspenso em 15 µL de formamida deionizada (Formamida Hi Di, Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, EUA). Após ressuspenso em formamida, as amostras foram submetidas à desnaturação por 95° C durante 5 min e, em seguida, colocadas em banho de gelo por 2 min. Posteriormente, foi realizada a eletrforese em sequenciador automático ABIPrism 3130 xl (Applied Biosystem, Foster City, EUA), baseada no método de terminação de cadeia por dideoxirribonucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes que, ao contato com raios laser, emitem fluorescência de diferentes comprimentos de ondas correspondentes a cada um dos quatro nucleotídeos que compõem basicamente a molécula de DNA (A, C, T, G) localizados na extremidade 3'<sup>10</sup>.

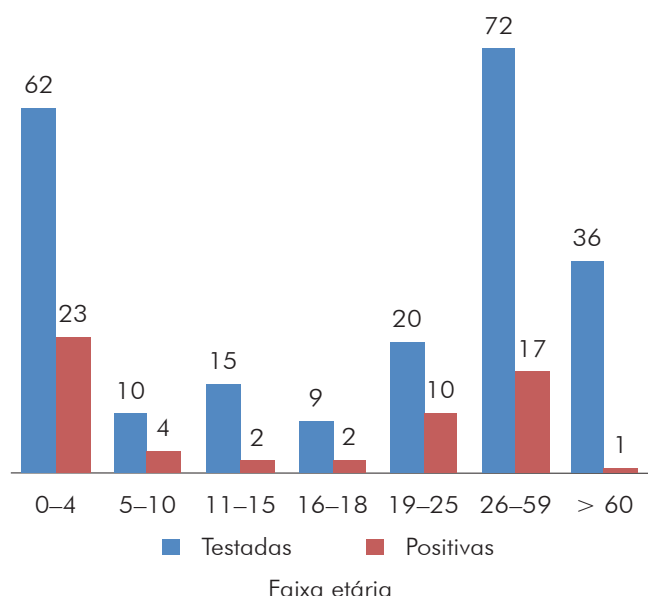
### Análise da sequência de nucleotídeos e inferências filogenéticas

As suítes de bioinformática Geneious v8.1.4 e UGENE v1.16 foram utilizadas para visualização, edição e alinhamento das sequências obtidas. Para o estudo filogenético, as sequências foram comparadas com as de outros rinovírus isolados e disponíveis no banco de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A construção das árvores filogenéticas foi realizada através do método de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*)<sup>11</sup>, usando o programa SeaView<sup>12</sup>. A análise de *bootstrap* com 1.000 réplicas foi usada para dar confiabilidade aos agrupamentos filogenéticos<sup>13</sup>.

### RESULTADOS

O presente estudo analisou 224 amostras por rRT-PCR, das quais 59 (26,3%) foram positivas para o HRV.

A distribuição por faixa etária evidencia que os adultos foram os mais acometidos pelo HRV, expressando 45,7% ( $n = 27$ ) dos casos positivos. Nota-se ainda a grande concentração de casos positivos para o vírus no grupo de 0–4 anos durante o período estudado ( $n = 23$ , 39%) (Figura 1).



**Figura 1** – Distribuição por faixa etária das amostras positivas para HRV, detectadas por rRT-PCR

Quanto à distribuição mensal dos casos positivos de HRV, os meses de maio e junho mostraram um maior pico de infecções no ano de 2013, com 20 e 25 casos positivos, respectivamente, seguido pelo mês de setembro, no qual foram observados seis casos (Figura 2).

Todas as 59 amostras positivas foram submetidas à RT-PCR e 34 (57,62%) mostraram bandas de interesse, tendo sido, em seguida, purificadas e quantificadas para realização da reação de sequenciamento para posterior análise.

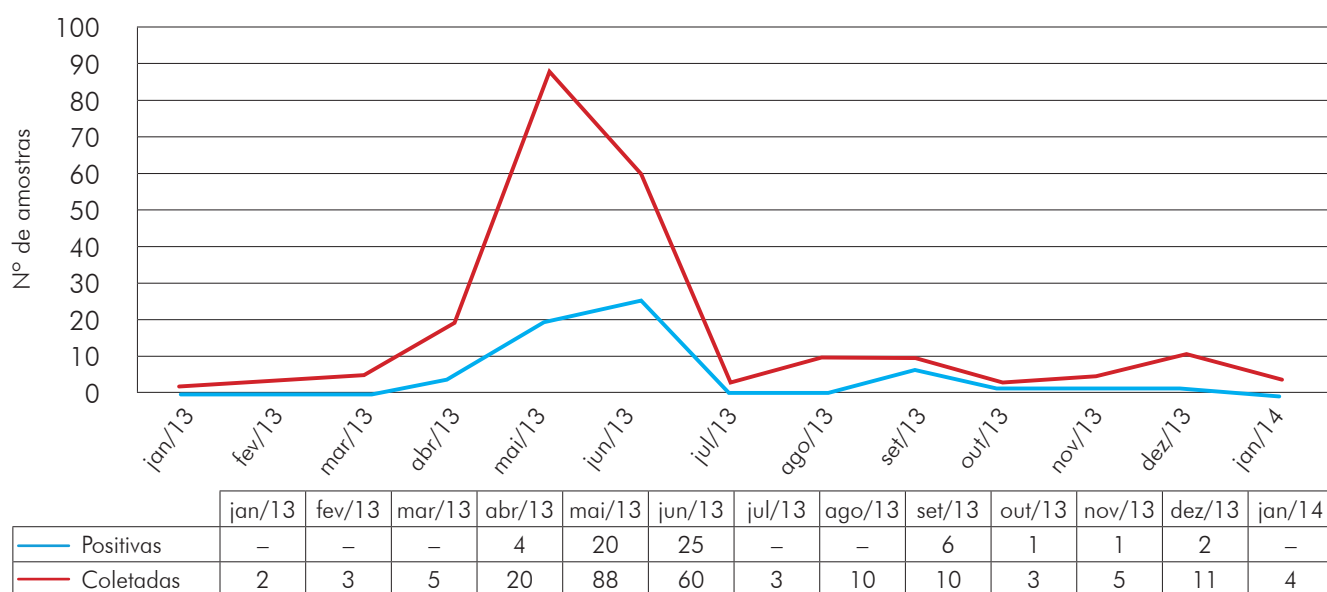
Entre as 34 amostras submetidas ao sequenciamento, em 22 foi possível realizar a identificação das espécies de HRV, sendo 13 (59%) classificadas como HRV-A, oito (36,3%) como HRV-C e uma como enterovírus humano D68 (EV-D68). Nenhuma amostra de HRV-B foi detectada. Entre as espécies de HRV-A e HRV-C, diferentes genótipos puderam ser identificados (Figura 3).

## DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a presença de HRV em amostras de pacientes hospitalizados com SRAG em Belém no período de 12 meses. Os resultados obtidos expressaram uma taxa de infecção por HRV relevante, fato já descrito em outros estudos realizados em Teresópolis<sup>14</sup> (Estado do Rio de Janeiro), Uberlândia<sup>15</sup> (Estado do Minas Gerais) e Buenos Aires<sup>16</sup> (Argentina), por exemplo, que apresentaram taxas de infecções por HRV de 33%, 41,7% e 34,4%, respectivamente, o que mostra que esse vírus é um agente importante no que diz respeito às infecções respiratórias.

Desde sua descoberta, o HRV foi intimamente associado aos quadros de infecções respiratórias moderadas, tais como o resfriado comum. Atualmente, de acordo com as diversas investigações conduzidas em todo o mundo, o HRV tem aparecido como um dos principais agentes associados a casos graves de infecções respiratórias, como asma e infecções do trato respiratório inferior<sup>6,17,18,19,20</sup>.

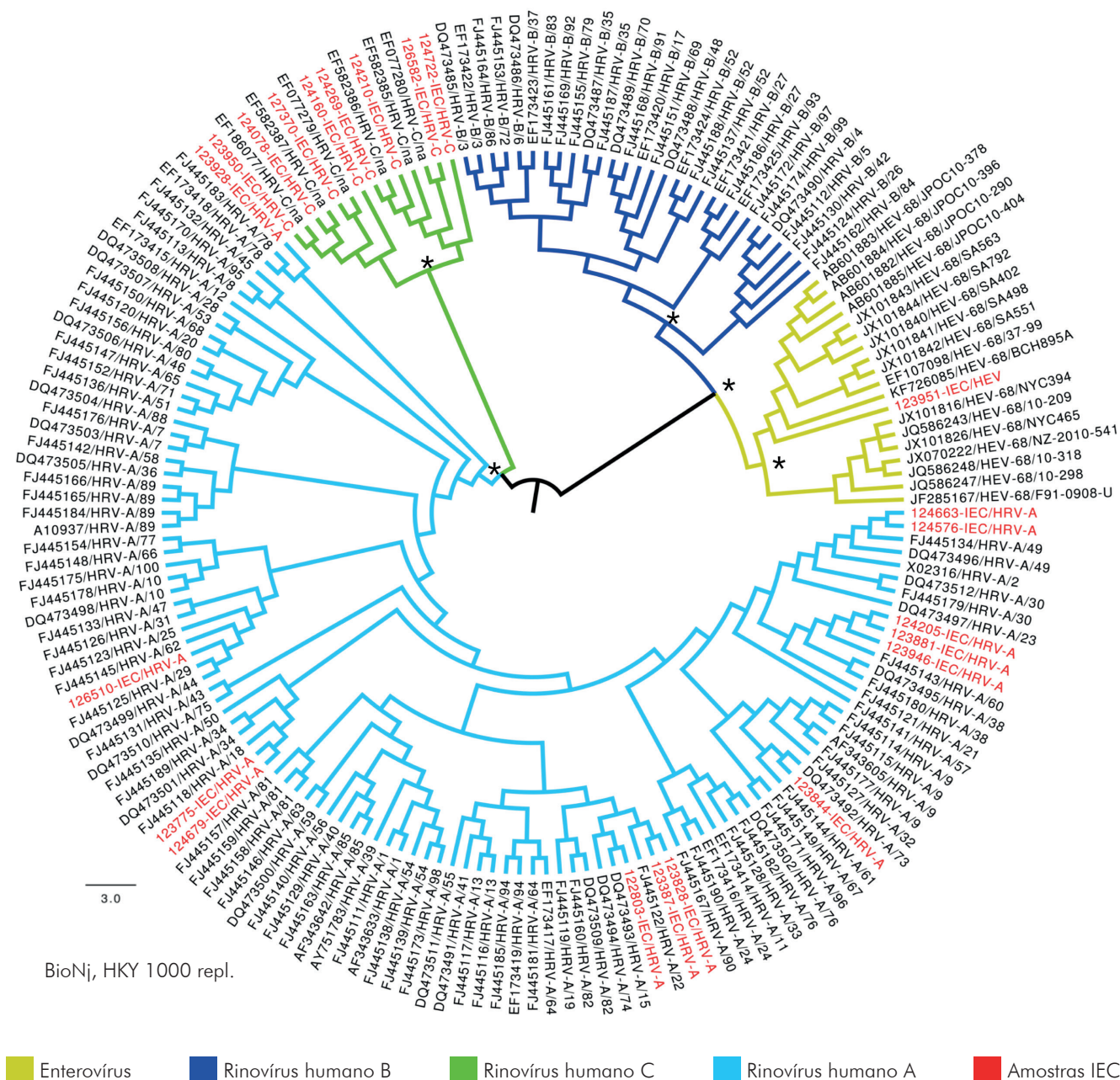
Os resultados do presente estudo demonstraram que os principais grupos etários acometidos foram os de crianças de 0–4 anos e adultos de 26–59 anos. Da mesma forma, a investigação conduzida por Costa<sup>15</sup> verificou uma alta taxa de crianças menores de 5 anos de idade com infecção respiratória aguda causada por HRV, e o estudo realizado por Seo et al<sup>21</sup>, no ano de 2014, detectou a presença do vírus em adultos hospitalizados com infecção respiratória aguda (IRA).



Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

**Figura 2** – Distribuição mensal das amostras positivas do HRV





Árvore construída a partir da sequência parcial dos genes VP4/VP2, pelo método de *neighbor-joining*; valores de bootstrap (X1.000) foram dados para os nós selecionados.

**Figura 3** – Análise filogenética das cepas de HRV detectadas em Belém, Estado do Pará, Brasil, e cepas de outras partes do mundo

Quanto à distribuição mensal do HRV em Belém, durante o período estudado, foi verificada a maior circulação desses agentes nos meses de maio e junho, assim como visto para outros vírus respiratórios, como influenza, metapneumovírus e vírus respiratório sincicial; a circulação do HRV ocorreu predominantemente no primeiro semestre do ano, o qual costuma estar associado ao período de maior pluviosidade na região<sup>22</sup>. Em investigações realizadas ao redor do mundo, o HRV, assim como os demais agentes virais causadores de IRA, tem seu pico de atividade associado principalmente aos meses mais frios do ano<sup>7,22,23,24</sup>.

Estudos com base na variabilidade genética do HRV permitiram identificar as três espécies desse agente que hoje circulam no mundo, bem como os distintos sorotipos presentes em cada espécie<sup>4,22,25,26,27</sup>.

A caracterização genética realizada neste estudo, ainda que em um número reduzido de amostras, evidenciou a circulação das espécies A e C de HRV em Belém no período analisado, com distintos sorotipos em cada espécie. Esses achados corroboram os de outros autores, os quais demonstraram uma maior ocorrência das espécies HRV-A e HRV-C, principalmente em pacientes com quadros mais graves de infecção respiratória<sup>7,21,22</sup>.

Investigações realizadas nos anos de 2008 e 2009 no Japão<sup>7</sup> e, entre os anos de 2009 a 2012, na China<sup>21</sup>, demonstraram dados semelhantes aos do presente estudo, evidenciando também a maior ocorrência das espécies HRV-A e HRV-C; assim como, neste trabalho, também não foi demonstrada a circulação de HRV-B.

No Brasil, estudo conduzido em distintas populações, no Estado de São Paulo, demonstrou a circulação das três diferentes espécies de HRV, sendo a espécie HRV-A a mais prevalente, analogamente ao encontrado nesta investigação<sup>28</sup>.

Quanto à detecção de EV-D68 em uma das amostras analisadas, tal fato já havia sido descrito por outros autores que utilizaram a mesma metodologia de detecção abordada<sup>16,20</sup>. O EV-D68 é um vírus detectado esporadicamente em casos de infecção respiratória, sendo que a maioria deles se apresenta de forma grave, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade<sup>29,30</sup>. Esse agente foi detectado recentemente em surtos de doença respiratória nos Estados Unidos<sup>31</sup>.

## CONCLUSÃO

O HRV apresentou-se como um importante agente de doença respiratória na população investigada ( $n = 59$ , 26%). A faixa etária de 19 a 59 anos concentrou a maioria de casos de infecção respiratória associada ao HRV (45,7%), seguida pelo grupo de 0–4 anos (39%). O pico de atividade do HRV na em Belém ocorreu principalmente nos primeiros seis meses, os quais costumam ser meses com altos índices pluviométricos na região. Houve cocirculação das espécies de HRV, com leve predominância da espécie HRV-A. Distintos sorotipos de HRV foram detectados em Belém. Um caso de SRAG associado ao EV-D68 foi detectado. Este é o primeiro estudo sobre a ocorrência de HRV na Região Amazônica.



## REFERÊNCIAS

- Mackay IM. Human rhinoviruses: the cold wars resume. *J Clin Virol*. 2008 Aug;42(4):297-320.
- Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Jan;26(1):135-62.
- Picornaviridae Study Group. ICTV reports [Internet]. London: Picornaviridae Study Group; 2016 [cited 2016 Apr 18]. Available from: <http://www.picornastudygroup.com>.
- Savolainen C, Mulders MN, Hovi T. Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons. *Virus Res*. 2002 Apr;85(1):41-6.
- Lau SKP, Yip CCY, Tsoi HW, Lee RA, So LY, Lau YL, et al. Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children. *J Clin Microbiol*. 2007 Nov;45(11):3655-64.
- Miller EK, Edwards KM, Weinberg GA, Iwane MK, Griffin MR, Hall CB, et al. A novel group of rhinoviruses is associated with asthma hospitalizations. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jan;123(1):98-104.
- Kaida A, Kubo H, Takakura KI, Togawa M, Shiomi M, Kohdera U, et al. Molecular epidemiology of human rhinovirus C in patients with acute respiratory tract infections in Osaka City, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(6):488-92.
- McIntyre CL, Savolainen-Kopra C, Hovi T, Simmonds P. Recombination in the evolution of human rhinovirus genomes. *Arch Virol*. 2013 Jul;158(7):1497-515.
- Centers for Disease Control and Prevention, Pan American Health Organization. Training course in real-time RT-PCR assays for non-influenza respiratory viruses. Atlanta: CDC; 2013.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987 Jul;4(4):406-25.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*. 2010 Feb;27(2):221-4.
- Felsenstein J. Phylogenies and the comparative method. *Am Nat*. 1985 Jan;125(1):1-15.
- Albuquerque MCM, Varella RB, Santos N. Acute respiratory viral infections in children in Rio de Janeiro and Teresópolis, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2012 Sep-Oct;54(5):249-55.
- Costa LF. Rhinovírus humano em infecções respiratórias agudas em crianças menores de cinco anos de idade: fatores envolvidos no agravamento da doença [tese]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia; 2012.
- Marcone DN, Videla C, Ricarte C, Carballal G, Vidaurreta S, Echavarría M. Rhinovirus detection by real-time RT-PCR in children with acute respiratory infection in Buenos Aires, Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2012 Oct-Dec;44(4):259-65.
- Martins Júnior RB, Carney S, Goldemberg D, Bonine L, Spano LC, Siqueira M, et al. Detection of respiratory viruses by real-time polymerase chain reaction in outpatients with acute respiratory infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Sep;109(6):716-21.

- 18 Landa-Cardena A, Morales-Romero J, García-Roman R, Cobián-Güemes AG, Méndez E, Ortiz-Leon C, et al. Clinical characteristics and genetic variability of human rhinovirus in Mexico. *Viruses*. 2012 Feb;4(2):200-10.
- 19 Pretorius MA, Tempia S, Treurnicht FK, Walaza S, Cohen AL, Moyes J, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of human rhinoviruses in South Africa. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014 Sep;8(5):567-73.
- 20 Lu X, Holloway B, Dare RK, Kuypers J, Yagi S, Williams JV, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *J Clin Microbiol*. 2008 Feb;46(2):533-9.
- 21 Seo YB, Song JY, Choi MJ, Kim IS, Yang TU, Hong KW, et al. Etiology and clinical outcomes of acute respiratory virus infection in hospitalized adults. *Infect Chemother*. 2014 Jun;46(2):67-76.
- 22 Mello WA, Paiva TM, Ishida MA, Benega MA, Santos MC, Viboud C, et al. The dilemma of influenza vaccine recommendations when applied to the tropics: the Brazilian case examined under alternative scenarios. *PLoS One*. 2009 Apr;4(4):e5095.
- 23 Santos MC. Caracterização molecular de cepas do vírus respiratório sincicial isoladas de casos de infecção respiratória aguda na cidade de Belém, Pará, Brasil entre os anos de 2000 a 2006 [dissertação]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 2006.
- 24 Bellei N, Carraro E, Perosa A, Watanabe A, Arruda E, Granato C. Acute respiratory infections and influenza-like illness viral etiologies in Brazilian adults. *J Med Virol*. 2008 Oct;80(10):1824-7.
- 25 Briesse T, Renwick N, Venter M, Jarman RG, Ghosh D, Köndgen S, et al. Global distribution of novel rhinovirus genotype. *Emerg Infect Dis*. 2008 Jun;14(6):944-7.
- 26 Piralla A, Rovida F, Campanini G, Rognoni V, Marchi A, Locatelli F, et al. Clinical severity and molecular typing of human rhinovirus C strains during a fall outbreak affecting hospitalized patients. *J Clin Virol*. 2009 Aug;45(4):311-7.
- 27 Hughes PJ, North C, Jellis CH, Minor PD, Stanway G. The nucleotide sequence of human rhinovirus 1B: molecular relationships within the rhinovirus genus. *J Gen Virol*. 1988 Jan;69(Pt 1):49-58.
- 28 Watanabe A, Carraro E, Kamikawa J, Leal E, Granato C, Bellei N. Rhinovirus species and their clinical presentation among different risk groups of non-hospitalized patients. *J Med Virol*. 2010 Dec;82(12):2110-5.
- 29 Imamura T, Suzuki A, Lupisan S, Okamoto M, Aniceto R, Egos RJ, et al. Molecular evolution of enterovirus 68 detected in the Philippines. *PLoS One*. 2013 Sep;20(8):e74221.
- 30 Renois F, Bouin A, Andreoletti L. Enterovirus 68 in pediatric patients hospitalized for acute airway diseases. *J Clin Microbiol*. 2013 Feb;51(2):640-3.
- 31 Centers for Disease Control and Prevention. Non-polio enterovirus [Internet]. Atlanta: CDC; 2015 [cited 2016 Apr 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/EV-D68.html>.

Recebido em / Received: 2/6/2016  
Aceito em / Accepted: 2/9/2016