



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS & MARIA DEANE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO
PATÓGENO - HOSPEDEIRO

FERNANDA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
HUMANO NO AMAZONAS EM 2019

MANAUS – AMAZONAS

2021

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO
PATÓGENO - HOSPEDEIRO**

FERNANDA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
HUMANO NO AMAZONAS EM 2019**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Dr. Felipe Gomes Naveca
Coorientadora: Dra. Lígia Fernandes Abdalla

MANAUS – AMAZONAS

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

N244c

Nascimento, Fernanda de Oliveira

Caracterização genética do vírus sincicial respiratório humano no Amazonas em 2019. / Fernanda de Oliveira Nascimento. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2021.

114 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Lígia Fernandes Abdalla.

1. Vírus sincicial respiratório 2. Filogenia I. Título

CDU 616-053.2(811.3)(043.3)

CDD 616.209811

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – Bibliotecário CRB-11/ 287

FERNANDA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
HUMANO NO AMAZONAS EM 2019**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro (PPGBIO – INTERAÇÃO), como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração Bioquímica, Biologia Celular e Molecular de Patógenos e seus vetores.

Aprovada em: 30/06/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Paola Resende Silva
Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Priscila Aquino
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Dedico esta conquista à minha família:
Minha amada filha Maísa,
Meu melhor amigo e companheiro Ítalo,
Meus pais Mauro e Luciana e minha irmã Maria Louise,
Meus avós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus pelo dom da vida, por me guiar e iluminar meu caminho;

Aos meus pais Mauro e Luciana e minha irmã Maria Louise, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Em especial ao meu pai, sempre tão dedicado e amigo, que sempre fez questão de me levar e deixar na escola, faculdade e principalmente agora no mestrado por me oferecer todo o apoio necessário após eu me tornar mãe. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão e o meu amor por você pai;

A minha avó Maria das Graças, minha segunda mãe com seu carinho, cuidado, conselhos e amor, almoços e me escutar sempre que preciso;

A minha filha Maísa, amor da minha vida, que torna tudo mais leve apenas com seu sorriso fácil. Minha mini pesquisadora que de tanto me ouvir falar de vírus já sabe até detalhes e brinca de fazer coleta de *swab* nos ursinhos (efeito pandemia);

Ao Ítalo, meu melhor amigo e companheiro, o qual sempre me admirou e apoiou. Sem a sua ajuda eu jamais teria conseguido chegar aqui. Te amo!

A toda a minha família que sempre vibrou com as minhas conquistas, em especial minha tia Irineide que é uma inspiração de dedicação e amor a profissão, meus tios Murilo, Matheus, Marcelo, Duda, meu avô Marco e todos;

Ao meu orientador Dr. Felipe Naveca, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe e me acolher tão bem desde a nossa primeira conversa. Por acreditar em mim, depositar a sua confiança e ser mais que um orientador, um amigo. O senhor sabe que pode contar comigo, mesmo nos sábados e feriados quando pede para fazermos experimentos urgentes (risos). Obrigada por toda a paciência;

Agradeço em especial à Val, por toda a ajuda, ensinamento, estar comigo na correria do dia a dia e por sempre estar disponível para conversar sobre qualquer coisa. Por acreditar em mim, me apoiar e me incentivar;

A Matilde, minha mãe do laboratório, obrigada pelos puxões de orelha e companheirismo nas nossas milhões de extrações. Obrigada pela amizade e compartilhar os desafios da vida de mãe comigo;

À toda equipe da virologia, André, Vitinho e George (Sujinhos Team pra sempre) pelos inúmeros géis e sequenciamento (até gel de uma amostra só),

Patrícia e Débora pelas nossas extrações de Trizol, Ágatha minha companheira de mestrado desde a seleção, Karina, Dana, Maju, uma honra trabalhar com todos vocês;

Agradeço à Michele, a quem tive a oportunidade de conhecer e me identificar tanto. Por todas as coletas que fizemos ao longo da pandemia (foram muitas!), embarcando comigo desde a primeira coleta quando ainda não tinha nem sido registado o primeiro caso no Amazonas e apesar de toda a tensão do momento sua alegria e amizade foram essenciais para aguentar a pressão. E ao Lúcio, motorista e nosso companheiro de coletas no início;

Agradeço a Gio e Janne por todas as vezes que precisei de material. A Rejane, dona Juracy, Sebastião, Erick e todos que ajudam na esterilização dos materiais;

Meu muito obrigada para Carol, Tallita e Ágatha, minhas colegas de turma de mestrado. Obrigada por todo o apoio nas horas de desespero principalmente. Desejo todo o sucesso do mundo a vocês meninas!

Ao Programa de Pós-Graduação Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro e a todos os professores que tive a honra em conhecer;

Agradeço a Prof. Aya Sadahiro por todo carinho, paciência e dedicação durante o estágio docência e a quem tenho muita admiração e carinho.

Ao LACEN-AM e FVS, em especial a Marineide, Irênio, Guilherme e Luciana por toda a ajuda na disponibilização das amostras para a execução desta pesquisa;

Aos meus anjinhos de quatro patas, Vivi (*in memoriam*), Naveen, Luna, Nah, que foram meus companheiros nas madrugadas de estudos;

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio e concessão da bolsa de mestrado;

E por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) é o patógeno mais detectado em casos de infecções do trato respiratório inferior em crianças menores de cinco anos, adultos imunocomprometidos e idosos. Vários surtos por HRSV vêm sendo identificados ao longo dos anos no mundo, gerando um alerta e a necessidade de reforçar a vigilância deste patógeno. O HRSV é classificado em dois grupos (HRSV-A e HRSV-B) e vários genótipos, descritos com base na variabilidade genética do gene que codifica a glicoproteína G. Nas últimas décadas novos genótipos surgiram contendo duplicações de nucleotídeos na segunda região hipervariável do gene G, como ON1 (HRSV-A) e BA (HRSV-B), substituindo os genótipos circulantes anteriores e espalhando-se globalmente. Em 2019, ainda em um período pré-pandemia de SARS-CoV-2, o Amazonas registrou um aumento significativo nos casos de Síndrome Gripal (SG) e Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), sendo o HRSV o vírus mais detectado na rotina de diagnóstico. Este estudo teve como objetivo caracterizar geneticamente o HRSV que circulou neste período no Amazonas e inferir as introduções do vírus no estado. Ao total, 57 amostras de HRSV foram obtidas entre 2019 a 2021. Dentre as amostras de 2019, 77,7% pertenciam ao HRSV-B e 13,8% a HRSV-A; e de 2020 e 2021 99% pertenciam ao HRSV-A. Destas, apenas 17 foram sequenciadas por sequenciamento de nova geração (NGS), todas referentes ao ano de 2019, sendo os genótipos ON1 (N=2) e BA9 (N=15) identificados. Essa é a primeira vez que o genótipo ON1 é descrito circulando no Amazonas. Apesar do viés amostral devido ao baixo número de genomas mundiais, as análises filogenéticas e filogeográficas discreta, revelaram que houve diferentes introduções do HRSV no estado e ambos os subtipos evoluíram de forma semelhante a um relógio estrito, com taxas médias de substituições de nucleotídeos de $6,33 \times 10^{-4}$ para HRSV-A e $6,041 \times 10^{-4}$ para HRSV-B. Dessa maneira, acreditamos que este estudo venha a contribuir na vigilância genômica do HRSV no Amazonas e no Brasil, descrevendo não somente os genótipos circulantes e mutações, mas gerando os primeiros genomas completos de HRSV do norte do país.

Palavras-chave: Vírus Sincicial Respiratório Humano; Glicoproteína G; Vigilância genômica; NGS; Filogenia;

ABSTRACT

The Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is the most detected pathogen in cases of lower respiratory tract infections in children under five years of age, immunocompromised adults and the elderly. Several proven HRSV outbreaks have been identified over the years in the world, generating an alert and the need to reinforce surveillance of this pathogen. HRSV is classified into two groups (HRSV-A and HRSV-B) and many genotypes, based on the genetic variability of the gene encoding the G glycoprotein. In recent decades, new genotypes have emerged containing nucleotide duplications in the second hypervariable region of the G gene, as the ON1 (HRSV-A) and BA (HRSV-B), replacing the previous circulating genotypes and spreading globally. In 2019, still in a pre-pandemic period of SARS-CoV-2, the state of Amazonas registered a significant increase in the cases of Flu Syndrome (SG) and Severe Acute Respiratory Syndrome (SRAG), with HRSV being the most detected virus in the routine of diagnosis. This study aimed to genetically characterize the HRSV that circulated during this period in Amazonas and to infer how the virus was introduced in the state. In total, 57 were from HRSV were pushed between 2019 to 2021. Among as of 2019, 77.7% belonged to HRSV-B and 13.8% to HRSV-A; and from 2020 and 2021 99% belonged to the HRSV-A. Of these, only 17 were sequenced by next generation sequencing (NGS), all referring to the year 2019, with the ON1 (N = 2) and BA9 (N = 15) genotypes identified. This is the first time that the ON1 genotype is described circulating in Amazonas. Despite the sampling bias due to the low number of genomes worldwide, discrete phylogenetic and phylogeographic analyzes revealed that there were different introductions of HRSV in the state and both subtypes evolved similarly to a strict clock, with mean rates of nucleotide substitutions of $6,33 \times 10^{-4}$ for HRSV-A and 6.041×10^{-4} for HRSV-B. Thus, we believe that this study will contribute to HRSV genomic surveillance in Amazonas and Brazil, describing not only the circulating genotypes and mutations, but generating the first complete HRSV genomes in the north of the country.

Keywords: Respiratory Virus; Human Respiratory Syncytial Virus; Glycoprotein G; Genomic surveillance; Phylogenetic analyses;

Sumário

| | |
|---|----|
| RESUMO | 8 |
| 1. REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 1.1 Histórico do Vírus Sincicial Respiratório Humano | 18 |
| 1.2 Classificação do HRSV | 19 |
| 1.3 Estrutura: Genoma e Morfologia | 21 |
| 1.4 Proteínas virais..... | 23 |
| 1.5 Replicação e transcrição viral..... | 28 |
| 1.6 Caracterização gênica e antigênica | 31 |
| 1.7 Epidemiologia do HRSV | 33 |
| 1.8 Aspectos clínicos, Tratamento e Vacinas..... | 36 |
| 1.9 Vigilância de Vírus Respiratórios..... | 41 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 44 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 44 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 3.1 Amostras utilizadas no estudo..... | 45 |
| 3.2 Critérios de inclusão..... | 45 |
| 3.3 Aspectos éticos | 45 |
| 3.4 Coleta e diagnóstico das amostras pelo LACEN/AM | 45 |
| 3.5 Extração do RNA (Ácido Ribonucleico) viral | 46 |
| 3.6 RT-PCR em tempo real para identificação dos grupos A e B..... | 46 |
| 3.7 Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)..... | 47 |
| 3.8 Amplificação do gene G de HRSV A e B..... | 47 |
| 3.9 Amplificação do genoma completo..... | 48 |
| 3.10 Análise dos produtos amplificados | 49 |
| 3.11 Purificação dos produtos de PCR com Polietilenoglicol (PEG) | 49 |
| 3.12 Sequenciamento do gene G..... | 49 |
| 3.13 Sequenciamento do genoma completo por NGS | 51 |
| 3.14 Montagem das sequências..... | 51 |
| 3.15 Análises das sequências e filogenia..... | 51 |
| 3.16 Fluxograma da metodologia..... | 54 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 4.1 Identificação dos subgrupos de HRSV (A e B)..... | 55 |
| 4.2 Padronização da PCR convencional para o sequenciamento do gene G .. | 58 |

| | |
|--|------------|
| 4.3 Padronização da PCR convencional para o sequenciamento do genoma completo de HRSV..... | 58 |
| 4.4 Sequenciamento do genoma completo do HRSV por NGS | 60 |
| 4.5 Montagem do genoma | 62 |
| 4.6 Genotipagem e análises filogenéticas e filogeográficas de HRSV-A e HRSV-B..... | 63 |
| 5. CONCLUSÕES | 88 |
| REFERÊNCIAS..... | 90 |
| ANEXOS | 102 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1 - Árvore filogenética da família <i>Pneumoviridae</i> | 19 |
| Figura 2 - Comparação estrutural entre as partículas filamentosas e esféricas do HRSV e suas representações esquemáticas | 21 |
| Figura 3 - Modelo representativo da morfologia do HRSV filamentoso Organização dos genes no genoma do HRSV..... | 23 |
| Figura 4 - Organização dos genes no genoma do HRSV..... | 27 |
| Figura 5 - Esquema da forma ancorada à membrana (G _m) e solúvel (G _s) da Glicoproteína G do HRSV..... | 26 |
| Figura 6 - Ciclo replicativo do HRSV..... | 29 |
| Figura 7 - Representação esquemática da localização dos sinais de início e fim dos genes do HRSV..... | 29 |
| Figura 8 - Padrão da circulação de HRSV no Brasil..... | 36 |
| Figura 9 - Representação do total de amostras caracterizadas como HRSV A e B nos anos de 2019, 2020 e 2021 provenientes do estado do Amazonas..... | 565 |
| Figura 10 - Identificação dos subgrupos de HRSV nas amostras incluídas no estudo por RT-PCR em tempo real..... | 56 |
| Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto de PCR do gene G de HRSV-B. Padronização da temperatura ideal. | 58 |
| Figura 12 - Padronização de temperaturas para PCR do genoma completo de HRSV | 59 |
| Figura 13 - Comparação entre a RefSeq de HRSV-A (NC_038235.1) com o fragmento da amostra VR_006 obtido por sequenciamento capilar..... | 621 |
| Figura 14 – Comparação entre a primeira montagem do genoma utilizando a RefSeq do GenBank para HRSV-A (sem a duplicação) versus a segunda montagem utilizando a sequência de referência de maior similaridade MW160824 (com a duplicação)..... | 63 |
| Figura 15 - Árvore filogenética para genotipagem das amostras de HRSV-A.. | 67 |
| Figura 16 - Árvore filogenética para genotipagem das amostras de HRSV-B.. | 68 |
| Figura 17 - Gráfico de <i>Likelihood mapping analysis</i> para os conjuntos de dados de HRSV-A e HRSV-B..... | 70 |

| | |
|--|----|
| Figura 18 - Análise filogeográfica de máxima verossimilhança das amostras de HRSV-A..... | 72 |
| Figura 19 - Análise filogeográfica de máxima verossimilhança das amostras de HRSV-B..... | 73 |
| Figura 20 - Resultados da análise de estrutura temporal das sequências para HRSV-A..... | 73 |
| Figura 21 - Resultados da análise de estrutura temporal das sequências para HRSV-B..... | 74 |
| Figura 22 – Árvore filogeográfica de Credibilidade Máxima de Clado (MCC) das sequências de codificação completas (CDS) do HRSV-A..... | 77 |
| Figura 23 – Árvore filogeográfica de Credibilidade Máxima de Clado (MCC) das sequências de codificação completas (CDS) do HRSV-B..... | 78 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Resumo das proteínas do HRSV e suas funções..... | 24 |
| Tabela 2 - Principais propostas de classificação do HRSV ao longo dos anos..... | 31 |
| Tabela 3 - Descrição dos iniciadores utilizados para amplificação do gene G do VSRH A e B..... | 46 |
| Tabela 4 - Iniciadores utilizados na PCR convencional para amplificação do genoma completo de HRSV..... | 47 |
| Tabela 5 - Descrição dos iniciadores adicionados na reação de sequenciamento para HRSV A e B..... | 49 |
| Tabela 6 - Amostras de Vírus Respiratórios obtidas ao longo dos anos de 2019 a 2021..... | 54 |
| Tabela 7 - Descrição dos dados das amostras de HRSV 2019 sequenciadas..... | 59 |
| Tabela 8 - Diferenças observadas nos resíduos de aminoácidos das sequências de HRSV-A do Amazonas ao longo do genoma quando comparada a sequência de referência MW160824..... | 79 |
| Tabela 9 - Alterações de aminoácidos no gene da proteína G das amostras de HRSV-A do Amazonas..... | 80 |
| Tabela 10 - Diferenças observadas nos resíduos de aminoácidos das sequências de HRSV-B do Amazonas, utilizando a <i>Refseq</i> KF826822..... | 82 |
| Tabela 11 - Alterações de aminoácidos no gene da proteína G das sequências de HRSV-B do Amazonas..... | 83 |
| Tabela 12 - Identificação das mutações de HRSV A e B das sequências do Amazonas no RSVserver disponível no GISAID..... | 85 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| AA | Aminoácido |
| AAP | Academia Americana de Pediatria |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BI | <i>Bayesian inference</i> |
| BIC | <i>Bayesian Information Criterion</i> |
| BSSVS | <i>Bayesian Stochastic Search Variable Selection</i> |
| CCA | <i>Chimpanzee Coryza Agent - Agente de Coriza do Chimpanzé</i> |
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> |
| cDNA | DNA complementar |
| CDS | <i>CoDing Sequence</i> – Região codificante |
| CHD | Doença cardíaca congênita |
| CLD | Doença pulmonar crônica |
| CoV | Coronavírus |
| COVID-19 | Doença infecciosa causada pelo SARS-CoV-2 |
| Ct | <i>Cycle threshold</i> – Ciclo Limiar |
| CX3CR1 | Receptor 1 de quimiocina |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucléico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos trifosfatados |
| EtOH | Álcool etílico |
| EUA | Estados Unidos da América |
| F | Proteína de fusão |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FLU | Vírus Influenza |
| FVS/AM | Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas |
| G | Glicoproteína G |
| HAdV | Adenovírus Humano |
| HBoV | Bocavírus Humano |
| hMPV | Metapneumovírus Humano |
| HRSV | <i>Human Respiratory Syncytial Virus</i> - Vírus Sincicial Respiratório Humano |

| | |
|----------|--|
| GISAID | <i>Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data</i> |
| GISRS | <i>Global Influenza Surveillance and Response System</i> |
| Gm | Proteína G ancorada à membrana |
| Gs | Proteína G solúvel |
| HSPG | Sulfato de Heparana |
| HVR2 | Segunda Região Hipervariável de G |
| ICTV | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> |
| IgG | Imunoglobulina G |
| ILMD | Instituto Leônidas e Maria Deane |
| Kb | <i>Kilobase</i> |
| KDA | <i>Kilodalton</i> |
| L | Subunidade 4 da polimerase |
| LACEN/AM | Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas |
| LTRI | Infecção do Trato Respiratório Inferior |
| M | Proteína de Matriz |
| mAbs | Anticorpos Monoclonais |
| MCC | Máxima Credibilidade de Clados |
| MCMC | <i>Markov Chain Monte Carlo</i> |
| µl | Microlitro |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MTV | Meio de Transporte Viral |
| MV | Máxima Verossimilhança |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NGS | <i>Next-Generation Sequencing</i> – Sequenciamento de Nova Geração |
| NP | Nucleoproteína |
| NREVSS | <i>National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System</i> |
| NS | Proteína não estrutural |
| nt | Nucleotídeo |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |

| | |
|-------------|---|
| ORF | <i>Open Reading frame</i> – Região de leitura aberta |
| P | Fosfoproteína |
| Pb | Pares de bases |
| PCR | <i>Polimerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase |
| PIV | Parainfluenza |
| RCF | Força centrífuga relativa |
| RefSeq | Sequência de referência |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> - Ácido Ribonucleico |
| RNP | Rnase P |
| RPM | Rotações por minuto |
| RpRd | RNA polimerase dependente de RNA |
| RT-PCR | <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> |
| SARS-CoV-2 | Síndrome Respiratória Aguda Grave pelo Coronavírus 2 |
| SE | Semana Epidemiológica |
| SG | Síndrome Gripal |
| SH | Pequena proteína de superfície |
| SIVEP-Gripe | Sistema de Vigilância Epidemiológica da Gripe |
| SRAG | Síndrome Respiratória Aguda Grave |
| SSIV | <i>SuperScript IV Reverse Transcriptase</i> |
| TLR4 | <i>Toll-like Receptor 4</i> |
| tMRCA | <i>Estimating time to the most recent common ancestor</i> |
| U | Unidade Enzimática |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Histórico do Vírus Sincicial Respiratório Humano

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) foi isolado pela primeira vez em 1956 por Morris e colaboradores, a partir de uma colônia de chimpanzés do *Walter Reed Army Institute of Research*, Estados Unidos da América (EUA), que apresentavam sintomas clínicos comuns às doenças respiratórias, como coriza, espirros e tosse. Diante da epizootia, foi feita uma coleta de *swab* da garganta dos animais e realizado o isolamento em cultura de células. Após a constatação da infecção viral, o agente patogênico foi nomeado como Agente de Coriza em Chimpanzés (*Chimpanzee Coryza Agent - CCA*) (Morris et al. 1956).

Chanock et al. (1957) inocularam o vírus em alguns animais de laboratório como coelhos, camundongos e chimpanzés, porém foi observado que somente os primatas desenvolveram os sintomas da doença. No mesmo ano de isolamento, um técnico de laboratório que trabalhava com o CCA e os chimpanzés mostrou-se potencialmente infectado pelo vírus e dados sorológicos sugeriram que humanos testados apresentavam anticorpos contra o vírus ou algum outro intimamente relacionado a ele (Morris et al. 1956).

Posteriormente, um vírus similar foi isolado de crianças hospitalizadas nos EUA e devido a sua capacidade de formar sincícios e ter afinidade ao trato respiratório foi renomeado para Vírus Sincicial Respiratório (Chanock et al. 1957).

No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em 1964 por Candeias, em um estudo com um grupo de 24 crianças que apresentavam quadros respiratórios graves, como bronquiolite e broncopneumonia em um hospital da cidade de São Paulo. Quatro amostras obtiveram sucesso no isolamento viral em culturas de células HeLa, apresentando efeito citopático ao fim do 7º dia e todas foram neutralizadas pelo soro homólogo padrão, confirmando a infecção por HRSV (Candeias 1967).

O HRSV é considerado o agente etiológico de doenças do trato respiratório com maior importância pediátrica no mundo, rotineiramente identificado em crianças com idade entre zero e cinco anos, que apresentam insuficiência respiratória, pneumonia e bronquiolite (Shi et al. 2017b). Acomete cerca de 95% das crianças em seus primeiros dois anos de vida, adultos,

principalmente idosos e imunocomprometidos; sendo comum a ocorrência de reinfecções ao longo da vida (Anderson et al. 1990, Hall et al. 1991, Falsey et al. 2005).

Apresenta tropismo quase exclusivamente restrito ao trato respiratório, infectando principalmente os epitélios ciliados de pequenos bronquíolos e pneumócitos nos alvéolos. Os sintomas clínicos mais comuns da infecção por HRSV surgem, em grande parte, como resultado da obstrução das vias aéreas, onde restos de células inflamatórias, fibrina, muco e agregados linfóides levam a um fluxo aéreo restrito, hipóxia e sibilância (Johnson et al. 2007).

1.2 Classificação do HRSV

O HRSV está classificado como membro da ordem *Mononegavirales*, a qual possui outros representantes importantes como o vírus da raiva (família *Rhabdoviridae*) e o vírus Ebola (família *Filoviridae*). Está incluso na família *Pneumoviridae*, que apresenta dois gêneros: o *Metapneumovirus* que infectam mamíferos e pássaros; e o *Orthopneumovirus*, no qual pertence o Vírus Sincicial Respiratório, da espécie *Orthopneumovirus humano*. Dentro da espécie tem-se também o *Orthopneumovirus bovino* e o *Orthopneumovirus murino* (Amarasinghe et al. 2019). Sugere-se que houve um salto entre espécies durante a evolução desses vírus e até o momento não há descrito um reservatório animal para o HRSV (Collins & Graham 2008).

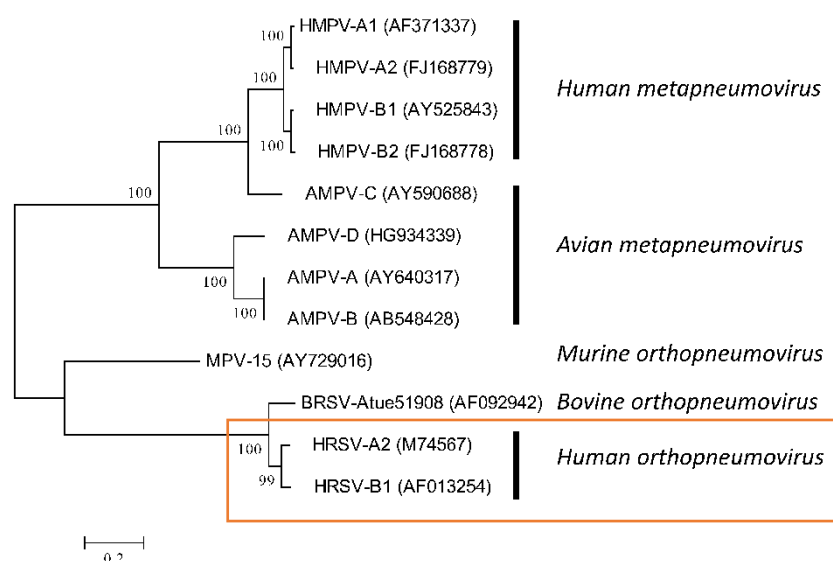


Figura 1 – Árvore filogenética da família *Pneumoviridae*. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança contendo o gênero *Human orthopneumovirus* em destaque. Fonte: Rima et al. 2017.

Os membros da família *Pneumoviridae* apresentam algumas características como: os vírions podem ser tanto esféricos quanto filamentosos; possuem genoma de RNA não segmentados de sentido negativo; a replicação ocorre no citoplasma; a RNA polimerase é dependente de RNA e compreende as proteínas P e L; a tradução é feita de forma sequencial e a maquinaria de tradução celular traduz os RNAs mensageiros capeados e poliadenilados no citoplasma (Rima et al. 2017).

Dois subgrupos antigênicos do HRSV foram descritos, denominados A e B, com base em análises *in vitro* de ensaios de neutralização e padrões de reatividade com anticorpos monoclonais, com maior variância observada na proteína G (Coates et al. 1966, Anderson et al. 1985, Maurice Mufson et al. 1985). Sabe-se que os dois subgrupos podem circular separadamente ou simultaneamente durante epidemias (Johnson et al. 1987).

Alguns estudos sugerem que as infecções provocadas pelo HRSV-A são mais frequentes quando comparadas ao HRSV-B e sua transmissibilidade parece ser maior (White et al. 2005). Além disso, isolados do subgrupo A podem apresentar manifestações clínicas diferentes e estar associado à doenças mais graves quando comparado ao B (Martinello et al. 2002, Liu et al. 2016).

Em 2013, dados do maior estudo epidemiológico de HRSV mostraram que ambos os subtipos (A e B) foram detectados, entretanto, mais pacientes foram infectados com HRSV-A do que com HRSV-B (20,4% versus 10,9%, respectivamente) e pacientes com VSRH-A positivos eram mais propensos a serem admitidos em unidade hospitalar ou unidade de terapia intensiva (47,7% A) em comparação com o HRSV-B (35,8%), sustentando a hipótese de que o subtipo A pode ser mais virulento e causar quadros mais graves. No entanto, mais estudos são necessários para determinar se realmente o subtipo do HRSV está associado à gravidade da doença (Jafri et al. 2013).

Fodha et al. (2007) ao avaliarem 81 bebês em seu estudo, concluíram que a gravidade da doença não estava significativamente associada ao subgrupo do HRSV, mas que provavelmente fosse determinado por uma interação entre os fatores do patógeno e do hospedeiro, como exemplo, a carga viral. Essa correlação entre a gravidade da doença e a carga viral permanece controversa, uma vez que os métodos de medição da carga viral variam amplamente entre os estudos (Vianna et al. 2021).

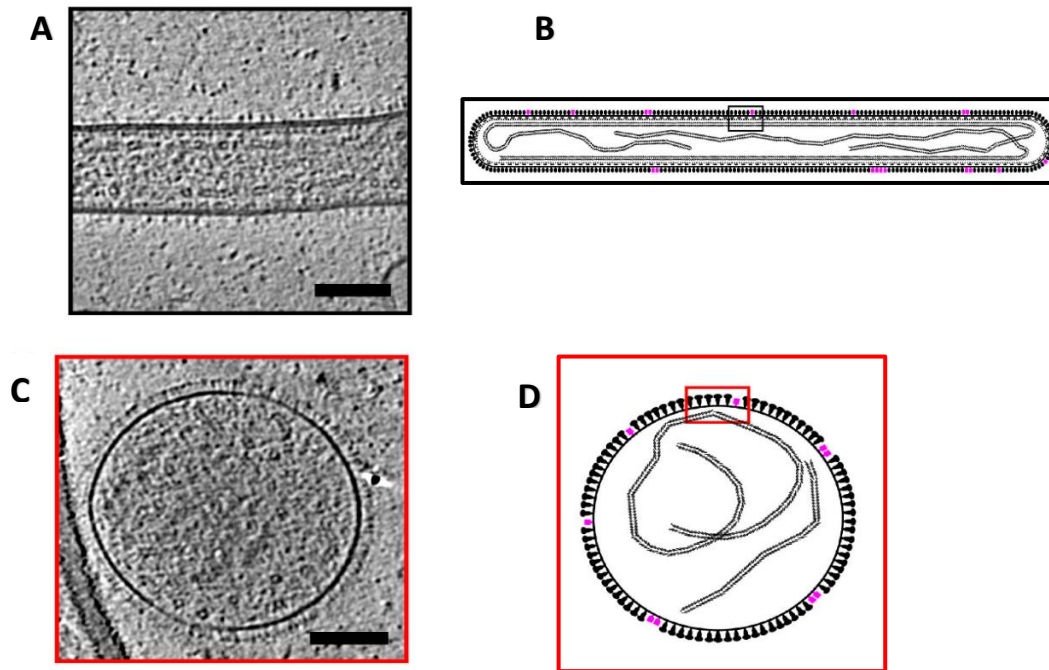


Figura 3 - Comparação estrutural entre as partículas filamentosas e esféricas do HRSV e suas representações esquemáticas. Representação de uma partícula filamentososa (A) e seu esquema (B); Estrutura e esquema de uma partícula esférica do HRSV (C e D). As caixas em B e D mostram a disposição das glicoproteínas de superfície F e G. Fonte: Adaptado de Ke et al. 2018.

1.3 Estrutura: Genoma e Morfologia

O HRSV é um vírus pleomórfico, envelopado, que pode apresentar estruturas esféricas irregulares de 100 nm a 350 nm de diâmetro ou partículas em formas filamentosas longas com um diâmetro de 60 nm a 200 nm (Norrby et al. 1970), como mostra a figura 2. Sugere-se que a proteína de matriz regula a morfologia do HRSV, no entanto, existem desafios para elucidar algumas questões relacionadas a este tema devido à dificuldade em isolá-lo em cultura de células por conta da instabilidade física da partícula e do baixo rendimento viral (Liljeroos et al. 2013, Ke et al. 2018).

O vírion possui um envelope externo, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira por brotamento, no qual encontram-se inseridas três glicoproteínas de superfície: a proteína de fusão (F), a glicoproteína de adesão (G) e a pequena proteína hidrofóbica (SH), que formam projeções semelhantes a espículas de 10-14 nm de comprimento, espaçadas no HRSV de 8-11 nm (Rima et al. 2017).

Na matriz, duas proteínas estão presentes, denominadas M e M2-1, que revestem o interior da membrana viral (Kiss et al. 2014). O nucleocapsídeo, um

complexo proteico associado ao RNA viral (vRNA), é composto pela Fosfoproteína (P), Nucleoproteína (N), a subunidade 4 da polimerase (L) e o fator de transcrição M2-2. Há também duas proteínas não estruturais 1 e 2 (NS1 e NS2) (Collins & Graham 2008). As funções das proteínas estão apresentadas de forma resumida na Tabela 1 e a representação morfológica na Figura 3.

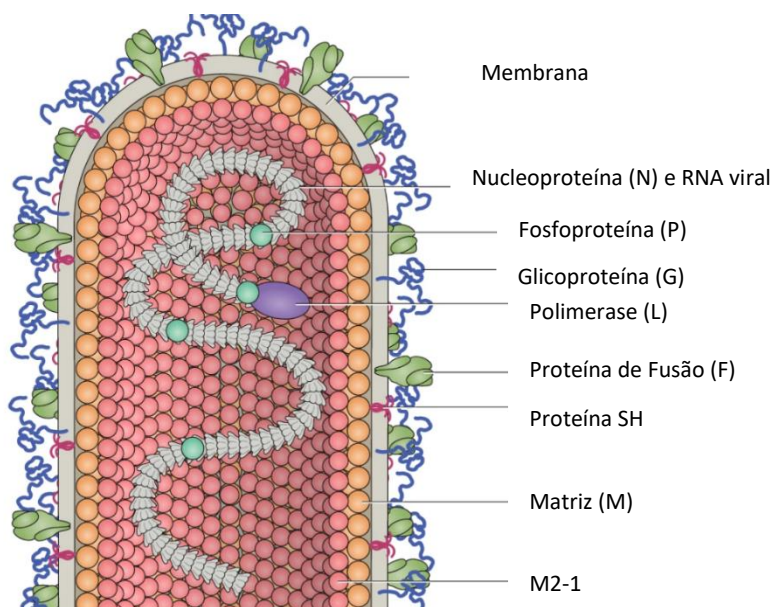


Figura 3 - Modelo representativo da morfologia do HRSV filamentoso. São mostradas as glicoproteínas de fixação (G) e fusão (F), assim como a pequena proteína hidrofóbica (SH) na membrana viral. Uma camada de proteína da matriz (M) fica sob a membrana viral e dá ao vírion sua forma filamentosa. A proteína M2-1 - um fator de processabilidade da transcrição - interage tanto com a proteína M quanto com a nucleoproteína (N) que envolve o genoma do RNA viral. A grande subunidade da polimerase (L) e o cofator da fosfoproteína polimerase (P) também estão associados a N. Fonte: Adaptado de Battles & McLellan 2019.

O genoma viral consiste em um RNA fita simples, não segmentado, de polaridade negativa, composto por aproximadamente 15 mil nucleotídeos, com 10 genes que codificam 11 proteínas, entre elas proteínas estruturais e não estruturais (Huang & Wertz 1982, Collins et al. 1984). Cada partícula infecciosa de HRSV possui apenas uma cópia funcional do genoma (Collins et al. 2008).

O HRSV codifica 10 RNAs mensageiros subgenômicos, cada um contendo uma ORF (*Open Reading Frame*), com exceção de M2 que possui duas, codificando as proteínas M2-1 e M2-2 (Gould & Easton 2007). Na porção 3' do genoma do vírus, há uma região de 44 nucleotídeos denominada região *leader*, seguida pelos dez genes virais e ao final do genoma uma região extragênica de 155 nucleotídeos, conhecida como região *trailer* (Collins et al. 2001).

Os genes são separados por regiões intergênicas que podem variar até 56 nucleotídeos e são regiões pouco conservadas entre as amostras (Figura 4). Os dois primeiros genes transcritos são as proteínas não estruturais NS1 e NS2, sendo esta uma das principais diferenças entre os genomas dos gêneros *Orthopneumovirus* e os *Metapneumovirus* que não as possuem. Os genes M2 e L fazem uma sobreposição (*overlap*) de 68 nucleotídeos ao final do genoma, fazendo com que L tenha o início de sua transcrição dentro do gene M2 e consequentemente, o sinal de término e poliadenilação de M2 está localizado dentro do gene L (Collins et al. 2013).

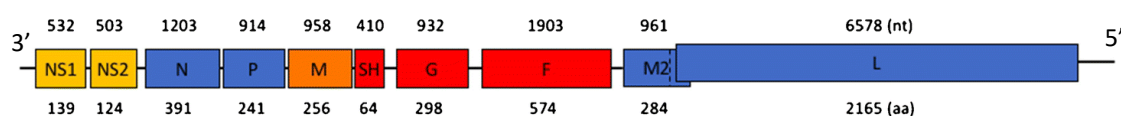


Figura 4 - Organização dos genes no genoma do HRSV. Em amarelo: genes das proteínas não estruturais (NS1 e NS2); em azul os genes das proteínas associadas ao nucleocapsídeo (N, P, M2 e L); em laranja o gene da proteína de Matriz (M); em vermelho os genes das glicoproteínas de superfície (SH, F e G). O comprimento do genoma é indicado por nt (nucleotídeos) na parte superior e o comprimento das proteínas por aa (aminoácidos), parte inferior. Fonte: Taleb et al. 2018.

1.4 Proteínas virais

O HRSV codifica 11 proteínas, diferindo da maioria dos membros de sua família, que normalmente têm de 6 a 7 mRNAs que codificam de 7 a 9 proteínas separadas (Collins et al. 2013).

As primeiras proteínas codificadas são as proteínas não estruturais NS1 e NS2, que possuem 139 e 124 aminoácidos respectivamente. Na literatura têm-se descrito que elas estão relacionadas a interferência nas respostas imunes inatas do hospedeiro, inibindo a indução e sinalização de interferon (Spann et al. 2005, Sedeyn et al. 2019). Além disso, inibem a apoptose, prolongando a vida da célula e aumentando a produção viral (Bitko et al. 2007). Porém, mais estudos devem ser voltados para a elucidação de suas funções.

Assim como outros membros da família *Pneumoviridae*, o HRSV tem seu genoma complexado com as proteínas N, P, L e M2-1 para a formação do nucleocapsídeo (Bakker et al. 2013).

A proteína N, é a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo, composta por 391 aminoácidos, que se liga ao genoma para formar

nucleocapsídeos helicoidais, servindo como molde para a síntese de RNA (Bakker et al. 2013, Collins et al. 2013).

A fosfoproteína (P) possui 241 aminoácidos, é um cofator essencial da polimerase, interage com a nucleoproteína (N) e a polimerase (L) e possui função importante na transcrição e replicação viral (Collins et al. 2013). É a principal proteína fosforilada do HRSV, contendo fosfato em diferentes sítios e alguns experimentos em que a fosforilação de P foi reduzida demonstraram que é um fator importante para a replicação do vírus (Lu et al. 2002).

A proteína M, composta de 256 aminoácidos, é uma proteína estrutural não glicosilada que desempenha um papel importante na montagem do vírus (Marty et al. 2004). Está também associada ao nucleocapsídeo e estudos sugerem que ela possa inibir a atividade de transcrição viral (Ghildyal et al. 2002). M2-1 intercede a associação entre M e os complexos de ribonucleoproteína (RNPs) que compreendem o RNA genômico viral fortemente associado à N (Battles & Mclellan 2019).

A proteína interna M2-1, de 194 aminoácidos, é um fator essencial na transcrição de VSRH, interagindo com as demais proteínas que compõem o nucleocapsídeo (Collins et al. 2001). Na literatura, há evidências que ilustram que M2-1 está localizado entre RNP e M em partículas virais isoladas e que M e M2-1 regulam a organização do vírus (Kiss et al. 2014).

Por sua vez, M2-2 (aproximadamente 90 aminoácidos), é codificada pelo penúltimo gene de HRSV, o qual apresenta duas ORFs sobrepostas, gerando M2-1 e M2-2 (Birmingham & Collins 1999). Está envolvida na regulação da transcrição e replicação do RNA viral e estudos sugerem que o nível de produção da proteína M2-2 nas células infectadas pode ser crítico para a replicação do RSV (Cheng et al. 2005).

A proteína L é a maior proteína do HRSV, sendo constituída de 2.165 aminoácidos. Possui atividades enzimáticas de polimerase dependente de RNA. Assim como outros vírus de genoma de RNA não segmentado e fita negativa, são descritas seis regiões conservadas em L (Collins et al. 2013).

A pequena proteína de superfície, SH, é expressa por todos os membros da família *Pneumoviridae* e possui cerca de 64 aminoácidos (pode variar de HRSV-A para HRSV-B). Sua função ainda não está bem esclarecida, mas SH parece ser uma viroporina, uma classe de pequenas proteínas virais que podem

modificar a permeabilidade da membrana e podem afetar o brotamento e a apoptose (Fuentes et al. 2007).

Os dois antígenos principais, F e G, são as glicoproteínas de superfície mais abundantes no vírion e têm papéis importantes na entrada do vírus na célula. A glicoproteína G atua principalmente como uma proteína de fixação que liga os vírions às células-alvo e a glicoproteína F tem principal função de mediar a fusão das membranas virais com a célula hospedeira (Walsh & Hruska 1983, Levine et al. 1987). Ambas são as únicas proteínas alvo de anticorpos neutralizantes, sendo a proteína F a candidata mais potente para estudos que visam o desenvolvimento de drogas e vacinas contra HRSV (Graham et al. 2015).

A proteína F é uma proteína de fusão de classe I de 574 aminoácidos que forma uma estrutura trimérica com pelo menos dois estados bem conhecidos, um estado metaestável de pré-fusão e um estado estável de pós-fusão (Melero et al. 2017). As comparações estruturais entre os vírions filamentosos e esféricos revelaram diferenças significativas associadas às glicoproteínas de superfície, onde as partículas filamentosas de HRSV estavam cobertas com F no estado pré-fusão e as partículas esféricas tinham predominantemente a forma pós-fusão. Isso fornece um mecanismo molecular que relaciona a morfologia e a infectividade do vírus, sugerindo que o HRSV filamentoso é a forma infecciosa (Liljeroos et al. 2013; Ke et al. 2018).

Tabela 1 - Resumo das proteínas do HRSV e suas funções.

| Proteína | Função |
|---------------------------|--|
| Fusão (F) | Promove a fusão do vírus à célula |
| Glicoproteína (G) | Promove adesão do vírus ao receptor celular |
| Proteína Hidrofóbica (SH) | Acredita-se estar envolvida no retardo da apoptose em células infectadas |
| Fosfoproteína (P) | Tradução e Replicação |
| Nucleoproteína (N) | Regula a transcrição e replicação do vRNA |
| Matriz (M) | Morfologia viral |
| Polimerase (L) | Atividades enzimáticas |
| M2-1 | Fundamental para a transcrição |
| M2-2 | Controla o equilíbrio entre transcrição e replicação |
| NS1 | Sinalização celular (IFN) |
| NS2 | Inibição de apoptose |

Fonte: Cani et al. 2001, Collins et al. 2008.

Dentre as proteínas virais, a proteína G, responsável pela adesão do vírus à célula tem sido alvo de muitos estudos por interagir com os receptores celulares do hospedeiro, ser alvo de anticorpos neutralizantes e ser utilizada para a genotipagem do vírus, apresentando regiões altamente variáveis (Johnson et al. 1987, Levine et al. 1987). Sabe-se que é uma proteína análoga a hemaglutinina de outros vírus da família *Paramyxoviridae*, porém não apresenta ação hemaglutinante e é uma das mais abundantes no vírion juntamente com a proteína F (Hall et al. 1991, Collins & Graham 2008).

A proteína G pode ser encontrada no vírus de duas formas: ancorada à membrana (G_m), responsável pela ligação viral à célula hospedeira; ou em uma forma solúvel (G_s) que está relacionada à mediação da evasão imunológica (Levine et al. 1987, Hendricks et al. 1988). O gene que a codifica tem aproximadamente 950 nucleotídeos (Wertz et al. 1985).

Em sua forma ligada à membrana, G é uma glicoproteína tipo II de aproximadamente 300 aminoácidos, dependendo da cepa viral, constituída de três regiões: uma cauda citoplasmática (AA 1-38) na porção amino-terminal (N-terminal), um único domínio hidrofóbico entre os resíduos 38 e 66 que atua como um domínio de âncora de membrana e um domínio extracelular (AA 66-298), onde estão presentes duas regiões variáveis responsáveis pela divergência entre as amostras dos grupos A e B, além de algumas regiões conservadas (Figura 5) (Wertz et al. 1985; Johnson et al. 1987; Hendricks et al. 1988). Sua massa molecular é de apenas 32,588 KDa, porém, alterações pós-traducionais no complexo de Golgi podem levar à formação de um peptídeo de 80 a 90 kDa (Satake & Venkatesan 1984, Palomo et al. 1991).

A forma solúvel de G surge devido à iniciação da tradução em um códon alternativo (Met48 em G_m), localizado no meio do domínio transmembranar que exclui o domínio citoplasmático e a porção restante do domínio transmembranar após um evento proteolítico, permitindo que o ectodomínio seja secretado pela célula (Roberts et al. 1994). Portanto, essa forma não permanece ancorada a membrana, pois não tem os 65 resíduos de aminoácidos iniciais da porção N-terminal, onde fica localizada a região transmembrana da proteína. Não está claro por que tal evento proteolítico ocorre apenas na proteína G encurtada, uma vez que a proteína G completa contém a mesma sequência. Além disso, enquanto G_s é monomérica, G_m é oligomérica (Escribano-Romero et al. 2004).

A função de Gs ainda não foi bem esclarecida, mas Bukreyev et al. (2008) sugerem que a proteína em sua forma solúvel age como uma isca de anticorpos, ajudando o HRSV a escapar da restrição de replicação dependente de anticorpos e como modulador de leucócitos contendo receptores Fc gama.

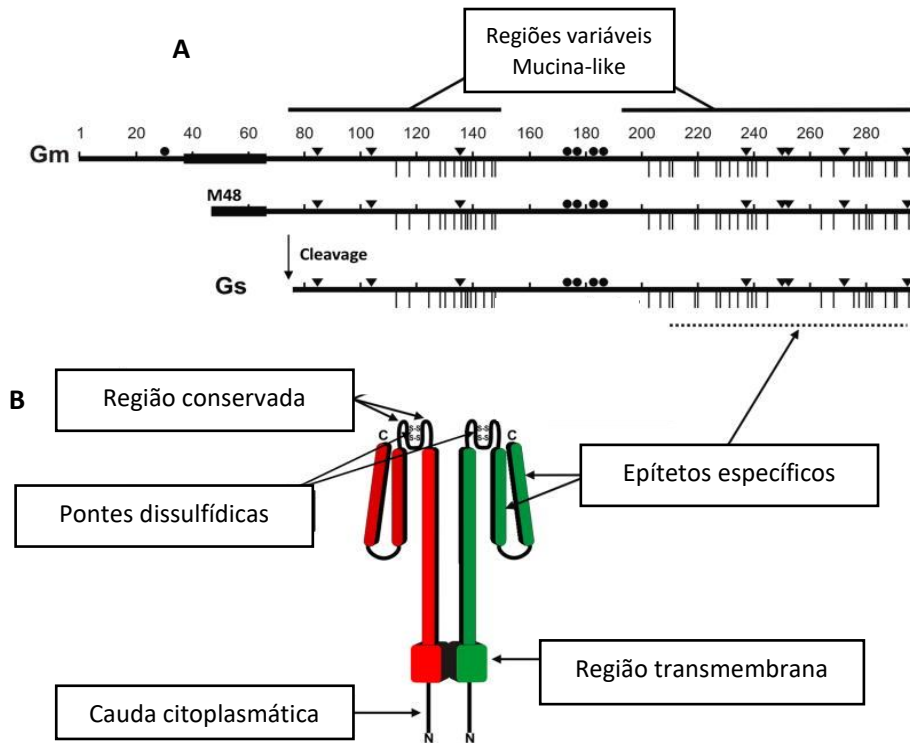


Figura 5 - Esquema da forma ancorada à membrana (Gm) e solúvel (Gs) da Glicoproteína G do HRSV. A) As regiões hidrofóbicas são representadas por linhas grossas. Triângulos invertidos representam locais de glicosilação ligados a N e linhas verticais indicam locais de glicosilação ligados a O. Os resíduos de cisteína conservados são representados por círculos. As regiões variáveis são mostradas com barras horizontais em cima de Gm. A forma solúvel é formada por iniciação de tradução alternativa em M48, seguida por clivagem após o resíduo 65. B) Modelo da estrutura de G ancorada à membrana em forma de dímero para simplificar. Adaptado de: Meler et al. 2017.

Análises moleculares da segunda região hipervariável da proteína G têm sido utilizadas para caracterizar os genótipos de HRSV, divididos em dois grupos, HRSV-A e B (Peret et al. 2000). Acredita-se que essa variabilidade pode contribuir para a capacidade do vírus causar surtos anuais e está relacionada a fatores de virulência entre as cepas, além de que alterações nas sequências de aminoácidos podem fornecer uma vantagem ao vírus possivelmente alterando epítetos e auxiliando no escape da resposta imune preexistente do hospedeiro (De-Paris et al. 2014).

No ectodomínio, estudos sugerem que as regiões conservadas encontradas sejam responsáveis pela ligação do vírus ao receptor celular e

candidatas a domínios importantes no transporte, processamento, atividade biológica e neutralização, como a região central de 13 aminoácidos que abrange os resíduos 164 ao 176 na sequência de referência A2 e uma região com quatro cisteínas espaçadas (resíduos 173, 176, 182 e 186) ligadas entre si por pontes de dissulfeto, que são conservadas em todas as cepas virais (Johnson et al. 1987, Palomo et al. 1991).

Por sua vez, as regiões variáveis são compostas por uma sequência de aminoácidos com alto teor de serina, treonina e prolina, assemelhando-se a uma classe de proteínas denominadas como mucinas (Wertz et al. 1985). Essas regiões são glicosiladas pela adição pós-traducional de vários açúcares ligados a -N e oligossacarídeos ligados a -O, contribuindo para a estrutura antigênica da proteína e a infectividade viral (Eshaghi et al. 2012).

A primeira região variável antecede o *cluster* de cisteínas conservadas e possui estrutura em forma de haste devido a múltipla O-glicosilação, que possivelmente facilita a interação vírus-célula devido tornar a região de interação com o receptor distante suficiente do envelope viral (Martinelli et al. 2014, Melero et al. 2017). A segunda região variável, que corresponde à região C-terminal da proteína G, é a região mais variável da proteína e reflete a variabilidade global do gene, sendo a mais utilizada em estudos de epidemiologia molecular (Melero & Moore 2013).

1.5 Replicação e transcrição viral

O processo de entrada do vírus na célula (Figura 6) consiste em duas etapas principais: fixação do vírion à célula hospedeira e fusão das membranas viral e da célula hospedeira (Battles & McLellan 2019). A infecção viral inicia-se quando a proteína G do HRSV interage com o receptor das células ciliadas das vias aéreas, tendo tropismo pelas células da superfície apical (Collins & Graham 2008, Villenave et al. 2012). Alguns receptores que interagem com o HRSV por ligação à proteína G descritos são: receptor *Toll-like* 4 (TLR4), o receptor 1 de quimiocina (CX3CR1) e o sulfato de heparana (HSPG) (Krusat & Streckert 1997, Kurt-Jones et al. 2000).

Posteriormente o envelope viral incorpora-se à membrana celular do hospedeiro ocorrendo a fusão por ação da proteína F, que além dessa ação facilita a micro pinocitose, promovendo ainda mais a fusão de células infectadas

com células não infectadas adjacentes, resultando em sincícios, característica que deu nome ao vírus (Levine et al. 1987, Kahn et al. 1999, Krzyzaniak et al. 2013).

Após a fusão, o complexo helicoidal de ribonucleoproteína (RNP) é liberado no citoplasma da célula hospedeira, e a transcrição e replicação ocorrem no citoplasma sem a participação do núcleo celular (Collins et al. 2001).

A transcrição do genoma viral é iniciada na direção 3' 5' a partir de um promotor localizado na terminação 3' não codificante do genoma denominado *leader* (Fearnls et al. 2002). Os RNAs produzidos são poliadenilados na extremidade 3' e recebem um "cap" na extremidade 5'. Cada gene é transcrito em um mRNA poliadenilado, separado e limitado, que codifica uma única proteína viral, com exceção do gene M2, que codifica duas proteínas distintas, M2-1 e M2-2 (Collins et al. 2001). No início da transcrição, a enzima RpRd adere-se à região promotora do genoma e na junção entre essa região e o primeiro gene (NS1), ocorre a liberação do transcrito e a polimerase recomeça a transcrição de forma sequencial do início ao fim, guiados pelos sinais de início (*leader*) e final do gene (*trailer*), representado na Figura 7, resultando na produção de RNAs mensageiros de cópias iguais ao gene original (Collins et al. 1984, Fearnls et al. 2002, Collins et al. 2007).

A replicação ocorre com a geração de um RNA antígenômico de sentido positivo que servirá como molde para a síntese de cópias do genoma viral (Noton et al. 2019).

Por fim, a maturação viral ocorre com a montagem do nucleocapsídeo, através da combinação das proteínas N, P e L com o RNA genômico, próximo à membrana plasmática. Para a montagem do envelope, ao passar pelo retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, as proteínas de superfície sofrem glicosilação e as proteínas de matriz incorporam-se na porção interna do envelope em formação. O nucleocapsídeo chega à superfície celular e é liberado por brotamento, levando uma porção da membrana plasmática em um processo contrário à penetração por fusão (Collins & Graham 2008).

Os vírions são liberados como partículas filamentosas e alguns estudos indicam que com o tempo, M se dissocia da membrana viral, criando regiões não filamentosas no vírion que, em última análise, levam a formação de partículas esféricas ou pleomórficas que são consideradas menos infecciosas,

provavelmente devido a uma conversão prematura da proteína F da pré-fusão em conformação pós-fusão (Ke et al. 2018).

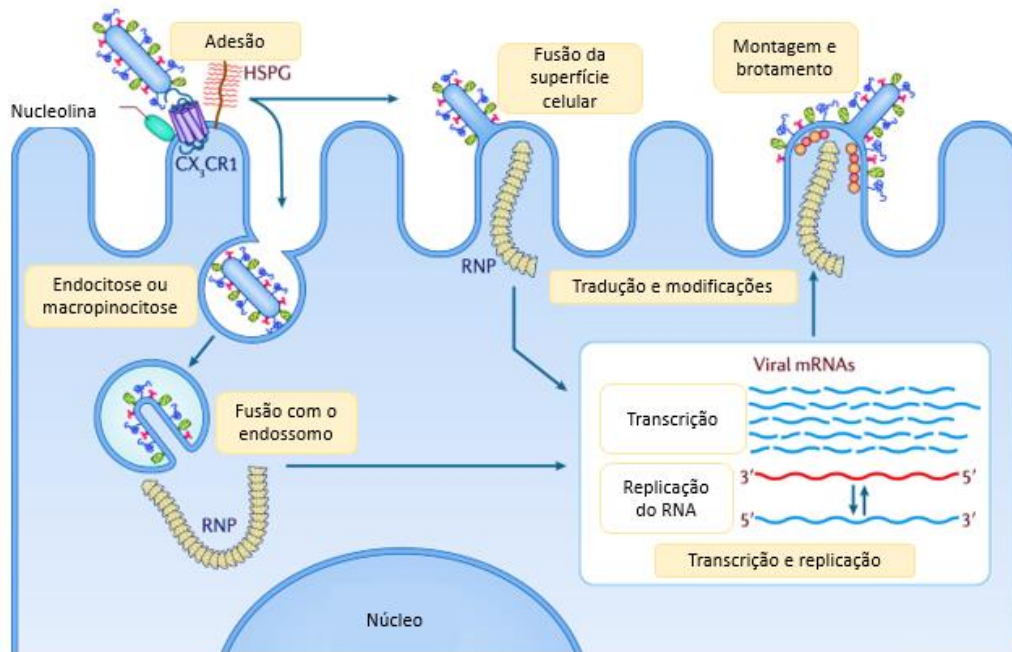


Figura 6 – Ciclo replicativo do HRSV. Entrada do vírus na célula por endocitose, fusão das membranas, liberação do complexo helicoidal de ribonucleoproteína (RNP) no citoplasma dão início aos processos de transcrição e replicação do genoma. Por fim, as novas partículas virais são liberadas por brotamento. Fonte: (Battles & Mclellan 2019).

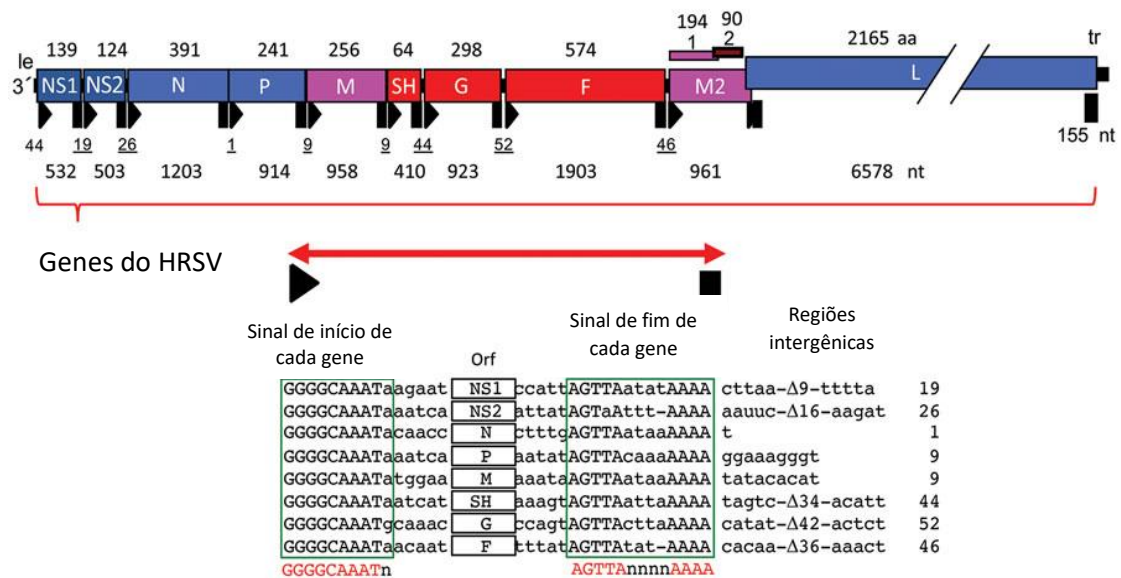


Figura 7 – Representação esquemática da localização dos sinais de início e fim dos genes do HRSV. Os sinais de início do gene (*leader*) são representados por triângulos pretos e os sinais de fim (*trailer*) dos genes são mostrados como retângulos pretos, separados por regiões intergênicas (sublinhadas). Fonte: Salimi et al. 2021.

1.6 Caracterização gênica e antigênica

Os vírus com genoma RNA apresentam altas taxas de mutação ao longo de suas sequências, determinadas pela falta de revisão da RNA polimerase e elevadas taxas de replicação, podendo acarretar benefícios para o vírus como maior virulência e capacidade de evolução e adaptação ao hospedeiro (Holland et al. 1982, Belshaw et al. 2007).

Em 1966, Coates e colaboradores mostraram a variabilidade antigênica de isolados de HRSV pelo teste de neutralização com soro de furões infectados, posteriormente, foi possível confirmar definitivamente a existência desses grupos antigênicos por meio de ensaios utilizando anticorpos monoclonais (mAbs) obtidos de camundongos imunizados com diferentes cepas de HRSV, como A2, Long e CH18537 (Anderson et al. 1985), sendo então nomeados os grupos como A e B e demonstrando que ambos evoluíram separadamente ao longo do tempo (Mufson et al. 1985). A designação do grupo HRSV A e B também é referida como “subgrupos” antigênicos na literatura (Hall et al. 1990, Matheson et al. 2006).

Com o advento das técnicas de biologia molecular e sequenciamento genético, com base nas análises das sequências dos genes N, P, SH, e G foi possível confirmar a divisão do HRSV nos grupos A e B e identificar os genótipos circulantes (Sullender et al. 1993, Peret et al. 1998) e foi visto que os diferentes genótipos co-circularam ao longo das estações e que podem existir diferentes padrões de circulação entre os grupos (Cane et al. 1992, Venter et al. 2001).

O primeiro sistema de classificação de genótipos do HRSV, proposto em 1998, contava com informações de sequenciamento da segunda região hipervariável do gene G e os genótipos eram nomeados com base no gene usado para classificação, seguido pelo subtipo HRSV (A ou B) e um número crescente (Peret et al. 1998). Posteriormente, o método de classificação anterior foi refinado incluindo a distância genética como uma métrica para definir grupos genéticos e houve mudanças no sistema de nomenclatura, incluindo o país onde o genótipo foi descrito (Venter et al. 2001).

Inicialmente, seis genótipos foram identificados, sendo quatro para HRSV A, chamados de SHL1 a SHL6 e dois identificados entre HRSV B, denominados de NP1 e NP3 (Cane et al. 1992). Ao longo do tempo, outros genótipos foram descritos como GA1 a GA5 e GB1 a GB4, GA6 e GA7 (Peret et al. 2000); SAA1

e SAB1 a SAB3 descritos pela primeira vez na África do Sul (Venter et al. 2001); BA1 a BA10, descrito na Argentina e que tem como característica uma duplicação de 60 nucleotídeos no G (Trento et al. 2006); URU1 e URU2 descritos no Uruguai (Arbiza et al. 2005); NA1 e NA2 identificados no Japão (Shobugawa et al. 2009); e o mais recente o genótipo ON1 identificado em Ontário, no Canadá e que apresenta uma duplicação de 72 nt (Eshaghi et al. 2012).

Hoje, são descritos pelo menos 13 genótipos de VSRH A e 37 genótipos de HRSV B (Muñoz-Escalante et al. 2019b, 2021). Devido à sua alta variabilidade, a diversidade genética do HRSV se baseou com mais frequência no gene G (García et al. 1994). No entanto, não existem critérios estabelecidos para a definição do genótipo, o que afeta o entendimento da evolução viral, imunidade e desenvolvimento de vacinas.

Vários grupos defendem a necessidade da unificação da classificação dos genótipos de HRSV, mas até o momento não há um consenso. (Muñoz-Escalante et al. 2019b, 2021, Goya et al. 2020, Ramaekers et al. 2020).

Tabela 2 – Principais propostas de classificação do HRSV ao longo dos anos.

| AUTOR | REGIÃO ALVO | PROPOSTA DE CLASSIFICAÇÃO | ACESSO AO ARTIGO |
|------------------------------|--------------------|--|-------------------------------|
| Peret et al. 1998 | HVR2 do gene G | Cinco genótipos e 22 subtipos de VSRH-A; Quatro genótipos e 6 subtipos de VSRH-B; | 10.1099/0022-1317-79-9-2221 |
| Venter et al. 2001 | HVR2 do gene G | Definição de novos genótipos: SAA1 e SAB1-4 | 10.1099/0022-1317-82-9-2117 |
| Trento et al. 2006 | HVR2 do gene G | Definição dos genótipos BA1-6 | 10.1128/JVI.80.2.975-984.2006 |
| Shobugawa et al. 2009 | HVR2 do gene G | Definição de NA1-2 | 10.1128/JCM.00115-09 |
| Depat et al. 2010 | HVR2 do gene G | Definição de BA7-10 | 10.1128/JCM.00646-10 |
| Eshaghi et al. 2011 | HVR2 do gene G | Definição do genótipo ON1 | 10.1371/journal.pone.0032807 |
| Cui et al. 2013 | HVR2 do gene G | Definição de NA3, NA4, BA-C e CB1 | 10.1371/journal.pone.0075020 |
| Trento et al. 2015 | Ectodomínio de G | Proposta de reclassificação de VSRH-A utilizando o G | 10.1128/JVI.00467-15 |

| | | | |
|------------------------------------|------------------|--|-------------------------------|
| Muñoz-Escalante et al. 2019 | Ectodomínio de G | Proposta de reclassificação de VSRH-A para 9 genótipos: GA1-GA7, SAA1 e NA1 | 10.1038/s41598-019-56552-2 |
| Goya et al. 2020 | Ectodomínio de G | Proposta de reclassificação de VSRH-A para 3 genótipos: GA1-GA3) e 7 para VSRH- B (GB1-GB7). | 10.1111/irv.12715 |
| Ramaekers et al. 2020 | Genoma completo | Proposta de reclassificação de VSRH-A e B: 23 genótipos de A e 6 de B; | 10.1093/ve/veaa052 |
| Muñoz-Escalante et al. 2021 | Ectodomínio de G | Proposta de reclassificação de VSRH-B de 37 genótipos para 15; | 10.1038 / s41598-021-83079-2. |

Vários grupos de pesquisa de HRSV uniram-se a fim de propor uma definição de nomenclatura comum para amostras e isolados de HRSV e também o uso de nomes padrão e anotações apropriadas para seus genes. Priorizando uma linha de definição curta e concisa que seja fácil de usar em laboratório, de fácil leitura e um sistema uniforme para HRSV em bancos de dados públicos (Salimi et al. 2021).

Os elementos de definição de sequência propostos por Salimi et al. 2021 são:

- I. Nome do organismo; Abreviatura do nome do vírus: HRSV;**
- II. Subgrupo HRSV: A ou B; X, se desconhecido;**
- III. Identificador geográfico para o local de amostragem** (por exemplo, cidade ou estado);
- IV. Identificador único isolado;**
- V. Ano de amostragem; YYYY ou XXXX, se desconhecido.**

Exemplos de linhas de definição de sequência usando a nomenclatura proposta: HRSV / A / USA / 001/2011; HRSV / B / Denver.USA / 14617/1985 ou HRSV / X / IRN / 001/2017 (subgrupo desconhecido).

1.7 Epidemiologia do HRSV

As doenças respiratórias são responsáveis por um grande volume de atendimentos e internações hospitalares por ano no mundo, causando morbidade e mortalidade significativas na população (WHO 2014, Kabir 2018). Os vírus são um dos principais agentes etiológicos envolvidos nessas infecções e têm como características a fácil transmissão e a capacidade de acometer

indivíduos em todas as faixas etárias, sendo as crianças, idosos e imunocomprometidos os mais afetados (Falsey et al. 2005).

O diagnóstico viral é muitas vezes negligenciado e dificultado somente com a clínica devido à presença de um grande número de patógenos nas vias respiratórias, no entanto, o diagnóstico correto é crucial na identificação dos vírus circulantes, na transmissão, controle e prevenção de surtos (Kabir 2018). Os vírus mais frequentes associados a estas infecções são Influenza (A e B) (Cox & Bender 1995), HRSV, Rinovírus (RV), Coronavírus (CoV), Parainfluenza (PIV) 1 - 4, Adenovírus (HAdV), Metapneumovírus (HMPV) (Broor et al. 2008) e Bocavírus (HBoV) (Essa et al. 2015).

O HRSV é o vírus de maior importância pediátrica, sendo o agente etiológico que mais causa infecção respiratória aguda e morte em crianças menores de 5 anos, podendo acometer também adultos, pessoas imunocomprometidas, e principalmente idosos (Falsey et al. 2005, Meissner 2016, Tseng et al. 2020).

Uma revisão sistemática estimou que a infecção do trato respiratório inferior (LRTI) associada ao HRSV é responsável por entre 94.600 e 149.400 mortes anualmente no mundo; além disso, cerca de 33 milhões de LRTI associados ao HRSV resultaram em 3,2 milhões de internações hospitalares em 2015, sendo os países de baixa e média renda os mais afetados (Shi et al. 2017).

As LTRI correspondem a primeira causa de mortalidade infantil nos países de baixa renda e a quarta nos países de média renda, que incluem o Brasil (Ferone et al. 2014). Os principais fatores associados à gravidade da infecção em crianças são prematuridade, doença cardíaca congênita, doença pulmonar crônica, baixo peso ao nascer, ter irmãos, tabagismo materno e não amamentação (Shi et al. 2017).

No Brasil, o HRSV foi encontrado em 23,1-42,2% dos bebês internados por LTRI e esteve associado a 3,6% dos óbitos (Lamarão et al. 2012). No entanto, a falta de dados sobre o número total de internações e mortalidade por doenças do trato respiratório inferior em crianças ocasionadas por HRSV, complica a avaliação do impacto global da doença (Freitas & Donalizio 2016).

Vários países descrevem a ocorrência de HRSV como EUA (Rose et al. 2018), África (Umuhoza et al. 2021), Canadá (Mitchell et al. 2017), Inglaterra e outros países europeus (Reeves et al. 2020), Rússia (Krivitskaya et al. 2021),

Japão (Hibino et al. 2018), China (Zhang et al. 2015; Luo et al. 2020), Brasil (Moura et al. 2006), Portugal (Sáez-López et al. 2020) e outros. Observa-se que os padrões de sazonalidade e a duração dos surtos variam consideravelmente entre as regiões.

Grande parte dos estudos feitos nos EUA, descreve a sazonalidade do HRSV do outono até a primavera (Haynes et al. 2014). No entanto, ao utilizar um novo método estatístico que analisa detecções laboratoriais de PCR relatadas ao *National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System* (NREVSS) para determinar a sazonalidade do HRSV, mostrou que o início das temporadas de 2014 a 2017 ocorreram aproximadamente 2 semanas antes do que as temporadas de 2012-2014, que foram determinadas usando dados de antígenos, mostrando ser um modelo de maior confiança para ser utilizado (Rose et al. 2018).

A definição de sazonalidade no Brasil se baseia na análise descritiva de identificação do HRSV realizada nas regiões geográficas do país, utilizando dados Sistema de Vigilância Epidemiológica da Gripe e outros vírus respiratórios – SIVEP GRIPE (sivepgripe.com.br).

Em geral, países do hemisfério sul apresentam o aumento no número de casos entre os meses de março e junho e em países do hemisfério norte entre setembro e dezembro (Obando-pacheco et al. 2018). Em países de clima temperado as epidemias têm sido descritas nos meses de inverno e nas regiões de clima tropical, parecem ocorrer nas estações chuvosas (Law et al. 2002).

No Brasil, a sazonalidade do HRSV varia de acordo com cada região. A maioria dos estudos realizados no país descrevem a circulação do vírus na região sul e sudeste. No Sul, onde a temperatura é mais fria, o pico dos surtos acontece no inverno, entre os meses de abril a agosto. No Sudeste, as epidemias têm sido relacionadas entre os meses de março e abril. Já no Nordeste, a sazonalidade ocorre durante a estação chuvosa nos primeiros meses do ano, assim como na região Norte (Freitas & Donalisio 2016).

No estado de São Paulo, a sazonalidade é bem definida, não estando associada a temporada de chuvas, mas sim com a época de maior incidência de poluição do ar, com pico entre os meses de maio e junho (Vieira et al. 2001).

Um estudo realizado com amostras do Espírito Santo confirmou a maior prevalência de HRSV em crianças menores de um ano de idade nas amostras

analisadas e mostrou que a atividade da HRSV foi muito semelhante entre 2016 e 2017, com o início de circulação ocorrendo em março e terminando em julho/agosto, podendo ter variações sutis em cada temporada (Vianna et al. 2021).

Na região norte, Santos et al. (2018) mostrou em seu estudo uma taxa de infecção viral relevante em crianças de 0 a 4 anos de idade e descrevem a circulação de HRSV no Acre, Amazonas e Pará durante o período de mudança climática, entre os meses de março e julho.

De acordo com Alonso et al. (2020), com base nos dados de mortalidade e hospitalização por pneumonia e Influenza, são distinguidas quatro zonas sazonais de infecções respiratórias no Brasil (figura 8), sendo:

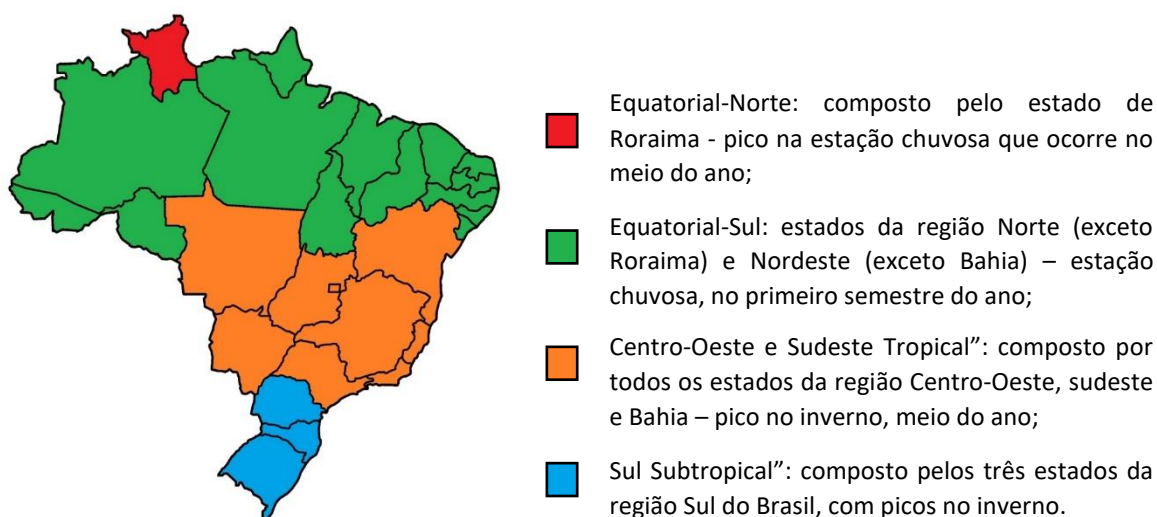


Figura 6 - Padrão da circulação de HRSV no Brasil. Mapa do Brasil com os estados classificados nas quatro “zonas sazonais de infecção respiratória”: “Equatorial-Norte” (vermelho), “Equatorial-Sul” (verde), “Centro-Oeste Tropical e Sul- Leste” (laranja) e “Sul subtropical” (azul). Fonte: Adaptado de Alonso et al. 2020.

Além da sazonalidade, o padrão de circulação dos grupos do HRSV (A e B) também difere em cada local e temporadas. A co-circulação de ambos os grupos é bem relatada, bem como de seus genótipos, porém nos últimos anos nota-se a predominância do grupo HRSV-A e seus genótipos em relação a B (Al-Sharif et al. 2020).

1.8 Aspectos clínicos, Tratamento e Vacinas

A transmissão do HRSV pode acontecer de pessoa a pessoa por meio de aerossóis, ou por contato com secreções, objetos e superfícies contaminadas,

sendo muito infeccioso quando em contato com mucosas, como ocular ou nasal. O aparecimento dos sintomas varia de acordo com a idade e condições de saúde e geralmente ocorre dentro de até seis dias após a infecção (Hall et al. 1991).

Geralmente os sintomas do trato respiratório superior começam a aparecer entre o quarto dia, sendo comum febre, rinorreia e congestão, seguidos de sintomas do trato respiratório inferior. O aumento da tosse é geralmente o primeiro sinal de envolvimento do trato respiratório inferior; os sintomas posteriores incluem taquipneia, dispneia, aumento do esforço respiratório e dificuldade de alimentação (Meissner 2016).

Johnson et al. (2007) demonstraram que o vírus infecta tanto o epitélio brônquico quanto o alveolar, e que a obstrução das pequenas vias aéreas a partir de projeções epiteliais, detritos inflamatórios, edema ou compressão por agregados linfóides pode ser um componente importante da patogênese da doença.

O aspecto clínico da infecção pode variar de acordo com a idade e condições de saúde do indivíduo e os principais sintomas geralmente incluem coriza, perda do apetite, tosse, espirros e febre, que podem aparecer isolados ou em conjunto. Em bebês muito jovens, os sintomas podem ser irritabilidade, atividade reduzida e dificuldades respiratórias (Ghazaly & Nadel 2018). Nos casos mais graves, o HRSV pode causar quadros de bronquiolite e pneumonia, sendo estas as consequências mais comuns em crianças menores de 1 ano de idade. Além disso, a formação de sincícios e a presença de secreção excessiva de muco representam as principais marcas da infecção por HRSV (Glezen et al. 1986).

A bronquiolite é uma infecção comum do trato respiratório inferior em bebês e o HRSV é a causa mais comum (Smith et al. 2017). A maioria das crianças se recupera sem intercorrências, embora a doença pulmonar crônica subjacente, anomalias congênitas, estado de imunocomprometimento e cardiopatia hemodinamicamente significativa em pacientes com bronquiolite estejam associados à progressão para doença grave ou mortalidade (Ralston et al. 2014).

Nas crianças, os únicos fatores de risco relatados para hospitalização por infecção por HRSV são prematuridade e pouca idade e uma das principais razões pelas quais isso ocorre é a alta proporção entre a área de superfície e o

volume das vias aéreas que ainda estão em desenvolvimento, além de que quando comparado ao trato respiratório de adultos, os bronquíolos de bebês e crianças são relativamente menores e, portanto, mais sujeitos a obstruções (Griffiths et al. 2017).

Outro grupo bastante afetado pelo HRSV são os idosos. De acordo com Falsey et al. (2014), este vírus foi a terceira maior causa de infecções respiratórias em idosos, depois de Enterovírus e Influenza, e a segunda maior causa de hospitalização, onde os pacientes idosos diagnosticados com HRSV apresentaram duas vezes mais probabilidade de serem hospitalizados do que os pacientes positivos para os outros vírus respiratórios.

No cenário atual, com a pandemia de COVID-19, é difícil não fazer comparações entre as doenças respiratórias, como ao HRSV e o SARS-CoV-2, porque ambos os vírus afetam desproporcionalmente os adultos mais velhos, dificultando o diagnóstico somente com a clínica (Falsey & Walsh 2020). No entanto, existem diferenças na patogênese das doenças provocadas por estes vírus. Na infecção por HRSV, a congestão nasal e os sintomas respiratórios superiores são comuns, podendo progredir para tosse produtiva, dispneia, sibilância e a febre não é uma característica comum, diferindo da infecção por Influenza e pelo SARS-CoV-2 por exemplo (Tseng et al. 2020).

Apesar de afetar milhões de pessoas por ano, ainda não existe um medicamento específico para tratar a infecção pelo HRSV. O padrão para o tratamento em adultos é principalmente limitado a cuidados de suporte com o uso de broncodilatadores, oxigênio suplementar, líquido intravenoso e antipiréticos (Borchers et al. 2013). Em pacientes com risco de infecção aguda pelo HRSV recomenda-se a utilização do Palivizumabe, um anticorpo monoclonal para imunoprofilaxia, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1998 (IMPact-RSV Study Group 1998). Para tratamento, a Ribavirina, um fármaco utilizado no tratamento de infecções causadas por diversos vírus respiratórios pode ser indicada, entretanto, o seu uso em recém-nascidos e crianças hospitalizadas deve ser realizado com prudência devido seus efeitos colaterais (Chidgey & Broadley 2005).

O palivizumabe é um anticorpo monoclonal composto de 95% de aminoácidos humanos e 5% murinos, que se liga a glicoproteína F bloqueando a ligação e absorção pelos receptores celulares do hospedeiro, inibindo a

replicação e a propagação do HRSV (Johnson et al. 1997, Subramanian et al. 1998). No Brasil, passou a ser utilizado no estado de São Paulo em 2007, e em 2014 a ser disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (Lima et al. 2020)

O alto custo do palivizumabe geralmente limita seu uso apenas em crianças de “alto risco”, incluindo bebês nascidos prematuramente, aqueles com doença cardíaca congênita (CHD) ou doença pulmonar crônica (CLD) (Subramanian et al. 1998).

O único medicamento licenciado para o tratamento da infecção por HRSV é a Ribavirina em aerossol, um agente antiviral de amplo espectro aprovado pelo FDA, utilizado em pacientes com maior risco de evolução para doença grave, atuando na inibição da replicação viral, inibindo a síntese de proteínas virais estruturais (Conrad et al. 1987, Borchers et al. 2013). As diretrizes da Academia Americana de Pediatria (AAP) não recomendam seu uso de forma rotineira devido às inseguranças quanto à sua eficácia, seus possíveis efeitos colaterais e ao seu alto custo (Jartti et al. 2009).

O HRSV possui alguns desafios para o desenvolvimento de vacinas, como a possibilidade de reinfeção ao longo da vida pois a imunização não é completa e duradoura (Hall et al. 1991). No entanto, infecções repetidas estão associadas à diminuição do risco de infecções do trato respiratório inferior, mesmo se a infecção secundária ocorrer no primeiro ano de vida (Ohuma et al. 2012).

A primeira tentativa de se obter uma vacina para HRSV foi feita utilizando o vírus inativado com formalina na década de 60, administrado em crianças pequenas em um esquema de três doses, baseado em testes com vacinas para outros vírus. Infelizmente, apesar de ser imunogênica, o experimento falhou e resultou em aumento das doenças respiratórias após infecção natural pelo vírus, na qual várias crianças vacinadas foram hospitalizadas e duas vieram a óbito (Kim et al. 1969).

Desde a descoberta do HRSV, diversos estudos são voltados para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz. Nos últimos anos, com o aumento da compreensão da biologia do HRSV e os avanços tecnológicos das pesquisas relativas às vacinas têm progredido significativamente, em 2020 encontram-se em testes clínicos cerca de dezenove vacinas e dois candidatos a anticorpos monoclonais de nova geração (Hirve et al. 2020).

Apesar das glicoproteínas F e G serem os principais alvos de anticorpos, a proteína F é o alvo no desenvolvimento de vacinas, uma vez que é mais conservada e apresentação de múltiplos epítomos neutralizantes em relação à G (Taleb et al. 2018)

Diferentes abordagens para a prevenção da doença por HRSV estão em estudos e os dois ensaios publicados mais promissores são: um sobre a vacinação materna (Madhi et al. 2020) e um sobre a imunização passiva de bebês com um anticorpo monoclonal de longa duração (Griffin et al. 2020). A justificativa para a vacinação materna é estimular a produção de IgG para o alvo do HRSV (proteína F), que pode então ser transferida através da placenta para os bebês e protegê-los contra doenças nos primeiros meses de vida, quando são mais vulneráveis a doenças graves e se tem a maior carga de óbitos (Madhi et al. 2020).

1.9 Vigilância de Vírus Respiratórios

Desde 1952 a OMS realiza a vigilância global de influenza com o projeto *WHO's Global Influenza Surveillance and Response System - GISRS*, cujo objetivo é identificar as cepas circulantes e fornecer informações para subsidiar as recomendações para a composição de vacinas, monitorar a epidemiologia da do vírus influenza globalmente e alertar para novas mutações e outros patógenos respiratórios (WHO 2017, Broor et al. 2020).

Diante da importância epidemiológica e o impacto que o VSRH causa e da eminência de se obter uma vacina contra esse vírus a OMS desenhou um projeto piloto para fortalecer a vigilância genômica do VSRH. Com o objetivo de aproveitar a estrutura já bem estabelecida do GISRS, em 2016 foi criado um projeto piloto de vigilância de VSRH com o objetivo de descrever melhor a situação epidemiológica, as variações sazonais, incidência em diferentes regiões geográficas e subsidiar informações que auxiliem no desenvolvimento de uma vacina. Quatorze países, que já eram membros do GISRS foram selecionados e convidados para o piloto em 2016, incluindo o Brasil. Em 2021, o projeto encontra-se em fase II, uma extensão de três anos (até outubro de 2021) e visa consolidar as suas realizações e se propõe a ampliar o monitoramento do VSRH (WHO 2017).

O Brasil conta com uma rede de vigilância sentinela de Síndrome Gripal (SG) e de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) desde 2000 (Barros et al. 2004). Em 2019, antes da pandemia de COVID-19, até a semana epidemiológica (SE) 49 foram coletadas 20.359 amostras no país, onde 86,4% (17.581/20.359) possuem resultados inseridos no sistema de informação e 25,8% (4.540/17.581) tiveram resultados positivos para vírus respiratório. Influenza é o mais predominante nas infecções com 52,1% dos casos (2.365/4.540) e 47,9% (2.175/4.540) para outros vírus, predominando o VSRH. As regiões Sudeste e Sul apresentaram maior circulação de HRSV, Influenza A (H1N1)-pdm09 e Influenza B, já as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste a maior circulação é de HRSV. Ao todo foram notificados 4.939 óbitos por SRAG, o que corresponde a 12,6% (4.939/39.190) do total de casos (Brasil 2019).

No boletim epidemiológico emitido pelo Ministério da Saúde do Brasil (2019) ressalta-se a necessidade de ações de fortalecimento na vigilância sentinela da SG nas regiões Norte e Nordeste do país, uma vez que melhorando

o número de unidades notificadoras e as atividades de vigilância será possível observar a sazonalidade e definir ações de prevenção e controle da Influenza e consequentemente outros vírus respiratórios.

Em 2019 foi observado logo nas primeiras semanas epidemiológicas uma antecipação da sazonalidade da circulação de Influenza A (H1N1) - pdm09 no estado do Amazonas (MS 2019). Entre as semanas epidemiológicas 1 a 25 de 2019, foram notificados 1.533 casos que atendem a definição de SRAG no estado. Destes, 38% (586/1.533) tiveram resultado positivo para vírus respiratórios, dos quais destaca-se: 68% (400/586) por RSV, 20% (120/586) por Influenza A(H1N1) - pdm09 e 12% (63/586) por outros vírus (HMPV, HAdV e PIV). Isto se deve ao período sazonal da gripe que na região Norte costuma acontecer no início do ano, com a intensificação das chuvas nos meses de dezembro a maio, entretanto o número de casos foi superior ao esperado (FVS/AM-RCP 2019).

Em dezembro de 2019 foram relatados casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome* - SARS) em pacientes com pneumonia em Wuhan, China (Zhou et al. 2020). Posteriormente, foi confirmado que se tratava de uma infecção por um novo coronavírus (SARS-CoV-2) (Wu et al. 2020).

A COVID-19 foi declarada pandemia em 11 de março de 2020 (WHO 2020a). No Brasil, o primeiro caso registrado foi notificado em 26 de fevereiro de 2020 (MS 2020) e em 15 de novembro de 2021 o país contabiliza aproximadamente 22 milhões de casos confirmados e 611.283 mil óbitos (<https://covid.saude.gov.br/>). No estado do Amazonas o primeiro caso foi confirmado em 13 de março de 2020 pela Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS/AM-RCP 2020).

Cabe ressaltar que o Amazonas apresenta particularidades quando comparado a outros estados brasileiros, como as condições geoclimáticas e o fluxo migratório internacional através de suas fronteiras, tornando ainda mais complexa a realidade epidemiológica da região. No ano de 2019 foi registrado o maior número de notificações de SRAG dos últimos cinco anos no estado, com aumento de 680% (FVS/AM-RCP, 2019). Chama-se atenção para o fato que, de acordo com os boletins epidemiológicos de 2019 e 2020, apenas uma pequena porcentagem dos casos de SG e de SRAG tiveram o agente etiológico

identificado. Dessa forma, este projeto visa contribuir com a epidemiologia molecular do RSV em um período imediatamente anterior à pandemia de COVID-19, com o intuito de auxiliar no conhecimento da circulação viral e na prevenção de futuros problemas de saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente o Vírus Sincicial Respiratório Humano que circulou no estado do Amazonas no ano de 2019.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os subgrupos de HRSV e genótipos em circulação no estado do Amazonas;
- Descrever mutações observadas ao longo do genoma;
- Inferir a origem das linhagens e introduções do HRSV em circulação no Amazonas;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras utilizadas no estudo

Em Manaus, a Fundação de Vigilância em Saúde (FVS/AM-RCP) realiza o monitoramento de casos de SG e SRAG em unidades hospitalares públicas e privadas, de atendimento pediátrico e adulto. As amostras clínicas (aspirado nasofaríngeo/nasal ou secreção de nasofaringe coletada por *swab*) de pacientes com SG ou SRAG cedidas para o estudo foram coletadas nas unidades sentinelas para vírus respiratórios do Estado. Como rotina, as amostras foram enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas – LACEN/AM onde são realizados testes para a identificação do agente etiológico, utilizando Imunofluorescência Indireta (*Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit (Chemicon International, Inc. Temecula, CA)*) e RT-PCR em tempo real. Após o diagnóstico, amostras positivas para HRSV foram cedidas ao grupo de virologia do Laboratório Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia – EDTA da Fiocruz Amazônia para análises genômicas complementares.

3.2 Critérios de inclusão

Amostras positivas para HRSV diagnosticadas pelo LACEN/AM foram selecionadas para sequenciamento tendo como critério o valor limite de ciclo (Ct), sendo escolhidas as que tiveram o Ct menor que 30, devido à dificuldade de sequenciamento de amostras com Ct superiores.

3.3 Aspectos éticos

O projeto possui termo de anuência aprovado pela FVS/AM-RCP (Processo Nº 01.02.017306.00002917.2019). Faz parte do projeto maior **“Vigilância genômica de vírus negligenciados, emergentes e/ou reemergentes na Amazônia: antecipando possíveis emergências sanitárias”** submetido ao Programa Inova Fiocruz. Edital de Geração de conhecimento. Aprovado no comitê de ética da Universidade do Estado Amazonas (CAAE: 25430719.6.0000.5016).

3.4 Coleta e diagnóstico das amostras pelo LACEN/AM

Como rotina do serviço de vigilância laboratorial de vírus respiratórios, as unidades de saúde realizam a coleta das amostras em tubos contendo 3 mL de

Meio de Transporte Viral (MTV) ou aspirado e enviado para o LACEN/AM. O material coletado é mantido sob refrigeração (2°C a 8°C) do transporte até o momento do processamento das amostras, conforme Avelino 2015. No LACEN/AM, a detecção dos agentes virais é realizada seguindo um protocolo de RT-PCR em tempo real desenvolvido pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (EUA) (WHO 2009a), onde são detectados os vírus Influenza (A e B), HAdV, HBoV, Enterovirus, HMPV, HRSV e PIV (1 a 4).

Após o diagnóstico, uma alíquota de no mínimo 250 µl das amostras positivas para HRSV e que atendem ao critério de seleção, foram disponibilizadas ao Laboratório de Virologia do ILMD – Fiocruz Amazônia e armazenada a -80°C até a sua utilização.

3.5 Extração do RNA (Ácido Ribonucleico) viral

O material genético viral (RNA) foi extraído a partir de 200 µL da amostra utilizando o Kit Biogene (Bioclin), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram tratadas com proteinase K, tampão de lise e etapas de lavagens com reagentes do próprio kit. Ao final do processo, foi obtido um eluído de 50 µL por amostra extraída, o qual foi armazenado em freezer -80°C até utilização em ensaios moleculares.

O controle positivo interno MS2, um bacteriófago de genoma RNA utilizado em uma titulação previamente conhecida, foi adicionado em todas as extrações.

3.6 RT-PCR em tempo real para identificação dos grupos A e B

Em um primeiro momento, todas as amostras foram submetidas a um ensaio RT-PCR em tempo real para identificação dos subgrupos aos quais pertenciam: HRSV-A ou B. As reações foram realizadas em placas de 96 poços com volume final de 10 µl, sendo 7,5 µl de mix e 2,5 µl de RNA. Para o preparo do mix de reação, foi utilizado *TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix* (Thermo Fisher cat: 4444434), sondas [0,1 µM] marcadas com fluorescência FAM e *primers* [0,3 µM] específicos. A reação de RT-PCR foi conduzida no termociclador *QuantStudio 5* (Thermo Fisher Scientific) da plataforma de PCR em tempo real do ILMD, utilizando uma ciclagem de: 50°C por 5 min; 95°C por 20 segundos; 45 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos.

3.7 Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA extraído, foi utilizada a enzima *SuperScript IV® (Invitrogen™)*, em uma reação com volume final de 20 µL, posteriormente otimizada para 12 µL. Em um microtubo de 0,2 mL, o RNA era adicionado juntamente com os iniciadores randômicos [10 mM] e em seguida levado ao termociclador (*Proflex PCR Systems, Applied Biosystems*) por 5 minutos à temperatura de 65°C para promover o desenovelamento do RNA e permitir a ligação dos iniciadores. Em seguida, imediatamente após retirar os tubos do termociclador, estes eram acondicionados em banho de gelo por dois minutos, seguido da adição do mix de reação, composto pelos seguintes reagentes: solução tampão 5X, DTT [0,1M], dNTP [10 mM], inibidor de RNase SUPERase [20U/µL], a enzima SSIV [200U/µL], e água ultrapura. Para a reação foram utilizadas as seguintes condições no termociclador: 25°C por 15 min, 37°C por 15 min, 45° por 15 min, 50° por 15 min, 70°C por 15 min e 4°C ∞.

3.8 Amplificação do gene G de HRSV A e B

Inicialmente, os cDNAs sintetizados foram submetidos a PCR tendo como alvo somente o gene G, utilizando oligonucleotídeos desenhados pelo nosso grupo de pesquisa (Tabela 3). A reação de PCR tinha um volume final de 25 µl, composta por Tampão 10X, MgCl₂ [50 mM], dNTPs [10 mM], Primer Mix [5 µM] e *Platinum Taq DNA Polymerase* [5U/ µl]. As condições utilizadas foram: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C para desnaturação inicial; seguidos de 35 ciclos a 94°C 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 min e 40 segundos; extensão final a 72°C por 7 min e 4°C ∞.

Tabela 3 – Descrição dos iniciadores utilizados para amplificação do gene G do VSRH A e B. Sequência, temperatura ideal e tamanho dos *amplicons*. F (*Forward*) e R (*Reverse*).

| INICIADORES | SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA | HRSV | °C | PB |
|-------------------|------------------------------|------|------|-------|
| HRSVA_SH_4328_FNF | TCATAATCTCCATCATGATTGCAA | A | 55°C | 1.434 |
| HRSVA_F_5761_FNR | TGATAAAATTCTTCAGTGATGTTTTGAC | | | |
| HRSVB_SH_4327_FNF | GAATTCACAAGCAAATTTTGGCC | B | 58°C | 1.446 |
| HRSVB_SH_5772_FNR | GTCGATTGGTAAAACCTCCTCAGT | | | |

*Iniciadores desenhados pelo grupo de pesquisa

3.9 Amplificação do genoma completo

Para a obtenção do genoma completo do HRSV, utilizamos um protocolo onde foram gerados quatro *amplicons* de aproximadamente 4Kb cada, sobrepostos, com conjuntos de iniciadores descritos por Di Giallonardo et al. (2018). A reação era composta por 1 µl do cDNA, master mix PCR *Platinum SuperFi II Green (ThermoFisher Scientific)*, uma enzima de alta fidelidade, e os iniciadores (Tabela 4).

Tabela 4 - Iniciadores utilizados na PCR convencional para amplificação do genoma completo de HRSV

| INICIADOR | SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA | AMPLICON | PB |
|--------------------|---------------------------|----------|-------|
| HRSV_SEG1_01F | ACGCGAAAAAATGCGTACTACAAAC | | |
| HRSV_SEG1_6F | AAAAAATGCGTACTACAAACTTGC | 1 | 4.017 |
| HRSV_SEG1_4017R | CGTGTAGCTGTRTGYTTCCAA | | |
| HRSV_SEG2_3905F | GGAGCATTCAAATAYATMAAGCC | 2 | 3.527 |
| HRSV_SEG2_7432R | TRCTTARTGTRACTGGTGTG | | |
| HRSV_SEG3_7215F | TGATGCATCAATATCTCAAGTCA | 3 | 3.950 |
| HRSV_SEG3_11165R | GRCCTATDCCTGCATACTC | | |
| HRSV_SEG4_10959F | TGGACCATWGAAGCYATATCA | | |
| HRSV_SEG4_15333R | AGTGTCAAAAATAATRTCTCGT | 4 | 4.374 |
| HRSV_SEG4_2_15344R | ACGAGAAAAAAGTGTCAAAACTAAT | | |

(Di Giallonardo et al. 2018)

3.10 Análise dos produtos amplificados

Cada *amplicon* foi visualizado como um fragmento de DNA único em eletroforese em gel de agarose a 1% (80V por 1h) utilizando corado com *GelRed* (*Biotium, Hayward, CA, EUA*). Para confirmar a amplificação do produto no tamanho esperado foi utilizado o padrão de peso molecular *High Range DNA Ladder* (*FastRuler*) de 10.000 pares de base (pb).

3.11 Purificação dos produtos de PCR com Polietilenoglicol (PEG)

Os produtos amplificados foram purificados por precipitação com Polietilenoglicol (PEG) 8000 (*Promega*), cujo objetivo é a remoção de nucleotídeos e iniciadores não incorporados na PCR que podem vir a interferir na reação de sequenciamento, utilizando o protocolo de Humphreys et al. (1975) adaptado pelo nosso grupo de pesquisa.

Em um microtubo de 1,5mL, foi preparada uma proporção 1:1 entre o produto de PCR e PEG (20%), seguida de uma incubação a 37°C por 15 minutos em termobloco. Posteriormente, era realizada uma centrifugação a 2.500 RCF por 15 min a temperatura ambiente e ao final descartava-se o sobrenadante por inversão. Na etapa seguinte, uma lavagem era realizada adicionando-se 125 µL de etanol 80% gelado e uma nova centrifugação a 1450 RCF por 3 min. Novamente o sobrenadante descartava-se o sobrenadante por inversão e o microtubo era levado para secagem a 37°C por 15 min no *Speed-Vac* para a remoção dos resíduos de etanol. Por fim, o DNA era ressuscitado em 10 µl de água livre de nucleases e era armazenado a -20°C *overnight*.

Após a etapa de purificação, os produtos eram quantificados em ng/µL usando o fluorímetro Qubit 2.0 e o kit de ensaio dsDNA HS (*Thermo Fisher Scientific*).

3.12 Sequenciamento do gene G

As amostras purificadas foram submetidas ao sequenciamento capilar tomando como base o método de dideoxinucleotídeos (Sanger et al. 1977), utilizando os iniciadores apresentados na tabela 2. As reações de sequenciamento foram conduzidas em placa utilizando um mix de reação com volume final de 10 µL contendo 2 µL de solução tampão (5X), 1 µL do iniciador (3,2 µM), 0,3 µL de *BigDye* (2,5X), volume de amostra de acordo com a

concentração ideal para o tamanho de cada fragmento (aproximadamente 20 ng) e água livre de nucleases. Em seguida a placa foi levada ao termociclador *Veriti* (*Applied Biosystems*) sob as seguintes condições: 96°C por 1min; 96°C por 10s, 55°C por 15s, 60°C por 2min (20x); 96°C por 2min, 55°C por 15s, 60°C por 3min (10x); 4°C ∞. Para a reação de sequenciamento foram incluídos outros *primers* descritos na tabela 5 desenhados pelo grupo.

Tabela 5 – Descrição dos iniciadores adicionados na reação de sequenciamento para HRSV A e B

| INICIADORES | SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA 5'-3' | HRSV |
|------------------|------------------------------|--------|
| HRSVA_G_4736_FNF | TGGGACACTCTCAATCATYTATTATT | HRSV-A |
| HRSVA_G_4761_FNR | AATAATARATGATTGAGAGTGCCCA | |
| HRSVB_G_4836_FNF | AATCTCAACCTCTCTCATAATTGC | HRSV-B |
| HRSVB_G_4859_FNR | GCAATTATGAGAGAGGTTGAGATT | |

Após a reação de sequenciamento os produtos gerados foram purificados utilizando o protocolo EtOH/EDTA/Acetato de sódio, disponível na bula do Bigdye v3.1 (*Applied Biosystem*). Em resumo, após a retirada da placa do termociclador ou congelador foi feita uma centrifugação a 2000g por 1 min. Posteriormente adicionado 5 µL da solução de EDTA 125mM + acetato de sódio a 3M (pH 5,2). Em seguida foi adicionado 25 µL de EtOH 100%, e a placa foi selada e invertida por 4 vezes.

A placa foi então incubada por 15 min a temperatura ambiente seguida de duas etapas de centrifugação, uma a 2.000g por 45 minutos a 4°C e outra a 180g por 1 minuto, com descarte do sobrenadante após cada etapa. Posteriormente, foi adicionado 35 µL de EtOH a 70% em cada poço da placa, seguido de centrifugação a 1.650g por 15 min a 4 °C. O líquido da placa foi descartado novamente por inversão e mais uma centrifugação por 1 min, seguida de incubação à 60°C por 15 min no termociclador.

Por fim, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida Hi-Di e a placa aquecida a 95°C por 1 minuto foi montada e levada ao sequenciador ABI 3130 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) instalado na plataforma de sequenciamento capilar do ILMD – Fiocruz Amazonas.

3.13 Sequenciamento do genoma completo por NGS

Os *amplicons* de cada amostra foram normalizados e agrupados. As bibliotecas foram construídas usando o *Nextera DNA Flex Library Prep* e sequenciadas com *MiSeq Reagent Micro Kit v2* (500 ciclos), seguindo os protocolos do fabricante. O sequenciamento de nucleotídeos foi realizado na plataforma *MiSeq* (*Illumina, San Diego, CA, EUA*), instalada no ILMD, em uma execução pareada (2x150 ciclos).

3.14 Montagem das sequências

As leituras no formato FASTQ foram geradas pelo pipeline da Illumina no *BaseSpace* (<https://basespace.illumina.com>). Todos os arquivos foram baixados e importados para o Geneious v10.2.6 para a montagem do *contig* de cada amostra e utilizadas algumas ferramentas embutidas como BBDuk e BBDuk (v37.25). Em síntese, as sequências foram aparadas, removendo as extremidades que apresentaram baixa qualidade para evitar qualquer viés, assim como as regiões de ligação dos iniciadores. As sequências foram montadas inicialmente utilizando as sequências de referência disponíveis no *GenBank* NC_038235 para HRSV-A e NC_001781 para HRSV-B e depois com as sequências MW160824 para A e KF826822 para B.

3.15 Análises das sequências e filogenia

Para o estabelecimento de relações filogenéticas entre as sequências de HRSV encontradas neste estudo e de outras localidades, montamos bancos de sequências de genomas completos e do G (mínimo 700 pb) de HRSV-A e HRSV-B separados, obtidas do *GenBank*. Renomeamos as sequências para melhor visualização das árvores da seguinte maneira: Número de acesso no *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), país de origem e data de isolamento/coleta. Para os genomas completos foram removidas todas as regiões intergênicas e as regiões codificantes (CDS) foram concatenadas antes do alinhamento. As sequências foram alinhadas usando MAFFT v.7.475 (Kato & Standley 2013).

Para a definição dos genótipos, baseamos as análises no gene G, utilizando sequências HRSV - A e B que continham preferencialmente o G completo (aproximadamente 900pb). As sequências de referência dos genótipos

que foram utilizadas seguem conforme descrito por Muñoz-Escalante e Vianna et al. 2021. O conjunto de dados final consistiu em 229 sequências de genomas de HRSV-A com comprimento de 15.062 nt, e 398 de HRSV-B, com comprimento de 15.033 nt, que continham as CDS completas.

Para a colocarmos nossas sequências em um contexto global, foram baixadas todas as sequências de genoma completo (CDS) de HRSV- A e B que estavam disponíveis no *GenBank* até maio de 2021 que continham as informações de data e localização (país). Foram excluídas aquelas que continham múltiplas bases não identificadas (>1% de Ns) nas sequências finais, assim como sequências outliers encontradas com o auxílio do programa TempEst 1.5.3.

Utilizando o software IQ-TREE multicore version 2.1.1 COVID-edition, plotamos um gráfico de “*Likelihood mapping analysis*”, para verificar se o conjunto de dados teria sinal filogenético suficiente para as análises. Árvores de máxima verossimilhança (MV) foram então estimadas para ambos os alinhamentos HRSV-A e HRSV-B usando o IQ-TREE, sob o modelo de substituição de nucleotídeo GTR + F+ R2 de acordo com *Bayesian Information Criterion (BIC)* escolhido pelo *ModelFinder*. Geramos também uma árvore filogenética de MV calibrada pelo tempo usando a ferramenta *Timetree* embutida no IQ-TREE (Nguyen et al. 2015).

Para determinar se os dados possuem estrutura temporal, uma regressão da “raiz-a-ponta” da distância genética em relação ao tempo foi realizada usando TempEst v.1.5.3 utilizando as árvores de MV separadas para HRSV-A e HRSV-B.

Estimamos a taxa evolutiva nos conjuntos de dados para o HRSV-A e o HRSV-B; o tMRCA dos clados amazônicos e a origem mais provável (país) através de análise fitogeográfica discreta por Inferência Bayesiana (BI) no programa BEAST 1.10.4 (Suchard et al. 2018). Dois arquivos foram utilizados como *input*, um arquivo de alinhamento em formato nexus e um arquivo texto (*traits*) com os *táxons* e os seus respectivos países. Adotamos um modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G e para os dados discretos um modelo de substituição simétrica com inferência de redes sociais BSSVS. O modelo de relógio molecular estrito foi utilizado com base na análise do TempEst e no artigo de Di Giallonardo et al. (2018) e um modelo de coalescência de tamanho

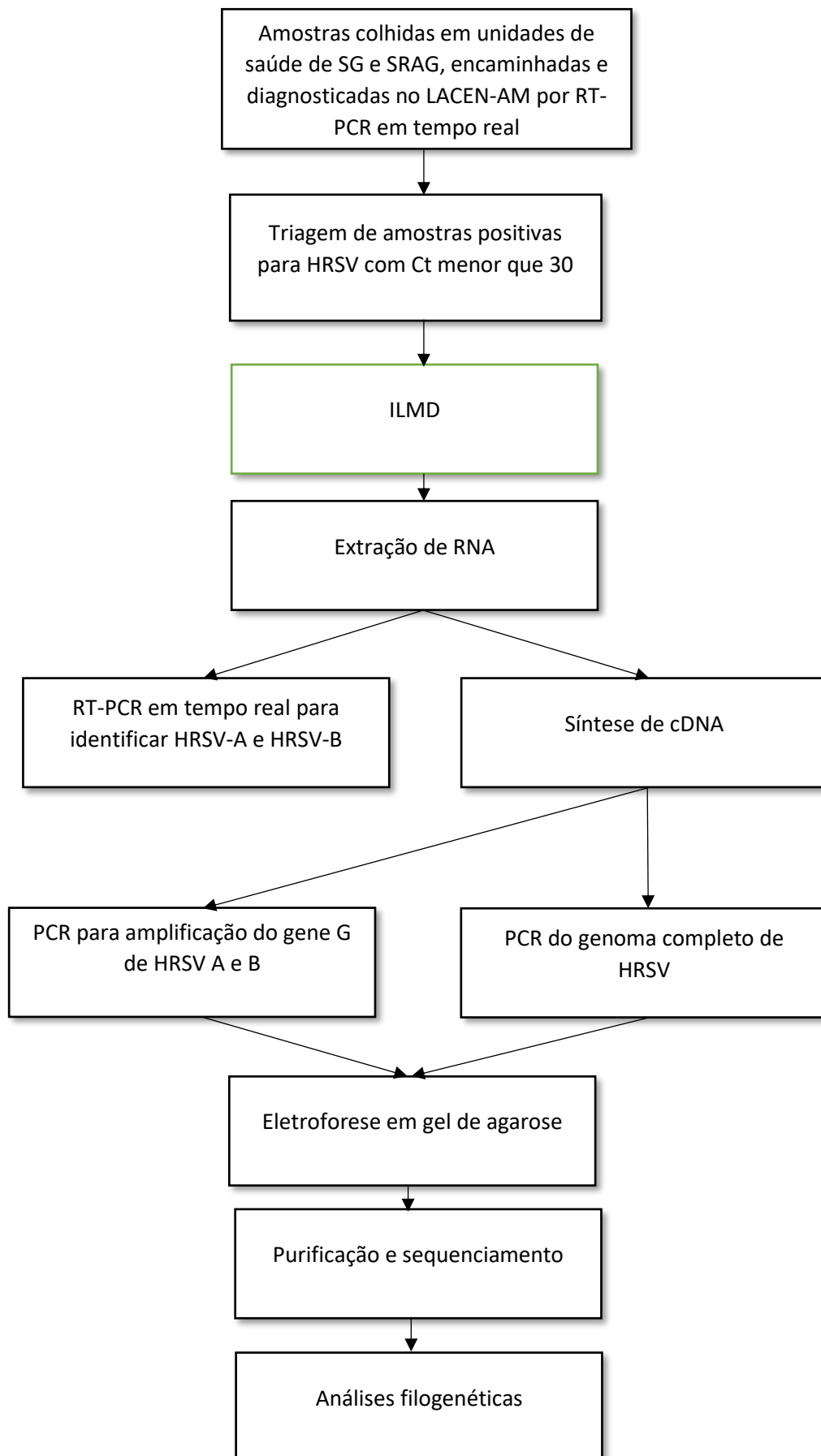
constante. Foram utilizados os valores *default* para os *priors* e operadores auto otimizados. Por fim, os parâmetros de corrida foram programados para 50 milhões de passos, com uma amostragem a cada 5000 passos de maneira a armazenar os dados de 10000 árvores filogenéticas.

A convergência das variáveis de interesse ($ESS > 200$) foi avaliada no programa Tracer v.1.7.1 (Rambaut et al. 2018), após um *burn-in* de 10%, assim como os valores de taxa de evolução e tMRCA.

Uma árvore de Máxima Credibilidade de Clados (MCC) foi gerada para cada conjunto (HRSV-A e HRSV-B) com a ferramenta TreeAnnotator V.1.10.4 após *burn-in* de 10% das árvores com uma anotação de limite mínimo de probabilidade posterior de 0.5.

Todas as árvores filogenéticas criadas nas análises de MV e BI foram editadas com o auxílio do programa FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) enraizando em um ponto central (*midpoint root*) e organizando os nós em ordem crescente. Os valores de aLRT e UltraFast Bootstrap (MV) e probabilidade posterior (BI) são mostrados para os clados principais.

3.16 Fluxograma da metodologia



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram triadas 57 amostras positivas para HRSV diagnosticadas por RT-PCR em tempo real no LACEN-AM nos anos de 2019, 2020 e 2021, que estavam dentro do nosso critério de seleção, com Ct menor que 30 visando o sequenciamento genético. Ao total, 17 amostras referentes somente ao ano de 2019 foram sequenciadas e utilizadas para as análises filogenéticas.

Inicialmente, o projeto tinha como objetivo caracterizar geneticamente outros vírus respiratórios concomitante ao HRSV, como FLU, HAdV e HMPV. Com isso, amostras destes vírus também foram selecionadas (Tabela 6), mas não foram incluídas ao final deste trabalho em decorrência dos esforços voltados totalmente para resposta à pandemia de COVID-19 no estado, uma vez que nosso laboratório é um dos três oficiais da rede de vigilância de SARS-CoV-2 no Amazonas.

Tabela 6 – Amostras de Vírus Respiratórios obtidas ao longo dos anos de 2019 a 2021

| | Influenza A | Influenza B | HRSV | Adenovírus | Metapneumovirus |
|--------------|--------------------|--------------------|-------------|-------------------|------------------------|
| 2019 | 47 | 21 | 36 | 2 | 10 |
| 2020 | 8 | 23 | 10 | 4 | 0 |
| 2021 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 |
| Total | 55 | 44 | 57 | 6 | 10 |

4.1 Identificação dos subgrupos de HRSV (A e B)

Após a extração de ácidos nucleicos, as amostras de HRSV foram submetidas ao ensaio de RT-PCR em tempo real para a identificação dos subgrupos (A ou B), onde foi observada uma diferença de circulação ao longo dos três anos (Figuras 9 e 10). Entretanto, deve-se levar em consideração a baixa amostragem nos anos de 2020 e 2021 devido os esforços terem sido destinados majoritariamente ao diagnóstico de SARS-CoV-2, comprometendo a identificação de outros vírus respiratórios e conseqüentemente a triagem de mais amostras para este estudo.

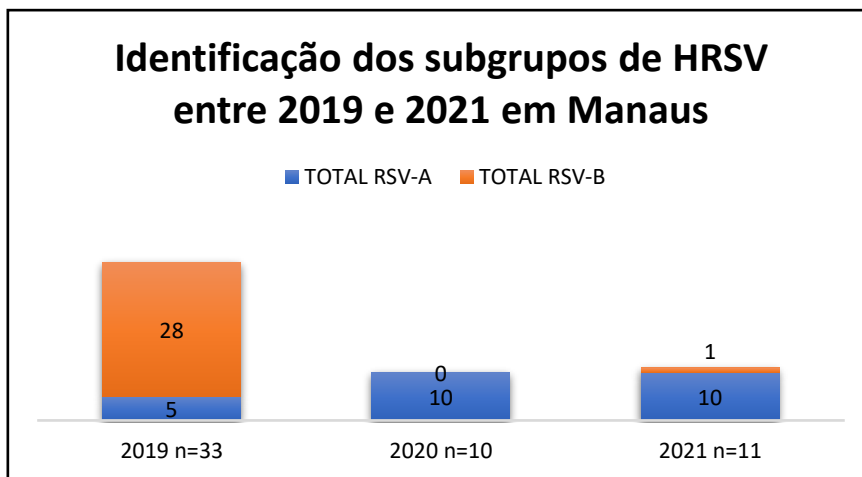


Figura 7 – Representação do total de amostras caracterizadas como HRSV A e B nos anos de 2019, 2020 e 2021 provenientes do estado do Amazonas. Em azul: HRSV- A e laranja HRSV-B.

Nesse ensaio 3 (8,3%) amostras do ano de 2019 não foram positivas para nenhum dos dois grupos de RSV na RT-PCR e não tiveram amplificação na PCR convencional. Cinco (13,8%) correspondiam a HRSV-A e 28 a HRSV-B (77,7%). Diferente de 2019, as mostras de HRSV referentes a 2020 e 2021 pertenciam quase em sua totalidade ao grupo A (20/21).

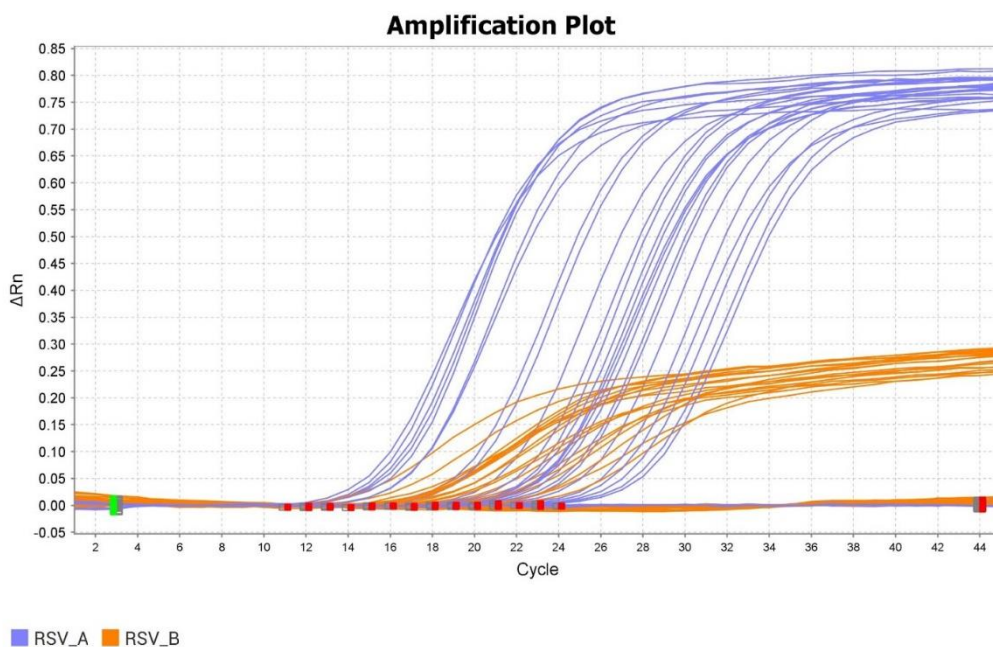


Figura 8 – Identificação dos subgrupos de HRSV nas amostras incluídas no estudo por RT-PCR em tempo real. Curvas de amplificação de HRSV A e B em escala linear diferenciando os dois grupos.

Na América do Sul, o HRSV está entre os vírus respiratórios mais comuns detectados em indivíduos que apresentam infecções agudas do trato respiratório, e é uma das principais causas de infecção infantil, onde a pneumonia, bronquiolite e sibilância são característicos (Suryadevara & Domachowske 2021). No Brasil, as doenças respiratórias são responsáveis por aproximadamente 22% de todas as mortes entre crianças de 1 a 4 anos, sendo a principal causa de óbito para esta faixa etária, predominando a infecção por HRSV (Passos et al. 2019).

O HRSV pode ser classificado em dois subgrupos: HRSV-A e HRSV-B e os dois subgrupos podem circular separadamente ou simultaneamente durante epidemias, variando de acordo com a região e ano (Anderson et al. 1985, Johnson et al. 1987). Alguns autores apontaram que o HRSV-A é mais virulento que o HRSV-B, enquanto outros estudos não encontraram diferenças significativas entre eles (Papadopoulos et al. 2004, Laham et al. 2017).

Vianna et al. (2021) investigou durante o período de 2016 a 2018 a prevalência de HRSV em crianças de até 3 anos com infecção respiratória aguda grave no Espírito Santo, Brasil. Neste, as crianças infectadas com HRSV-A apresentaram maior gravidade clínica, permaneceram mais tempo no hospital e necessitaram de cuidados intensivos quando comparadas as crianças infectadas pelo HRSV-B.

Em nosso estudo, foi observada a co-circulação de HRSV-A e HRSV-B no ano de 2019, sendo o grupo B o mais encontrado (28/33). Embora o HRSV-A seja mais frequentemente detectado do que o RSV-B, alguns estudos mostram a predominância de HRSV-B em certos surtos (Martínez et al. 1999).

Por outro lado, nos anos de 2020 e 2021, apesar do número de amostras baixo, o HRSV-A predominou sobre o grupo B em quase 100%, onde 20 das 21 amostras detectadas foram do grupo A.

São descritos diferentes padrões de circulação de HRSV na literatura, onde a cada um ou dois anos de domínio do grupo A tem um ano de domínio de B (Hall et al. 1990). Um estudo realizado durante 10 anos na Finlândia mostrou a ocorrência cíclica do vírus e que a cada dois anos a prevalência alterna entre A e B (Waris 1991).

4.2 Padronização da PCR convencional para o sequenciamento do gene G

Para o sequenciamento do gene da proteína G de HRSV, realizamos testes de padronização de um protocolo com *primers* desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, no qual foram observados os melhores resultados quando utilizada a temperatura de hibridização de 55°C para HRSV-A e 58°C para HRSV-B (Figura 11).

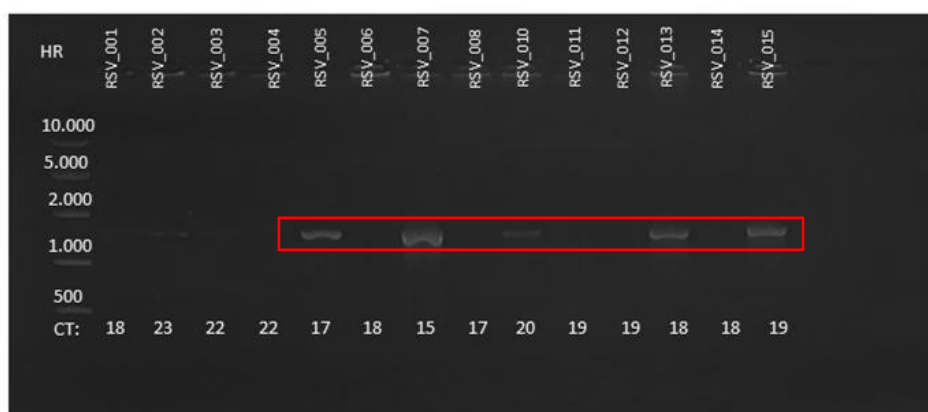


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto de PCR do gene G de HRSV-B. Padronização da temperatura ideal. Era esperado a visualização de bandas de 1.446pb. HR: *High Range*, marcador de 10.000kb.

Com esse protocolo, 1 amostra de HRSV-A (VR_006) amplificou o gene G e seguiu para sequenciamento pelo método de Sanger e 5 amostras de HRSV-B (VR_005; VR_007; VR_010; VR_013 e VR_015), todas referentes a 2019.

Com uma análise inicial, realizamos uma busca em bancos de dados públicos de sequências usando o pacote de programas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), sob condições *default* (i.e., megablast) (Zhang et al. 2000, Morgulis et al. 2008). Identificamos que a sequência de HRSV-A nomeada de VR_006 agrupava com outras do genótipo ON1, contendo a duplicação de 72 nucleotídeos característica ao final do gene G e as amostras de HRSV-B agruparam à outras sequências pertencentes ao genótipo BA, com a duplicação de 60 nt no G.

4.3 Padronização da PCR convencional para o sequenciamento do genoma completo de HRSV

Inicialmente, nosso objetivo era sequenciar somente o gene G, alvo mais utilizado para genotipagem do HRSV, porém com a chegada do *MiSeq* (Illumina, San Diego, CA, EUA) no ILMD nos propomos a fazer o sequenciamento do

genoma completo para aumentar a robustez de nossos dados e contribuir globalmente com mais genomas brasileiros do HRSV, uma vez que existem até o momento apenas 5 genomas do Brasil (números de acesso MG431251.1 - MG431255.1) publicados nos bancos de dados mundiais.

Portanto, para a amplificação do genoma completo do HRSV otimizamos um protocolo de PCR convencional já descrito na literatura (Di Giallonardo et al. 2018). Avaliamos as temperaturas de: 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C e 62°C, com os iniciadores descritos na tabela 4, e amostras previamente identificadas como pertencentes aos grupos HRSV-A e HRSV-B. Foram observados os melhores resultados quando utilizada a temperatura de hibridização a 54°C para os *amplicons* 1, 3 e 4, e a 52°C para o *amplicon* 2 (Figura 12).

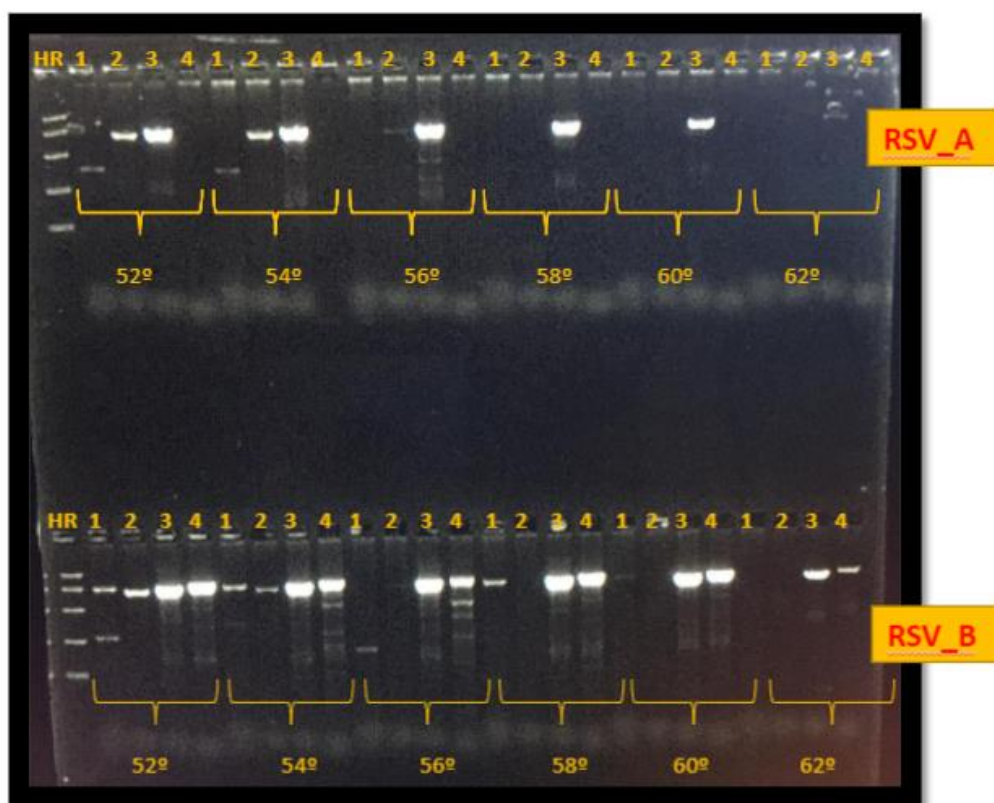


Figura 10 - Padronização de temperaturas para PCR do genoma completo de HRSV. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Teste de padronização de temperaturas para amplificação do genoma completo do HRSV. Cada poço nomeado de 1-4 corresponde ao *amplicon* (1, 2, 3 e 4) alterando a temperatura. HR - *Ladder* 10.000 pb (High Range).

Mesmo após tentativas de reextração e reamplificação, não obtivemos o resultado esperado na PCR das amostras referentes aos anos de 2020 e 2021 e conseqüentemente não seguiram para o sequenciamento. As condições de

manipulação e armazenamento antes da chegada destas amostras ao ILMD podem ter influenciado neste resultado.

Portanto, ao total, somente 17 amostras referentes a 2019 tiveram o resultado esperado na PCR, onde amplificaram os quatro *amplicons* e seguiram para o sequenciamento genético. As demais amostras de 2019 e as de 2020 e 2021 não amplificaram nenhum fragmento ou tiveram pelo menos um ou dois fragmentos sem amplificação, impossibilitando-nos de utilizá-las para sequenciar o genoma completo. Dessa maneira, todas as nossas demais análises se basearam somente nas amostras de 2019 sequenciadas.

4.4 Sequenciamento do genoma completo do HRSV por NGS

Dentre as amostras sequenciadas, quinze pertenciam ao HRSV-B e apenas duas ao HRSV-A (Tabela 7). Desse total, 13 (73%) amostras eram de crianças de menos de dois anos de idade, e foram coletadas no período sazonal do HRSV e outros vírus respiratórios no Amazonas, entre os primeiros meses do ano correspondente ao período chuvoso da região.

Tabela 7 – Descrição dos dados das amostras de HRSV 2019 sequenciadas.

| ID AMOSTRA | GEN. | IDADE | UNID. | SE | Ct | RSV |
|-----------------------------------|------|-------|-------|----|----|-----|
| VR018_BR_AM_Manauas 2019-02-21 | M | 1 | ano | 8 | 19 | B |
| VR029_BR_AM_Manacapuru 2019-04-09 | M | 12 | ano | 15 | 17 | B |
| VR024_BR_AM_Manauas 2019-04-11 | NI | 19 | dia | 15 | 18 | B |
| VR022_BR_AM_Manauas 2019-04-12 | F | 1 | mês | 15 | 19 | B |
| VR023_BR_AM_Iranduba 2019-04-12 | M | 1 | mês | 15 | 20 | B |
| VR026_BR_AM_Manauas 2019-04-16 | F | 4 | ano | 16 | 18 | B |
| VR027_BR_AM_Manauas 2019-04-16 | NI | 15 | dia | 16 | 17 | B |
| VR007_BR_AM_Manauas 2019-04-22 | F | 3 | mês | 17 | 15 | B |
| VR028_BR_AM_Manauas 2019-04-24 | M | 1 | ano | 17 | 17 | B |
| VR030_BR_AM_Manauas 2019-04-25 | NI | 1 | mês | 17 | 19 | B |
| VR002_BR_AM_Manauas 2019-05-08 | M | 10 | ano | 20 | 23 | B |
| VR020_BR_AM_Manauas 2019-05-08 | F | 10 | mês | 20 | 18 | A |
| VR016_BR_AM_Manauas 2019-05-09 | M | 5 | mês | 20 | 17 | B |
| VR019_BR_AM_Manauas 2019-05-10 | NI | 25 | dia | 20 | 19 | B |
| VR013_BR_AM_Manauas 2019-05-15 | M | 1 | mês | 21 | 18 | B |
| VR005_BR_AM_Manauas 2019-05-31 | F | 1 | mês | 23 | 17 | B |
| VR006_BR_AM_Manauas 2019-04-20 | NI | NI | NI | 17 | 18 | A |

NI: Não informado; Gênero, idade, Semana Epidemiológica (SE) correspondente à coleta do material, Ct e subgrupo do HRSV identificado.

A frequência de HRSV, bem como dos outros vírus respiratórios é claramente influenciada por um padrão sazonal que pode variar de acordo com a localização geográfica e as condições climáticas de cada país (Gurgel et al. 2016). Em países de clima temperado, a circulação de vírus respiratórios intensifica no período de inverno, enquanto em países de climas equatorial e tropical, a circulação é maior durante a estação chuvosa (Obando-pacheco et al. 2018).

No estudo realizado por Hervás et al. (2012), na Espanha, foi observado que os padrões anuais de hospitalização por HRSV estavam fortemente associados às condições meteorológicas, onde a pressão atmosférica e a temperatura média foram os principais fatores relacionados com aumento e diminuição de casos.

Pesquisas voltadas à epidemiologia e sazonalidade dos vírus respiratórios no Brasil têm sugerido um padrão sazonal para infecções por HRSV com predomínio de março a julho, correspondendo aos meses de inverno ou temporadas de chuvas, e menor número de casos nos meses de verão, principalmente de novembro a fevereiro (Vieira et al. 2001). Entretanto, como o Brasil é um país continental com cinco regiões geográficas diferentes entre si, a sazonalidade pode variar de acordo com cada região, havendo relatos da circulação do vírus em meses diferentes do período sazonal clássico (Pecchini et al. 2008).

No ano de 2019 foi registrado o maior número de notificações de SRAG dos últimos anos no estado Amazonas, com aumento de 680% quando comparado ao ano de 2018. Chama a atenção para o fato que, de acordo com os boletins epidemiológicos de 2019 e no período anterior à pandemia de COVID-19 em 2020, apenas uma pequena porcentagem dos casos de SG e de SRAG tiveram o agente etiológico identificado e o HRSV foi dominante, identificado em 36,8% dos casos de SG e 59,8% dos casos de SRAG no estado, com circulação da SE 1 a 27.

As amostras obtidas em nosso estudo estão dentro do período sazonal descrito, sendo influenciado pelo período chuvoso. Corroborando com nossos dados, Freitas & Donalisio (2016) descrevem o pico de sazonalidade do HRSV na região Norte no mês de abril no período de 2005 a 2014, em um estudo onde as cinco regiões do país são analisadas para descrever a sazonalidade do vírus.

Em um estudo de coorte retrospectivo (abril de 2017 a agosto de 2018), de crianças internadas em hospitais de Manaus que apresentavam sintomas associados a infecções respiratórias agudas inferiores, mostrou-se que a maior incidência de casos ocorreu no período chuvoso e que o HRSV foi o vírus detectado em maior frequência, seguido por MPV, Influenza e outros. A codetecção do HRSV com outros vírus, como Influenza A e B e parainfluenza, foi relatada em 9 pacientes (Sobrinho et al. 2021).

Dentre as amostras sequenciadas, 14 pertenciam à capital do Amazonas, Manaus, e duas à municípios vizinhos (Iranduba e Manacapuru). De acordo com dados da FVS/AM-RCP (2019), em 2019 foram confirmados 388 casos de HRSV em Manaus, 6 no Iranduba e 9 em Manacapuru, destacando-se a maior ocorrência em crianças, principalmente em menores de 1 ano e entre 1 e 4 anos.

4.5 Montagem do genoma

Em uma primeira montagem do *contig* de cada amostra obtida no sequenciamento por NGS, utilizamos as sequências de referência para HRSV-A (NC_038235) e HRSV-B (NC_001781) disponíveis no GenBank com o auxílio do programa Geneious versão 10.2.2, e percebemos que em nossas sequências de consenso não havia as regiões duplicadas características dos genótipos que identificamos quando foi realizado o sequenciamento por Sanger, uma vez que as amostras VR_006 (HRSV A) e VR_007 (HRSV B) foram sequenciadas por ambos os métodos (Figura 13).

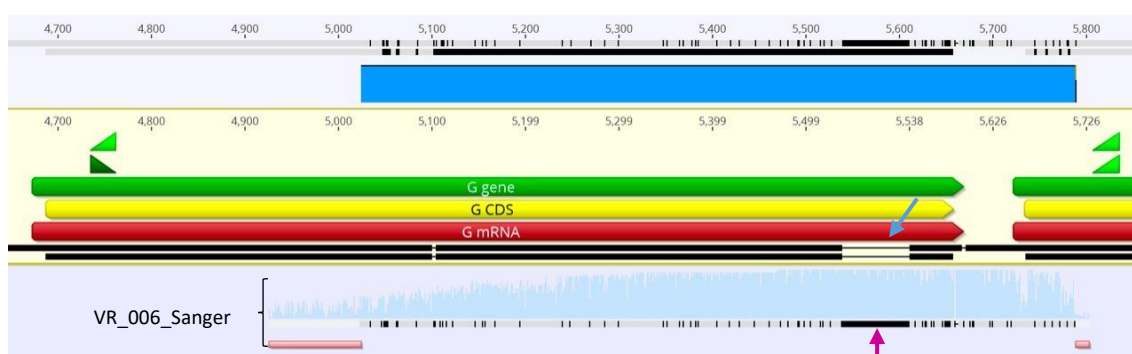


Figura 11 – Comparação entre a RefSeq de HRSV-A (NC_038235.1) com o fragmento da amostra VR_006 obtido por sequenciamento capilar. A seta em roxo mostra a região de 72 nt duplicada de VR_006 e a seta em azul mostra o gap na sequência de referência.

Dessa forma, fizemos uma nova montagem dos genomas utilizando a sequência de maior similaridade encontrada no *blastn*, para ambos os subgrupos de RSV (Figura 14), sendo HRSV-A (MW160824.1 – Austrália 2017) e HRSV-B (KF826822), onde obtivemos as sequências com as inserções. As sequências consenso finais tinham de 15.213 – 15.216 bp e cerca de 33,7% de conteúdo GC.

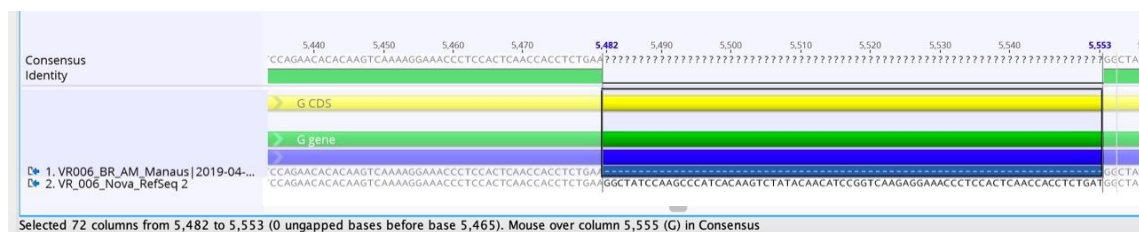


Figura 12 – Comparação entre a primeira montagem do genoma utilizando a RefSeq do GenBank para HRSV-A (sem a duplicação) versus a segunda montagem utilizando a sequência de referência de maior similaridade MW160824 (com a duplicação).

4.6 Genotipagem e análises filogenéticas e filogeográficas de HRSV-A e HRSV-B

A definição dos genótipos do HRSV é frequentemente realizada com base no alinhamento dos 270 nucleotídeos da segunda região variável do gene que codifica a proteína G ou o G completo (Mufson et al. 1985). Sendo assim, organizamos um conjunto de dados para HRSV-A e HRSV-B com as sequências de referência para cada genótipo que tivessem preferencialmente o G completo ou quase completo (mínimo 700 pb) e realizamos o alinhamento e subsequentes análises filogenéticas.

Foi então identificado que as duas amostras de HRSV-A (100%) sequenciadas pertenciam ao genótipo ON1 e todas as amostras de HRSV-B pertenciam ao genótipo BA9 (100%), com a inserção de 60 nt (Figuras 15 e 16). Essa é a primeira vez que o genótipo ON1 é identificado circulando no Amazonas.

Em 2018, Santos e colaboradores apresentaram dados a respeito da circulação do HRSV no Acre, Amazonas e Pará, onde foi descrita a ocorrência dos genótipos BA (HRSV-B) e ON1 (HRSV-A), sendo a primeira vez que se comprovou a circulação do genótipo ON1 no norte do país, no estado do Pará.

Este estudo é o único publicado mencionando dados genéticos de amostras do Amazonas.

O genótipo ON1 foi detectado pela primeira vez em Ontário, Canadá, em 2010 por Eshaghi et al. (2012) e apresenta uma característica genética única, uma duplicação de 72 nucleotídeos em *tandem* na 2ª região hipervariável do gene que codifica para a proteína G. Desde sua descoberta esse genótipo foi relatado em vários países ao redor do globo, além de que estudos indicaram que o surgimento do ON1 rapidamente substituiu o genótipo NA1 anteriormente predominante (Auksornkitti et al. 2014, Hirano et al. 2014, Yoshihara et al. 2016).

Na América Latina, há poucos dados na literatura que descrevem a circulação dos genótipos de HRSV. Na Argentina, no estudo realizado por Rojo et al. (2017) há a predominância dos genótipos ON1, BA9 e BA10; Na Colômbia, foram descritos os genótipos GA2 e GA5 em um estudo feito com amostras coletadas no período de 2000-2009 (Avila et al. 2018); no Uruguai GA5, GA2 e GA1 foram identificados em 2003 (Frabasile et al. 2003), mas dados mais atuais são necessários para compreender a epidemiologia molecular do vírus nessa região, sendo necessário o fortalecimento genômico.

No Brasil, o estudo de Moreira et al. 2017, feito no período de 2011 a 2013, mostrou a prevalência do grupo A de HRSV, onde a maioria das sequências analisadas pertenciam ao genótipo ON1, seguidas de NA1, NA2 e GA5. Todas as amostras do grupo B foram relacionadas ao genótipo do tipo BA. O genótipo ON1 de HRSV apareceu pela primeira vez no estudo em 2012 e os pacientes infectados com este genótipo mostraram uma tendência aumentada para desenvolver doença grave.

De-Paris et al. (2014) descreveu a circulação do genótipo NA1 no sul do Brasil sendo dominante, além de que todas as amostras de HRSV-B circulantes pertenciam ao mesmo genótipo, BA4.

Ao analisarmos as demais sequências obtidas neste estudo, identificamos que as 15 amostras de HRSV-B pertenciam ao genótipo BA9. Esse genótipo já foi descrito circulando no Amazonas, no estudo de Santos et al. (2018), identificados em todas 17 amostras sequenciadas, corroborando com nossos resultados.

O genótipo BA foi primeiramente isolado em amostras coletadas em Buenos Aires no ano de 1999 por Trento et al. (2003) e teve uma rápida

dispersão mundial, tornando-se o genótipo predominante do grupo B, identificado em diversos países como Kenya (Agoti et al. 2013), Japão (Dapat et al. 2010), Espanha (Gimferrer et al. 2016), China (Song et al. 2017, Zhao et al. 2019), África (Kenmoe et al. 2018) e Brasil (Vianna et al. 2021). Sendo assim, era esperado que a maioria das amostras de HRSV-B do nosso estudo estivesse incluída nesse genótipo.

Embora vários genótipos tenham sido descritos para HRSV, não há um consenso relacionado aos critérios de atribuição de genótipos, impactando diretamente na compreensão da evolução viral, no desenvolvimento de métodos de detecção e no desenho de vacinas (Muñoz-Escalante et al. 2021).

Comumente utiliza-se os critérios de definição para genotipagem de HRSV propostos por Peret et al. (1998) e Venter et al. (2001), baseado na HVR2 do gene G, no qual um genótipo é distinguido com base em um *cluster* filogenético com valores de suporte de *bootstrap* de pelo menos 70% e uma distância de <0,07 subst./site para todos os outros membros do cluster. Cabe ressaltar que esta definição foi formulada em um momento em que o sequenciamento genético era um processo demorado e de custo elevado (Ramaekers et al. 2020).

Goya et al. (2020) compararam os padrões de agrupamento de sequências de genomas completos com os três genes de glicoproteínas de superfície (SH, G e F), o ectodomínio e a 2ª região hipervariável do gene G de HRSV. Esses autores discutem que, embora a análise completa do genoma tenha alcançado a melhor resolução, as filogenias de ectodomínio de F e G, mostraram suporte estatístico comparável ao genoma completo para definição de genótipo. Dessa forma, relatam que utilizar as sequências do ectodomínio de G compreende a região mínima adequada para a genotipagem de HRSV. Com base em suas análises, propõem que o número de genótipos possa ser reduzido de 13 para 3 para HRSV-A (GA1-GA3) e de 20 para 7 para HRSV-B (GB1-GB7).

Entretanto, Ramaekers et al. (2020), mostraram em suas análises que nem o fragmento da HVR2 nem o gene G contém sinal filogenético suficiente para realizar uma reconstrução filogenética confiável e, portanto, recomendam a utilização de alinhamentos de genoma completo de HRSV para determinar os genótipos. Seguem os seguintes critérios: um suporte de *bootstrap* de $\geq 70\%$ para o respectivo clado e uma distância patrística máxima entre todos os membros do

clado de $\leq 0,018$ substituições por local para HRSV-A ou $\leq 0,026$ substituições por local para HRSV-B, e assim distinguiram vinte e três genótipos de A e seis genótipos B.

Outro grupo propôs novas classificações para HRSV-A (Muñoz-Escalante et al. 2019) e HRSV-B (Muñoz-Escalante et al. 2021), avaliando sequências completas do genoma, do ectodomínio do G e os outros genes individuais de HRSV, usando análises de MV e filogenética Bayesiana, bem como matrizes de distância intergenotípica e intragenotípica. Indicam que os 13 genótipos descritos para HRSV-A podem ser classificados em 9 e os 37 descritos anteriormente para RSV-B podem ser classificados em 15.

Os esforços para estabelecer critérios para a definição dos genótipos de HRSV têm mobilizado vários grupos de pesquisa que estão trabalhando em conjunto para resolver tal questão. À medida que o vírus continua evoluindo as designações de genotipagem de HRSV precisarão estar definidas e ser adaptáveis a mudanças no futuro, e além disso, deverão ser reavaliadas periodicamente por um consórcio global (Salimi et al. 2021).

Genotipagem HRSV-A

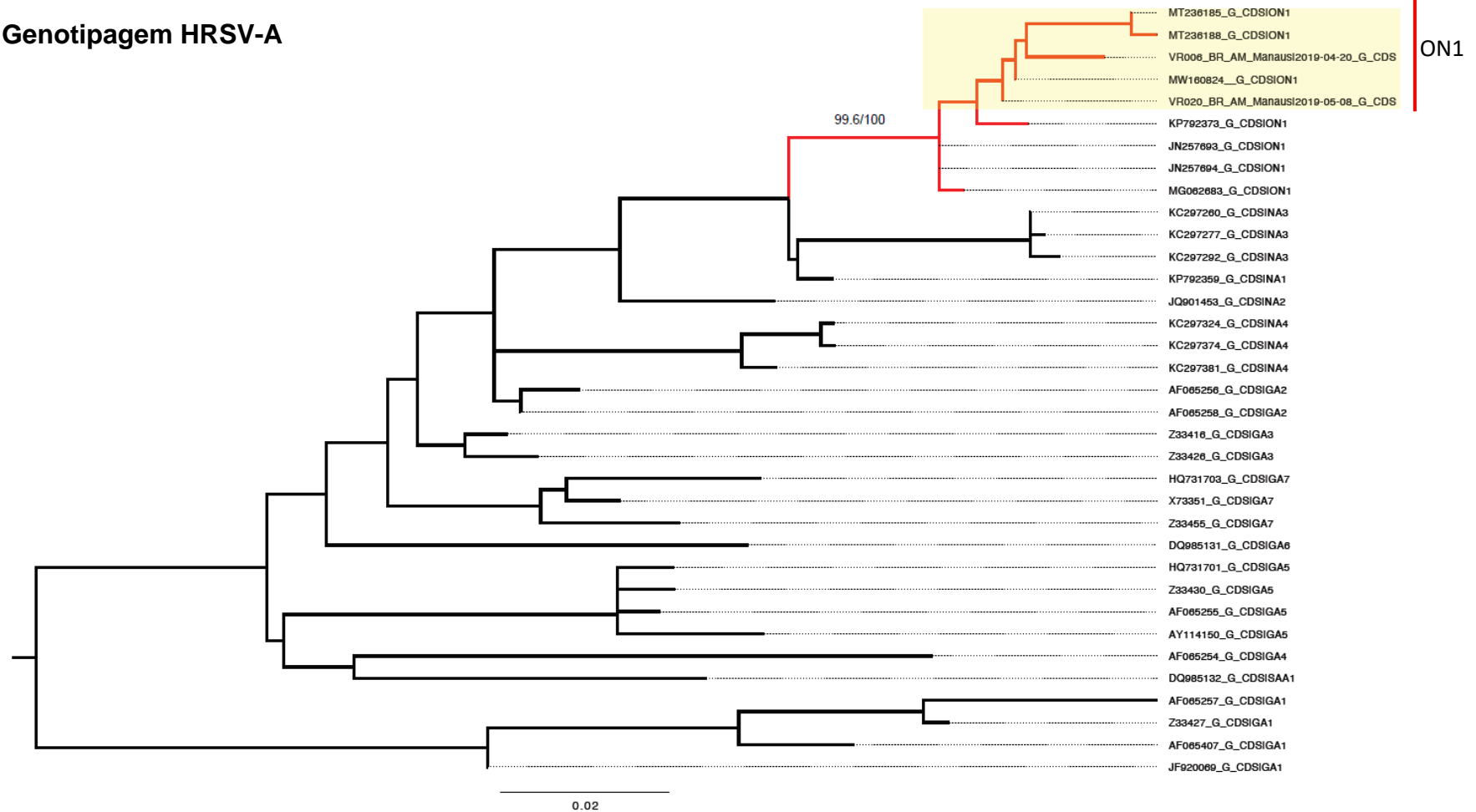


Figura 13 – Árvore filogenética para genotipagem das amostras de HRSV-A. A árvore foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança (MV) no software IQ-TREE, a partir de um alinhamento de sequências do gene G com pelo menos 700 pb. Ao total 33 sequências foram utilizadas representando cada genótipo de HRSV-A recuperadas do banco de dados do NCBI e observa-se que as amostras de HRSV-A do Amazonas, incluídas neste estudo pertencem ao genótipo ON1 (destacadas em vermelho). A árvore foi editada no FigTree versão 1.4.4.

Genotipagem – HRSV-B

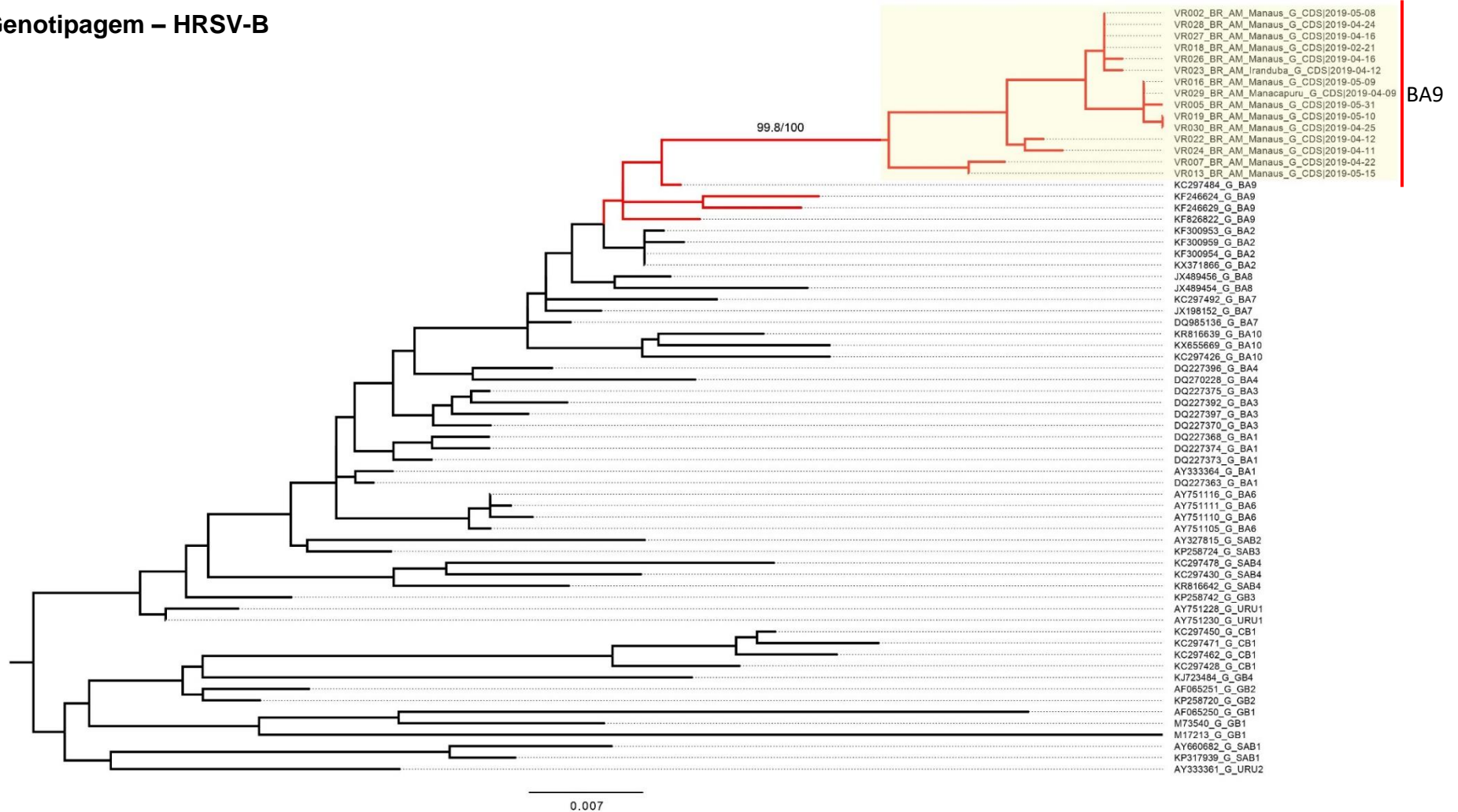


Figura 14 – Árvore filogenética para genotipagem das amostras de HRSV-B. A árvore foi inferida pelo método de MV no software IQ-TREE, a partir de um alinhamento de seqüências do gene G com pelo menos 700 pb. Ao total 68 seqüências foram utilizadas representando cada genótipo de HRSV-B recuperadas do banco de dados do NCBI e observa-se que as amostras de HRSV-B do Amazonas, incluídas neste estudo pertencem ao genótipo BA9 (destacadas em vermelho). A árvore foi editada no FigTree versão 1.4.4.

Para a colocarmos as sequências do Amazonas em um contexto global, foram recuperadas todas as sequências de genoma completo (CDS) de HRSV-A e HRSV-B (n =) que estavam disponíveis no GenBank até XX de maio de 2021 que continham as informações de data e localização (país) e foram excluídas aquelas que continham muitos Ns (>1%) (> x%) na sequência e *outliers*.

Utilizando o *software* IQ-TREE multicore versão 2.1.1, plotamos um gráfico de “*Likelihood mapping analysis*”, um método de visualização para exibir as informações filogenéticas de um alinhamento, que auxilia a considerar se o conjunto de dados utilizado contém sinal filogenético suficiente para as análises. Ele visualiza a semelhança de árvores de todos os quartetos em um único gráfico triangular e, portanto, torna uma interpretação rápida do conteúdo filogenético (Strimmer & von Haeseler 1997). Um bom conjunto de dados deve ter um alto número de quartetos informativos e baixo número de quartetos não informativos. Nossos resultados foram de 84% de quartetos informativos para HRSV-A e 78,5% para HRSV-B (Figura 17).

Ramaekers et al. (2020) em suas análises, utilizando outra metodologia, avaliou um conjunto de dados de sequências de genoma completo de HRSV depositadas no GenBank, extraído as regiões da ORF do gene G (de 967 nt / 951 nt) e da HVR2 (409 nt /399 nt), para HRSV-A e HRSV-B. O sinal filogenético de cada fragmento foi analisado, com e sem a região duplicada usando um algoritmo de mapeamento de verossimilhança, onde para permitir a reconstrução confiável de uma árvore filogenética um fragmento deve ter pelo menos 90% de suporte filogenético. Os alinhamentos dos fragmentos mais curtos (gene G e HVR2) não atenderam a este critério e, portanto, os autores relatam que não são adequados para proceder as análises filogenéticas. Em contrapartida, os alinhamentos do genoma inteiro suportaram além de 90% para ambos os subtipos, independentemente da inclusão ou exclusão do trecho nt duplicado na região HVR2, sendo o mais recomendado.

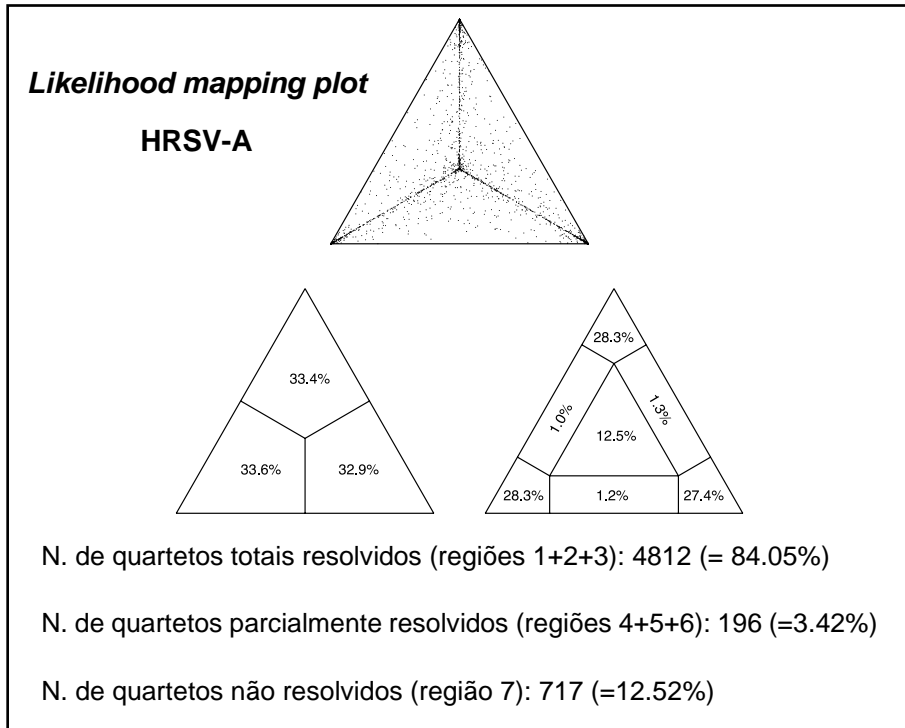
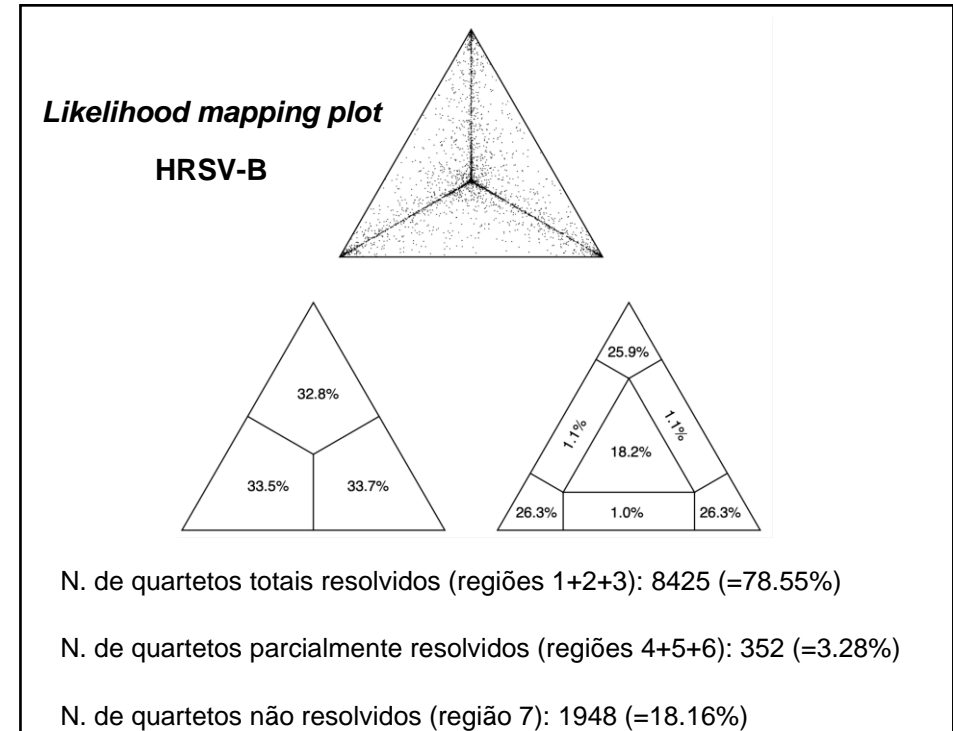
A**B**

Figura 15 – Gráfico de *Likelihood mapping analysis* para os conjuntos de dados de HRSV-A e HRSV-B. (A) Os padrões de distribuição (Inferior) e as porcentagens dos quartetos informativos para HRSV-A, com valor de 84% e (B) para HRSV-B 78%, demonstrando que nosso conjunto de dados apresentou bom sinal filogenético para prosseguir com as análises.

Dessa forma, prosseguimos com análises, onde árvores de MV foram estimadas para ambos os alinhamentos do HRSV-A e HRSV-B usando IQ-TREE v2.1.1, sob o modelo de substituição de nucleotídeo GTR+F+R2 de acordo com *Bayesian Information Criterion* escolhido pelo ModelFinder, calibrada no tempo usando a ferramenta Timetree embutida no IQ-TREE, para estimarmos o período do ancestral comum e as introduções de HRSV no estado.

Nossas análises revelaram uma única introdução encontrada para HRSV-A, onde as duas sequências do Amazonas agruparam-se em um clado monofilético com sequências dos Estados Unidos e Tailândia (Figura 18).

O conjunto final de dados combinados consistia em 299 genomas completos de HRSV-A e 398 para HRSV-B, com 14 países representados. Entretanto, notamos uma clara super-representação de genomas virais dos EUA, Quênia e Austrália.

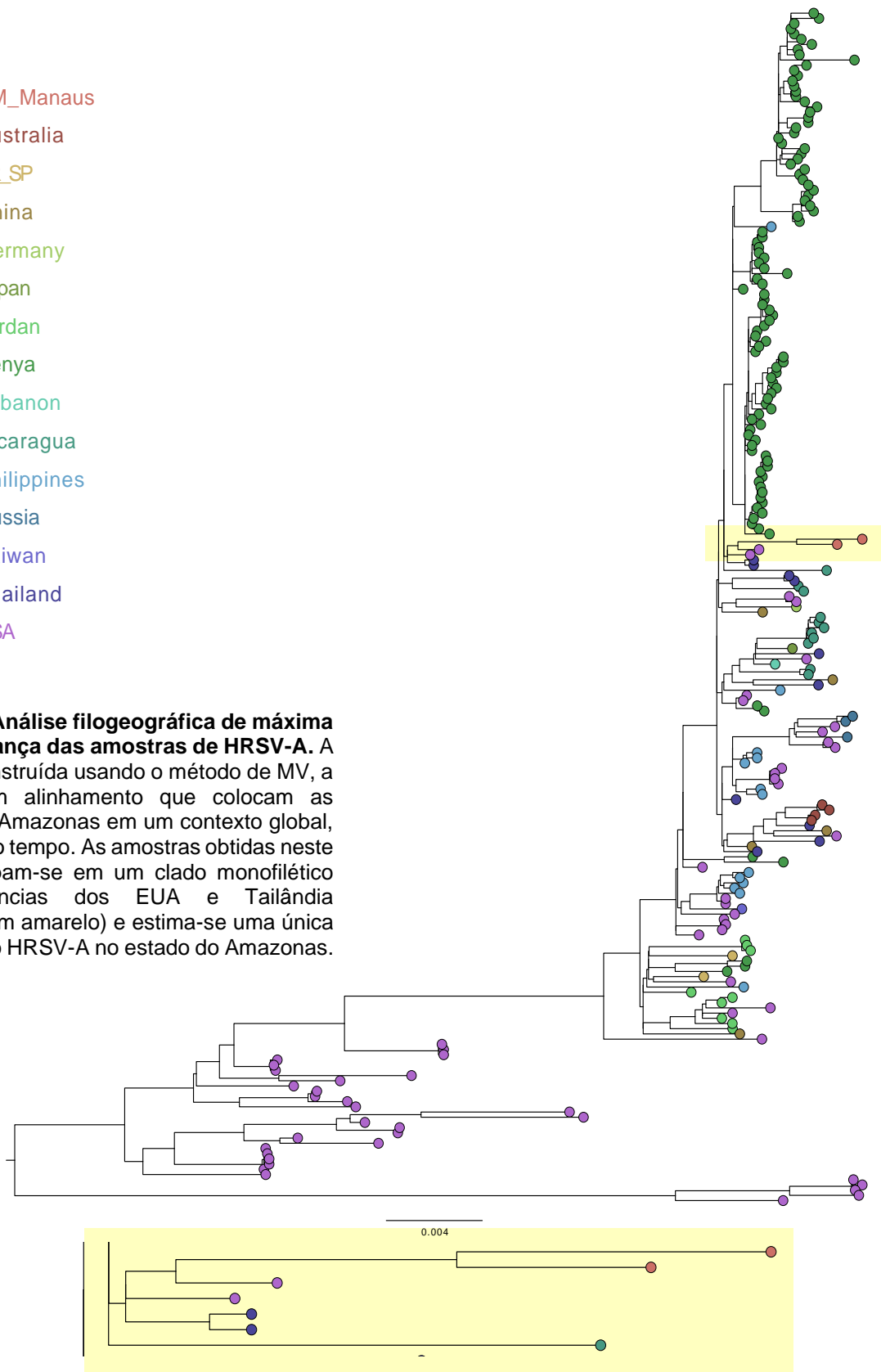
Diferindo do resultado encontrado para HRSV-A, nossas sequências de HRSV-B não agruparam em um clado monofilético e são mostradas pelo menos duas introduções diferentes no estado (Figura 19). O clado 1 (em amarelo), composto por 11 sequências do estado do Amazonas apresenta um ancestral mais antigo, tMRCA (MV): 13/03/2016 (CI: 24/03/2014 – 05/07/2017) e tMRCA (BI): 04/11/2016 (2016.844) (95% HPD: 20/06/2016 – 11/03/2017), havendo um período que se sobrepõe nas análises feitas, estimado em meados de 2016. No mesmo clado encontram-se sequências dos EUA e Austrália.

O clado 2 (em azul), contendo as duas sequências do Amazonas, mostrou ter um ancestral mais recente, em meados de 2018, apresentando valores de tMRCA (MV): 02/03/2017 (CI: 05/11/2015 – 25/04/2018) e tMRCA (BI): 28/02/2018 (2018.161) (95% HPD: 02/10/2017 – 07/08/2018), mostrou estar filogeneticamente relacionado a cepas dos EUA e Japão.

HRSV-A

- AM_Manauas
- Australia
- BR_SP
- China
- Germany
- Japan
- Jordan
- Kenya
- Lebanon
- Nicaragua
- Philippines
- Russia
- Taiwan
- Thailand
- USA

Figura 16 – Análise filogeográfica de máxima verossimilhança das amostras de HRSV-A. A árvore foi construída usando o método de MV, a partir de um alinhamento que colocam as amostras do Amazonas em um contexto global, calibrada pelo tempo. As amostras obtidas neste estudo agrupam-se em um clado monofilético com sequências dos EUA e Tailândia (destacado em amarelo) e estima-se uma única introdução do HRSV-A no estado do Amazonas.



HRSV-B

- AM_Iranduba
- AM_Manacapuru
- AM_Manauas
- Argentina
- Australia
- China
- Germany
- India
- Japan
- Jordan
- Kenya
- NewZealand
- Nicaragua
- Philippines
- Russia
- SouthKorea
- UK
- USA

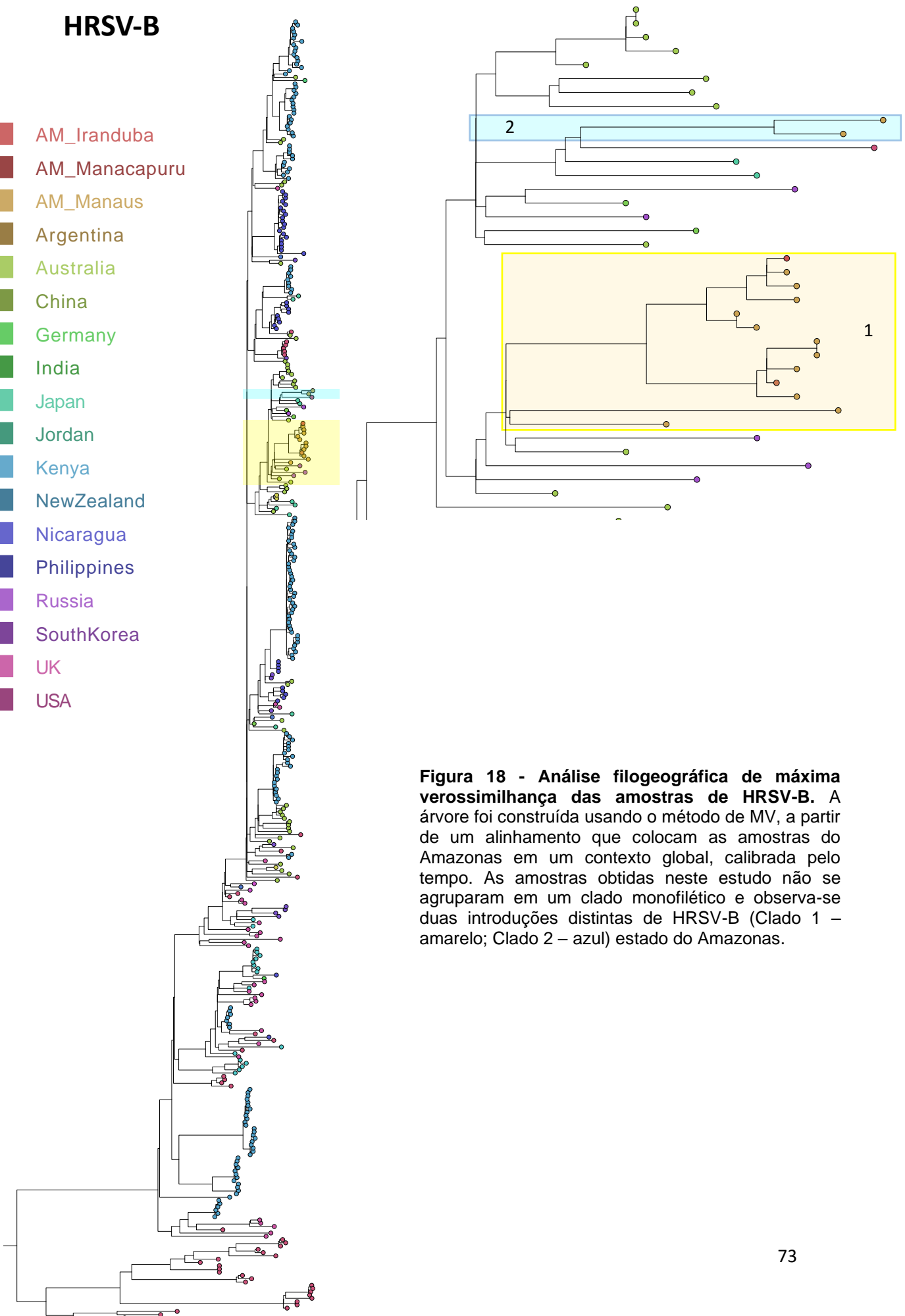


Figura 18 - Análise filogeográfica de máxima verossimilhança das amostras de HRSV-B. A árvore foi construída usando o método de MV, a partir de um alinhamento que colocam as amostras do Amazonas em um contexto global, calibrada pelo tempo. As amostras obtidas neste estudo não se agruparam em um clado monofilético e observa-se duas introduções distintas de HRSV-B (Clado 1 – amarelo; Clado 2 – azul) estado do Amazonas.

Para determinar a robustez da estrutura temporal nos dados, uma regressão simples da raiz a ponta, baseada na divergência da distância genética em função do tempo “*root-to-tip*” foi realizada usando TempEst v.1.5.3 utilizando as árvores MV separadas para HRSV-A (Figura 20) e HRSV-B (Figura 21). Ambas exibiram uma forte estrutura temporal, com evolução semelhante a um relógio estrito, com valores de R^2 de 0,959 para HRSV-A e 0,977 para HRSV-B. Sob este método de regressão, as taxas médias de substituição de nucleotídeos foram de $6,33 \times 10^{-4}$ para HRSV-A e $6,041 \times 10^{-4}$ para HRSV-B. Os gráficos foram realizados usando GraphPad v9.02 (Prism Software, EUA).

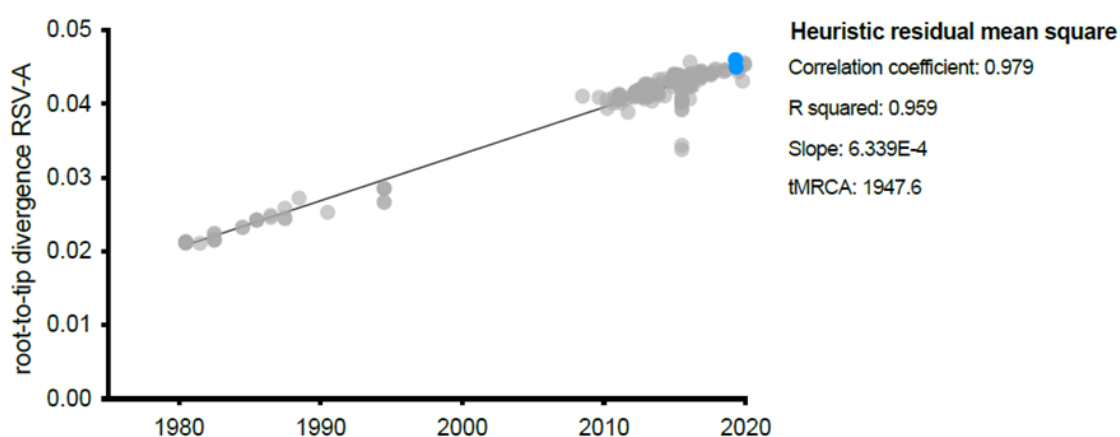


Figura 21 - Resultados da análise de estrutura temporal das sequências para HRSV-A utilizando o software TempEst v1.5.3. O gráfico de divergência em função do tempo “*root-to-tip*” mostra boa correlação (R^2 0,959) e exibe uma forte estrutura temporal, com evolução semelhante a um relógio estrito.

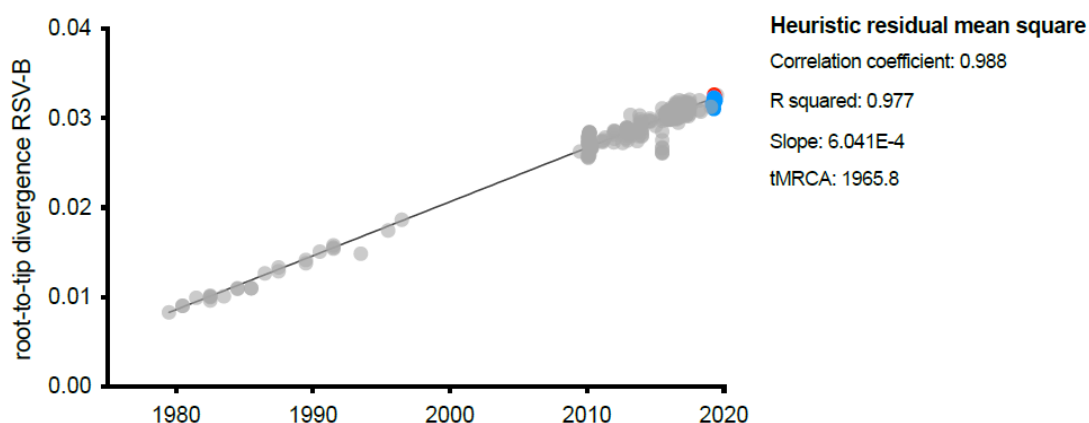
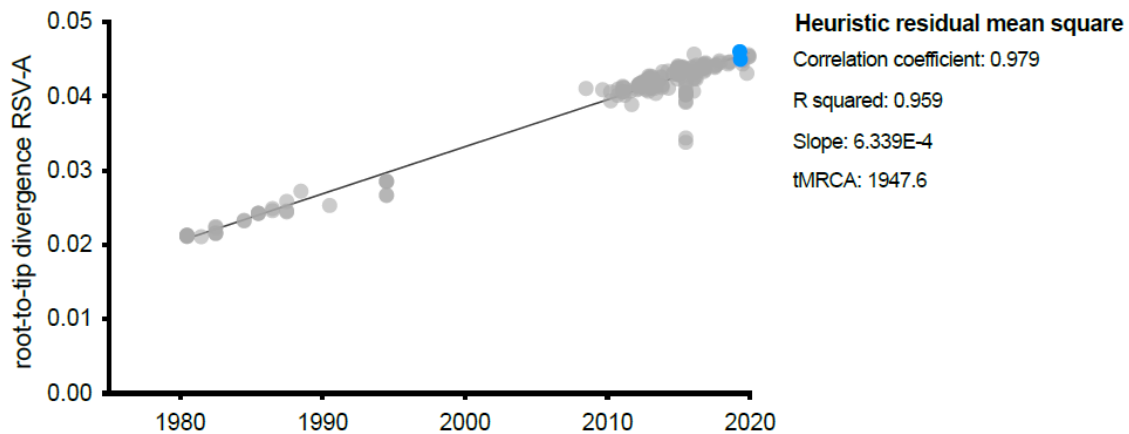


Figura 20 - Resultados da análise de estrutura temporal das sequências para HRSV-B utilizando o software TempEst v1.5.3. O gráfico de divergência em função do tempo “*root-to-tip*” mostra boa correlação (R^2 0,977) e exibe uma forte estrutura temporal, com evolução semelhante a um relógio estrito.



Em função a forte estrutura temporal, realizamos uma análise filogeográfica Bayesiana *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) implementada no BEAST 1.10.4, com o melhor modelo de substituição de nucleotídeos proposto, que nesse caso também foi GTR + G. Todas as análises foram executadas por pelo menos 50 milhões de passos e amostragem a cada 5.000 etapas para garantir a convergência de todos os parâmetros. Os primeiros 10% foram removidos com *burn-in* no programa TreeAnnotator v1.10 e editada no programa FigTree v1.4.3.

Após utilizar os programas BEAUti para criar o arquivo de entrada para o BEAST e Tracer 1.7.1, foram geradas árvores de MCC para HRSV-A e HRSV-B separadamente. Esta árvore filogenética, resumindo as informações de distância genética, espacial e temporal foi editada no programa FigTree v1.4.4 para destacar os parâmetros de maior relevância.

Como resultado, o clado contendo nossas amostras do Amazonas de HRSV-A obteve o tMRCA estimado em 2015-03-01 (95% HPD 2014-04-03 - 2016-01-10) e a taxa de substituição (*mean rate*) encontrada foi de $4,617 \times 10^{-4}$ (95% HPD 4.2329×10^{-4} - 4.9981×10^{-4}). A análise filogeográfica suporta um ancestral comum originado nas Filipinas (Figura 22).

Para as sequências de HRSV-B, analisamos os dois clados separados. Para o clado AM-I (amarelo) obtivemos tMRCA estimado em 2016-07-15 (95% HPD 2016-01-20 - 2017-01-07) e para o clado AM-II (azul) tMRCA 2018-04-17 (95% HPD 2017-11-10 - 2018-09-19). A média da taxa evolutiva para HRSV-B foi de $6,4732 \times 10^{-4}$ com intervalo de 95% HPD $5,7619 \times 10^{-4}$ – $7,1975 \times 10^{-4}$). Sugere-se que o ancestral comum mais provável foi originado na Austrália, com dois eventos de introdução diferentes (Figura 23).

Em um estudo na Austrália, ao analisar um conjunto de dados locais, os autores identificaram que ambos os subgrupos de HRSV evoluíram rapidamente de uma maneira semelhante a um relógio, com taxas médias de aproximadamente $6-8 \times 10^{-4}$ substituições de nucleotídeos por local por ano. Contextualizando em uma escala global, analisaram um conjunto de dados pelo método de datação por mínimos quadrados (LSD) e o resultado foi de $5,72 \times 10^{-4}$ para HRSV-A e $6,41 \times 10^{-4}$ para HRSV-B (Di Giallonardo et al. 2018).

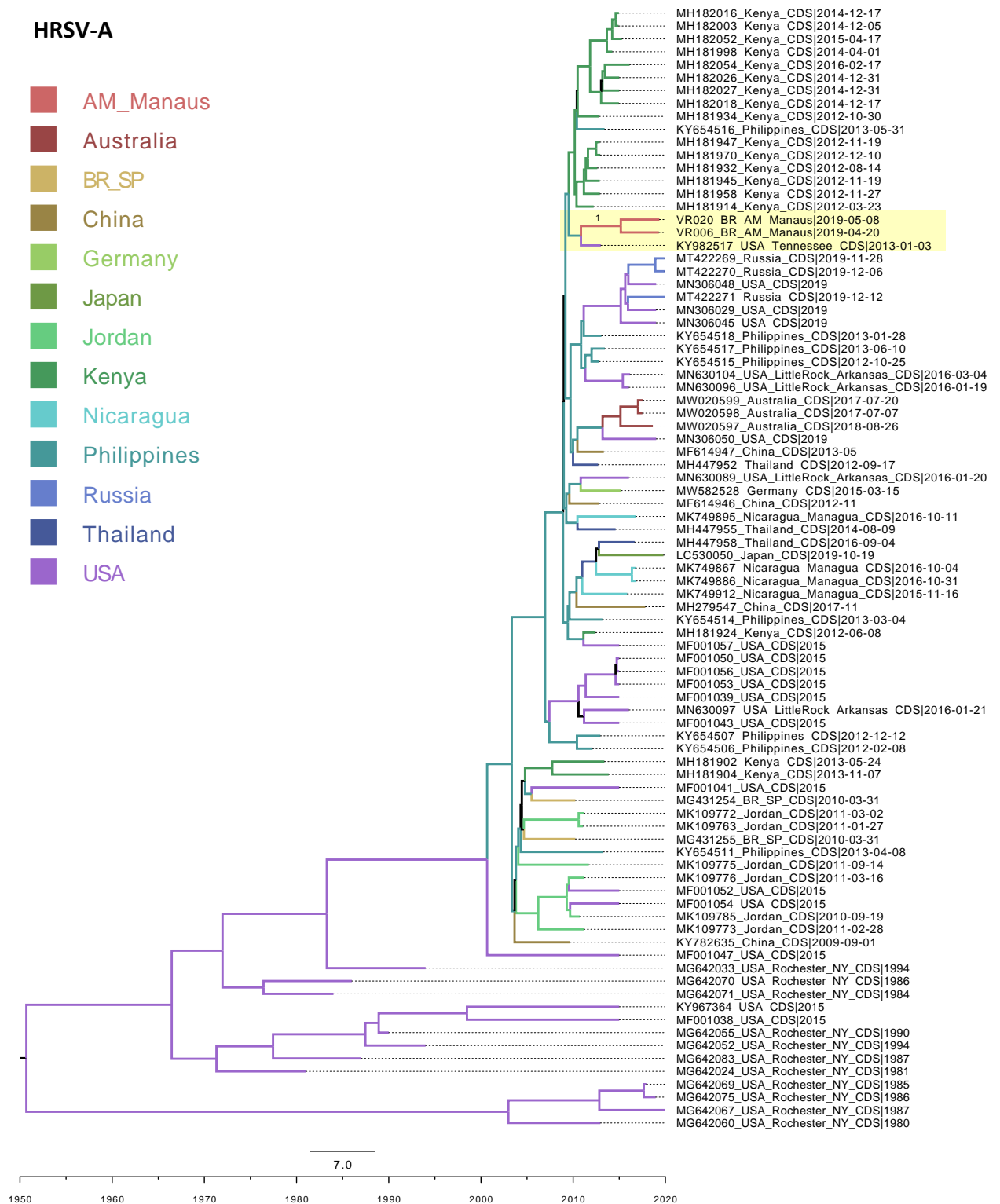


Figura 22 – Árvore filogeográfica de Credibilidade Máxima de Clado (MCC) das sequências de codificação completas (CDS) do HRSV-A. Árvore construída por inferência Bayesiana a partir de 68 sequências CDS de genomas completos do HRSV-A executada no programa BEAST v1.10, onde são resumidas as informações de distância genética e temporal. A árvore foi editada no programa FigTree v1.4.4 e em amarelo está destacado o clado contendo as sequências do Amazonas, agrupadas com sequências dos EUA. Clado AM = tMRCA 2015-03-01 (95% HPD 2014-04-03 - 2016-01-10).

HRSV-B

- AM_Iranduba
- AM_Manacapuru
- AM_Manaus
- Argentina
- Australia
- China
- Germany
- India
- Japan
- Jordan
- Kenya
- NewZealand
- Nicaragua
- Philippines
- Russia
- SouthKorea
- UK
- USA

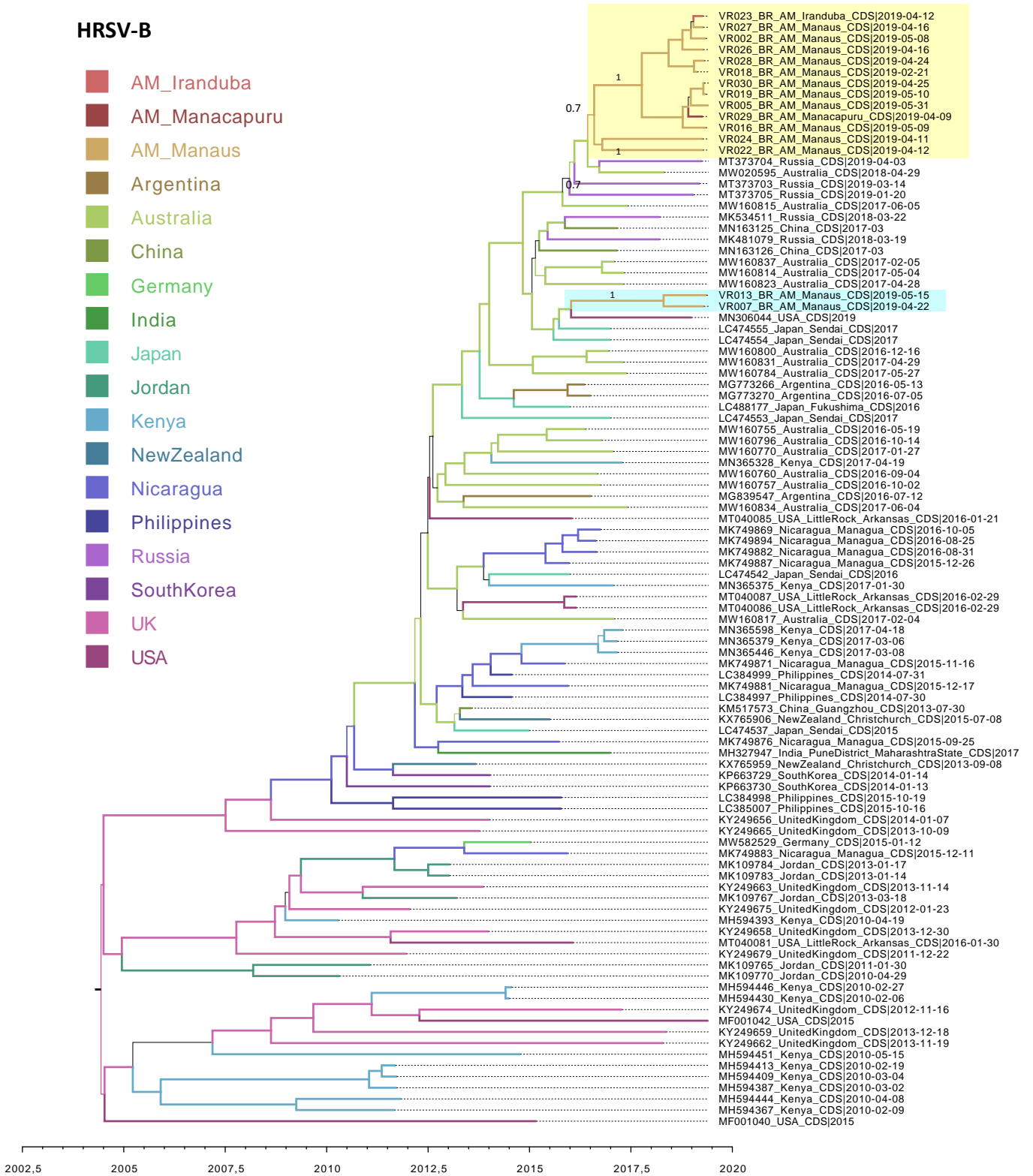


Figura 23 – Árvore filogeográfica de Credibilidade Máxima de Clado (MCC) das sequências de codificação completas (CDS) do HRSV-B. Árvore construída por inferência Bayesiana a partir de 100 sequências CDS de genomas completos do HRSV-B executada no programa BEAST v1.10, onde são resumidas as informações de distância genética e temporal. A árvore foi editada no programa FigTree v1.4.4 e em amarelo está destacado o clado I e azul o clado II. Clado AM-I (amarelo) = tMRCA 2016-07-15 (95% HPD 2016-01-20 - 2017-01-07) e Clado AM-II (azul) = tMRCA 2018-04-17 (95% HPD 2017-11-10 - 2018-09-19).

Essas taxas estão dentro da faixa relatada anteriormente para outros *paramyxovírus*, variando de 6.585 a 11.350×10^{-4} substituições por local e ano (Pomeroy et al. 2008). Para HRSV-A, Otieno et al. (2018) estimaram a taxa de substituição em todo o genoma para os vírus ON1 em $5,97 \times 10^{-4}$ substituições de nucleotídeos por local/ por ano (95% HPD: $5,42-6,58 \times 10^{-4}$). Anteriormente já havia sido descrito taxas de evolução maiores para HRSV-B sugerindo que existem diferentes pressões de seleção entre os grupos (Schobel et al. 2016).

Di Giallonardo et al. (2018) destaca em seu estudo que a amostragem global altamente enviesada de HRSV impede uma análise extensiva da distribuição global e da dinâmica de transmissão do vírus e ressalta que o aumento da vigilância molecular é essencial para melhorar a compreensão da ecologia e evolução do HRSV e auxiliar no projeto de vacinas.

Em nossas análises tivemos o viés de ter uma super-representação de amostras da Austrália, Quênia e EUA. Além disso, poucas sequências de genoma completo de HRSV da América Latina são encontradas nos bancos de dados. Ao fazer uma busca no NCBI, apenas Argentina (n = 175), Brasil (n= 556), Colômbia (n = 39) e Uruguai (n = 25) possuem sequências depositadas de HRSV-A e B. Quando é feito um filtro estipulando o comprimento mínimo de 700 pb nas sequências de G o número de sequências de cada país cai bruscamente, sendo apenas representado pelo Brasil (n= 154 HRSV-A e 26 HRSV-B), Colômbia (n = 1 HRSV-A) e Uruguai (n = 1 HRSV-A).

Nas sequências obtidas no estudo feito por Rojo et al. (2017) reuniram-se diferentes clados, alguns com origem exclusiva na Argentina e relacionados entre si e outros que compartilhavam um ancestral comum no passado com sequências relatadas da Espanha e Paraguai. Entretanto, as análises filogenéticas e filogeográficas foram realizadas somente com base na sequência do ectodomínio de G.

Ao total, o Brasil possui apenas cinco genomas completos de HRSV depositados em banco de dados genéticos (número de acesso MG431251.1 - MG431255.1), dificultando a análise de uma amostragem do país e prejudicando a compreensão da epidemiologia molecular do vírus entre os estados brasileiros. Além disso, o Brasil conta com apenas 154 sequências do gene G de HRSV-A e 26 de HRSV-B que tenham no mínimo 700 pb. A maioria das sequências do país são apenas da 2HRV de G.

Dessa maneira a origem estimada das introduções do HRSV no Amazonas pode ser de outro país das Américas ou mesmo de outro estado brasileiro, mas devido à escassez de genomas completos depositados em banco de dados públicos a confiança nos dados é limitada.

Corroborando com nossos dados, Robertson et al. (2021) em seu estudo pré-publicado, relata que suas análises também foram tendenciosas para regiões que foram altamente amostradas, como EUA e Quênia e que a falta de dados de muitos territórios em todo o mundo prejudicam as inferências sobre o tráfego viral global e local. Para elucidar tais questões no contexto Australiano, utilizaram a análise filogenética de MV em um conjunto de dados mais bem amostrado, derivado de sequências da região do gene G apenas e não mais do genoma completo e embora esta análise tenha melhorado a amostragem de localização geral, houve menos resolução filogenética.

Vianna et al. (2021) dizem que é necessário expandir o sequenciamento das amostras de HRSV de forma global para verificar se há uma formação de grupos genéticos locais ou se a observação é causada por um viés de amostragem.

Em nossas sequências de HRSV-A, ao longo de todo o genoma foram observadas 57 mutações sinônimas, aquelas que não modificam o aminoácido e apenas quatro mutações não-sinônimas foram identificadas, aquelas em que há a mudança do aminoácido, sendo duas na proteína F (Val115Met e Lys135Arg) e duas na L (Asn1739Asp e His2111Asn), quando comparadas à sequência de referência utilizada MW160824 (Tabela 8).

Quando comparamos somente a região CDS do gene G com a sequência de referência para o genótipo ON1 (JN257693) observamos quinze mutações, sendo sete sinônimas e 8 não sinônimas (Tabela 9). Algumas destas mutações também foram relatadas por Vianna et al. (2021) em cepas brasileiras de HRSV-A do Espírito Santos de 2016 a 2018, em clusters locais brasileiros. No cluster BR.1 estavam presentes mutações como Leu142Ser, Leu274Pro, Tyr304His e Thr320Ala, também encontradas nas duas sequências de G de HRSV-A deste estudo. Uma outra mutação no cluster denominado BR 1.1 (Gly106Glu) foi encontrada em apenas uma de nossas sequências (VR006_BR_AM_Manauas|2019-04-20).

Tabela 8 – Diferenças observadas nos resíduos de aminoácidos das sequências de RSV-B utilizando a Refseq KF826822

As substituições de nucleotídeos são mostradas em cada códon. S: mutações sinônimas; NS: mutações não sinônimas (destacadas em

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|------------|---------|------------|--------|
| Posição no genoma | 166 | 253 | 373 | 403 | 415 | 617 | 620 | 671 | 827 | 1570 | 1897 | 1928 | 2005 | 2038 | 2706 | 3506 | 3734 | 4383 | 4405 | | | | |
| Ref (MW160824) | T | T | A | G | C | C | T | T | C | T | G | T | A | A | C | C | C | G | C | | | | |
| VR006_BR_AM_Manus 2019-04-20 | C | A | A | A | C | C | T | T | C | C | A | C | G | G | T | C | T | T | T | | | | |
| VR020_BR_AM_Manus 2019-05-08 | T | T | G | G | T | A | C | C | T | C | G | T | A | A | C | T | C | G | C | | | | |
| Posição no códon | ACT | ATT | CAA | GAG | TCC | CAC | AAT | CTT | AGC | GAT | GGG | TTA | GAA | AAA | AAC | GCC | AGC | AGT | TGC | | | | |
| | ACC | ATA | CAG | GAA | TCT | CAA | AAC | CTC | AGT | GAC | GGA | CTA | GAG | AAG | AAT | GCT | AGT | ATT | TGT | | | | |
| Tipo de mutação | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | |
| Proteína | NS1 | | | | | NS2 | | | | | N | | | | P | M | | SH | | | | | |
| Resíduo | Thr31 | Ile60 | Gln100 | Glu110 | Ser114 | His5 | Asn6 | Leu23 | Ser75 | Asp152 | Gly261 | Leu272 | Glu297 | Lys308 | Asn128 | Ala92 | Ser168 | Ser38 | Cys45 | | | | |
| Posição no genoma | 4847 | 4972 | 5267 | 5439 | 5465 | 5537 | 5540 | 5570 | 5613 | 5737 | 5766 | 6202 | 6043 | 6104 | 6144 | 7336 | 8006 | 8162 | 8349 | | | | |
| Ref (MW160824) | G | G | A | G | C | C | A | A | G | A | C | C | G | A | C | C | C | C | G | | | | |
| VR006_BR_AM_Manus 2019-04-20 | G | A | G | A | T | T | T | C | G | G | T | T | A | G | T | T | T | T | A | | | | |
| VR020_BR_AM_Manus 2019-05-08 | A | G | A | G | C | C | A | A | A | A | C | C | A | G | T | C | C | C | G | | | | |
| Posição no códon | TCG | GGA | AAA | GAG | TCC | TCC | GAA | ACA | GCA | ACA | TTC | GCC | GTG | AAA | ATC | CTG | AAC | ATC | CCG | | | | |
| | TGA | GAA | AAG | AAG | TCT | TCT | GAT | ACC | ACA | GCA | TTT | GCT | ATG | AGA | ATT | TTG | AAT | ATT | CCA | | | | |
| Tipo de mutação | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | NS | NS | S | S | S | S | S | | | | |
| Proteína | G | | | | | | | | | F | | | | | | M2-1 | | M2-2 | | | | | |
| Resíduo | Ser64 | Gly106 | Lys204 | Glu262 | Ser270 | Ser294 | Glu295 | Thr305 | Ala320 | Thr13 | Phe22 | Ala107 | Val115Met | Lys135Arg | Ile148 | Leu546 | Asn121 | Ile173 | Pro49 | | | | |
| Posição no genoma | 8622 | 8674 | 8698 | 8834 | 9345 | 9636 | 9804 | 9849 | 9666 | 10110 | 11064 | 11068 | 11637 | 12201 | 12531 | 12639 | 12708 | 12897 | 13119 | 13750 | 13899 | 14866 | 15022 |
| Ref (MW160824) | T | A | T | C | A | C | T | G | T | T | A | T | T | C | A | T | T | T | T | A | G | C | A |
| VR006_BR_AM_Manus 2019-04-20 | C | A | C | T | G | T | T | A | C | C | A | T | G | C | G | T | T | T | C | G | A | A | T |
| VR020_BR_AM_Manus 2019-05-08 | C | T | T | C | A | C | C | A | C | T | G | C | T | T | A | C | C | C | T | G | G | A | A |
| Posição no códon | AAT | AAC | TTA | TCA | TTA | GCC | TAT | CAG | TAT | TTT | TTA | TAT | GAT | CCC | TTA | ATT | TTT | ACT | TTC | AAT | AAG | CAT | AAT |
| | AAC | TAC | CTA | TTA | TTG | GCT | TAC | CAA | TAC | TTC | TTG | CAT | GAG | CCT | TTG | ATC | TTC | ACC | TTT | GTT | AAA | AAT | TAT |
| Tipo de mutação | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | NS | S | NS | S |
| Proteína | L | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Resíduo | Asn29 | Asn47 | Leu55 | Ser100 | Leu270 | Ala367 | Tyr423 | Gln438 | Tyr477 | Phe525 | Leu843 | Tyr845 | Asp1034 | Pro1222 | Leu1332 | Ile1368 | Phe1391 | Thr1454 | Phe1528 | Asn1739Asp | Lys1788 | His2111Asn | Asn163 |

vermelho); Em cinza são mostradas as alterações comuns às duas sequências do Amazonas.

Tabela 9 – Alterações de aminoácidos no gene da proteína G das amostras de HRSV-A do Amazonas. Aqui identificamos as alterações de aminoácidos encontradas em G quando comparada a sequência de referência para o genótipo ON1 (JN257693).

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|------------------------|----------|----------|------------------|----------|------------------|----------|------------------|----------|------------------|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Posição no genoma | 42 | 69 | 192 | 317 | 348 | 425 | 612 | 784 | 810 | 821 | 882 | 885 | 893 | 910 | 958 |
| Ref (JN257693) | A | G | G | G | T | T | A | G | C | T | C | A | T | T | A |
| VR006_BR_AM_Manus 2019-04-20 | G | A | * | A | C | C | G | A | T | C | T | T | C | C | G |
| VR020_BR_AM_Manus 2019-05-08 | G | A | A | * | C | C | * | * | * | C | * | * | C | C | * |
| Posição no códon | GAA | CTG | TCG | GGA | GCT | TTA | AAA | GAG | TCC | CTA | TCC | GAA | CTA | TAT | ACA |
| | GAG | CTA | TCA | GAA | GCC | TCA | AAG | AAG | TCT | CCA | TCT | GAT | CCA | CAT | GCA |
| Tipo de mutação | S | S | S | NS | S | NS | S | NS | S | NS | S | NS | NS | NS | NS |
| Proteína | Glicoproteína G | | | | | | | | | | | | | | |
| Resíduo | Glu14 | Leu23 | Ser64 | Gly106Glu | Ala116 | Leu142Ser | Lys204 | Glu262Lys | Ser270 | Leu274Pro | Ser294 | Glu295Asp | Leu298Pro | Tyr304His | Thr320Ala |

As substituições de nucleotídeos são mostradas em cada códon. S: mutações sinônimas; NS: mutações não sinônimas (destacadas em vermelho); Em cinza são mostradas as alterações comuns às duas sequências do Amazonas

Apesar de listarmos as substituições de aminoácidos em nossas sequências em comparação com outras de referência, não realizamos uma análise aprofundada para entender o papel dessas mutações, pois nosso objetivo era somente observacional neste primeiro momento.

As sequências de HRSV-B deste estudo apresentaram 114 mutações sinônimas ao longo do genoma e diversas substituições que levaram a alterações nos aminoácidos em diversas proteínas, como NS1 (n=2); NS2 (n=1); N (n=1); SH (n=2); G (n=13); F (n=6); L (n=7), quando comparadas a sequência de referência KF826822 (Tabela 10).

Assim como com as sequências de HRSV-A, alinhamentos somente a região CDC do gene que codifica a proteína G de nossas sequências de HRSV-B com a referência do genótipo, BA (AY333364). Dessa maneira, pudemos observar dezoito mutações sinônimas e dezessete não sinônimas que resultaram em alterações nos aminoácidos, conforme é mostrado na tabela 11.

Todas as nossas sequências exibiram mudanças de aminoácidos comuns em doze locais diferentes: Leu105Pro, Thr107Ala, Tyr112His, Arg136Thr, Thr138Ser, Ile200Thr, Lys218Thr, Leu223Pro, Thr270Ile, Val271Ala, Ile281Thr e Tyr290Ile no gene G (Tabela 11).

As alterações Leu223Pro, Thr270Ile, Val271Ala e His287Tyr foram relatados em outros estudos anteriormente realizados com amostras do Japão e Índia (Dapat et al. 2010a, Haider et al. 2018). A mutação His287Tyr apareceu em treze das nossas sequências, com exceção em VR022_BR_AM_Manauas|2019-04-12 e VR024_BR_AM_Manauas|2019-04-18.

Outras mutações encontradas em nossas sequências foram relatadas no estudo de Haider et al. (2018), como Ser247Pro e Ile281Thr, sendo as substituições nos resíduos 247 e 270 descritas como contribuintes para a perda dos locais de glicosilação e na posição 281 relacionada ao ganho de glicosilação.

Além das substituições identificamos a deleção de dois resíduos de aminoácidos nas posições 159 e 160. E treze sequências apresentaram um códon de parada prematuro (Gln313Stopcodon), resultando em uma proteína menor, já relatado na literatura em HRSV-B (Martínez et al. 1999). Nas duas sequências que não estava presente o códon de parada prematuro observamos uma alteração de um T → C resultando em Gln313Stopcodon, também relatado em sequências indianas (Haider et al. 2018).

Tabela 11 - Alterações de aminoácidos no gene da proteína G das sequências de HRSV-B do Amazonas. Aqui identificamos as alterações de aminoácidos encontradas em G quando comparada a sequência de referência para o genótipo BA (AY333364).

| Posição no genoma | 108 | 177 | 237 | 276 | 311 | 329 | 334 | 349 | 375 | 378 | 406 | 422 | 425 | 427 | 429 | 490-492 | 493-495 | 525 | 612 | 614 |
|-------------------------------|----------|---------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|----------|
| Ref BA (AY333364) | C | C | * | C | T | T | A | T | T | T | G | G | C | A | C | DEL | DEL | C | C | T |
| VR002_BR_AM_Manauš 2019-04-23 | T | T | * | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR005_BR_AM_Manauš 2019-04-16 | T | T | * | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR007_BR_AM_Manauš 2019-04-17 | * | T | * | A | * | C | G | C | C | * | * | C | * | T | T | DEL | DEL | T | * | C |
| VR013_BR_AM_Manauš 2019-04-26 | * | T | * | A | * | C | G | C | C | * | * | C | * | T | T | DEL | DEL | T | * | C |
| VR016_BR_AM_Manauš 2019-04-13 | T | T | A | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR018_BR_AM_Manauš 2019-04-14 | T | T | * | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR019_BR_AM_Manauš 2019-04-15 | T | T | A | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR022_BR_AM_Manauš 2019-04-12 | * | T | * | A | * | C | G | C | C | * | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR023_BR_AM_Manauš 2019-04-21 | T | T | A | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR024_BR_AM_Manauš 2019-04-18 | * | T | * | A | * | C | G | C | C | * | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR026_BR_AM_Manauš 2019-04-19 | T | T | * | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR027_BR_AM_Manauš 2019-04-20 | T | T | * | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR028_BR_AM_Manauš 2019-04-25 | T | T | * | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR029_BR_AM_Manauš 2019-04-22 | T | T | A | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| VR030_BR_AM_Manauš 2019-04-24 | T | T | A | A | C | C | G | C | C | C | A | C | T | T | T | DEL | DEL | T | T | C |
| Posição no códon | TAC | CTC | GTC | ATC | GTT | CTC | ACC | TAC | CCT | AAT | GCA | AGA | ACC | ACC | TCT | DEL | DEL | TTC | ACC | ATA |
| TAT | CTT | GTA | ATA | GCT | CCC | GCC | CAC | CCC | CCC | AAC | ACA | ACA | ATC | GCC | | DEL | DEL | TTT | ACT | ACA |
| Tipo de mutação | S | S | S | S | NS | NS | NS | NS | S | S | NS | NS | NS | NS | NS | DEL | DEL | S | S | NS |
| Proteína | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Resíduo | Tyr31 | Leu54 | Val74 | Ile87 | Val99Ala | Leu105Pro | Thr107Ala | Tyr112His | Pro120 | Asn121 | Ala131Thr | Arg136Thr | Thr137Ile | Thr138Ser | 159 | 160 | Phe170 | Thr199 | Ile200Thr | |
| Posição no genoma | 627 | 636 | 663 | 668 | 683 | 702 | 732 | 754 | 776 | 801 | 827 | 830 | 834 | 857 | 877 | 887 | 951 | 953 | 955 | 964 |
| Ref BA (AY333364) | C | C | A | A | T | C | C | T | C | A | C | T | C | T | C | C | C | C | C | T |
| VR002_BR_AM_Manauš 2019-04-23 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR005_BR_AM_Manauš 2019-04-16 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR007_BR_AM_Manauš 2019-04-17 | * | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | * | * | * | C |
| VR013_BR_AM_Manauš 2019-04-26 | * | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | * | * | * | C |
| VR016_BR_AM_Manauš 2019-04-13 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR018_BR_AM_Manauš 2019-04-14 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR019_BR_AM_Manauš 2019-04-15 | T | T | C | C | C | T | T | * | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR022_BR_AM_Manauš 2019-04-12 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | * | T | T | T | T | * |
| VR023_BR_AM_Manauš 2019-04-21 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR024_BR_AM_Manauš 2019-04-18 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | * | T | T | T | T | * |
| VR026_BR_AM_Manauš 2019-04-19 | T | T | T | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR027_BR_AM_Manauš 2019-04-20 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR028_BR_AM_Manauš 2019-04-25 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR029_BR_AM_Manauš 2019-04-22 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| VR030_BR_AM_Manauš 2019-04-24 | T | T | C | C | C | T | T | C | T | G | T | C | T | C | T | T | T | T | T | * |
| Posição no códon | AAC | CCC | CCA | AAA | CTG | ATC | ACC | TCA | ACA | AGA | ACT | GTG | GTC | ATC | CAC | ACC | TCC | ACC | CAA | TAG |
| AAT | CCT | CCC/CCT | ACA | C GG | ATT | ACT | CCA | ATA | AGG | AGG | ATT | GCG | GTT | ACC | TAC | ATC | TCT | ATC | TAA | CAG |
| Tipo de mutação | S | S | S | NS | NS | S | S | S | S | S | NS | NS | S | NS | NS | NS | Ser311 | S | NS | NS |
| Proteína | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Resíduo | Asn204 | Pro207 | Pro216 | Lys218Thr | Leu223Pro | Ile229 | Thr239 | Ser247Pro | Thr254Ile | Arg262 | Thr270Ile | Val271Ala | Leu272 | Ile281Thr | His287Tyr | Tyr290Ile | Ser311 | Thr312Ile | Gln313SC | SC316Gln |

As substituições de nucleotídeos são mostradas em cada códon. S: mutações sinônimas; NS: mutações não sinônimas (destacadas em vermelho); Em cinza são mostradas as alterações em todas as sequências do estudo.

GISAID (do inglês *Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data*), iniciativa global criada para o compartilhamento global de dados do vírus Influenza em 2006 (gisaid.org) com a base de dados genômico EpiFlu. Em 2020 ampliou suas atividades e ofertas de ferramentas de análise por conta da pandemia do SARS-CoV-2, hoje a base de dados EpiCov já possui mais de 2 milhões de genomas compartilhados por grupos de todo o mundo. Entre as ferramentas disponíveis existe o CoVsurver (gisaid.org/covsurver) para auxiliar a comunidade científica na identificação, análise e interpretação de mutações em genomas do coronavírus. Devido à importância epidemiológica e impacto do HRSV no mundo, o GISAID junto com a OMS criou também a base de dados EpiRSV foi liberada em junho de 2021. EpiRSV contará também com ferramentas de vigilância genômica e análises para HRSV, auxiliando a elucidar as lacunas de conhecimento em relação a transmissão, fatores de risco para infecção e acima de tudo, a partir dos dados genéticos auxiliará na identificação das variantes virais circulantes em tempo real e interpretação do impacto de mutações no genoma.

Análises preliminares das sequências obtidas neste estudo com a ferramenta RSVsurver (gisaid.org), onde foi possível de maneira rápida identificar as mutações encontradas em nossas sequências comparadas às sequências de referências utilizadas pelo GISAID, EPI_ISL_412866 para HRSV-A e EPI_ISL_1653999 para HRSV-B podem ser observadas na Tabela 12 e no material em anexo. No entanto, como essa ferramenta foi liberada abertamente em 21 de junho de 2021, não foi possível analisá-las e interpretá-las em tempo hábil para a redação deste manuscrito. Notavelmente observamos uma maior quantidade de mutações na proteína G. Reforçamos a necessidade de aumentarmos a nível global o número de genomas de HRSV para entendermos melhor a dinâmica viral e entender melhor o significado de mutações encontradas em termos de virulência, escape da resposta imune, escape a imunoproliféricos ou a antivirais. Adicionalmente, correlacionar estes dados com a caracterização fenotípica e antigênica destes vírus também é importante para dar suporte aos achados genômicos.

Tabela 12- Identificação das mutações de HRSV A e B das sequências do Amazonas no RSVserver disponível no GISAID.

| | ID SEQUÊNCIA | N DE MUT. | MUTAÇÕES NA PROTEÍNA G | N DE MUT. | MUTAÇÕES NA PROTEÍNA F |
|---------|-----------------------------------|-----------|---|-----------|------------------------|
| RSV-A | VR006_BR_AM_Manauas 2019-04-202 | 13 | P71L, H90Y, L101F, G106E, I134K, L142S, G224E, S243I, I265L, D284G, E295D, Y304H, T320A | 1 | T13A |
| | VR020_BR_AM_Manauas 2019-05-082 | 11 | P71L, H90Y, L101F, I134K, L142S, G224E, S243I, K262E, I265L, D284G, Y304H | 0 | sem mutações |
| | VR002_BR_AM_Manauas 2019-05-08 | 2 | A74V, V99A | 0 | sem mutações |
| | VR005_BR_AM_Manauas 2019-05-31 | 4 | A74V, V99A, P192S#a, I310V | 0 | sem mutações |
| | VR007_BR_AM_Manauas 2019-04-22 | 7 | A74V, T131A, I137T, I252T, L284P, P304L, T306I | 1 | Q172H#hao |
| | VR013_BR_AM_Manauas 2019-05-15 | 6 | A74V, T131A, I137T, I252T, L284P, T306I | 0 | sem mutações |
| | VR016_BR_AM_Manauas 2019-05-09 | 4 | A74V, V99A, P192S#a, I310V | 0 | sem mutações |
| | VR018_BR_AM_Manauas 2019-02-21 | 2 | A74V, V99A | 0 | sem mutações |
| | VR019_BR_AM_Manauas 2019-05-10 | 5 | A74V, V99A, P192S#a, P245S, I310V | 0 | sem mutações |
| RSV - B | VR022_BR_AM_Manauas 2019-04-12 | 4 | A74V, ins229T, Y285H, T287A | 0 | sem mutações |
| | VR023_BR_AM_Iranduba 2019-04-12 | 3 | A74V, V99A, S305F | 0 | sem mutações |
| | VR024_BR_AM_Manauas 2019-04-11 | 2 | A74V, Y285H | 1 | L4P |
| | VR026_BR_AM_Manauas 2019-04-16 | 2 | A74V, V99A | 0 | sem mutações |
| | VR027_BR_AM_Manauas 2019-04-16 | 2 | A74V, V99A | 0 | sem mutações |
| | VR028_BR_AM_Manauas 2019-04-24 | 2 | A74V, V99A | 0 | sem mutações |
| | VR029_BR_AM_Manacapuru 2019-04-09 | 4 | A74V, V99A, P192S#a, I310V | 0 | sem mutações |
| | VR030_BR_AM_Manauas 2019-04-25 | 5 | A74V, V99A, P192S#a, P245S, I310V | 0 | sem mutações |

Quando não há efeitos conhecidos para a mutação e a mutação ocorreu apenas uma vez no conjunto atual de sequências, a mutação aparecerá em fonte de cor **preta**
Mutações que ocorrem mais de uma vez são mais interessantes do ponto de vista epidemiológico e aparecerão em fonte de cor **azul**
mutações que levam a uma inserção ou deleção de resíduos de aminoácidos são coloridas em **ciano**

5. CONCLUSÕES

1. Com base nas amostras analisadas neste estudo, no período de 2019 a 2021 circularam no Amazonas os dois subgrupos de HRSV (A e B). Porém, a dominância de circulação mostrou-se diferente ao longo dos anos;
2. Em 2019 a frequência de HRSV-B foi maior nas amostras estudadas, e em 2020 e 2021 o HRSV-A circulou com mais frequência, corroborando com estudos que indicam a circulação cíclica do HRSV, mudando pelo menos a cada dois anos;
3. Ao todo foram sequenciados 17 genomas de HRSV por NGS do Amazonas, de amostras referentes ao ano de 2019 neste estudo, sendo 15 genomas de HRSV-B e 2 de HRSV-A;
4. As amostras sequenciadas do HRSV-A pertenciam ao genótipo ON1, que apresenta uma duplicação de 72 nucleotídeos na porção final do gene G. Sendo essa a primeira vez que o genótipo ON1 é identificado circulando no Amazonas;
5. Todas as quinze amostras de HRSV-B sequenciadas pertenciam ao genótipo BA9, com a característica duplicação de 60 nucleotídeos na porção final do gene G;
6. Neste estudo, listamos alterações nos aminoácidos ao longo do genoma das amostras sequenciadas, mas de forma observacional. Análises mais aprofundadas para entender o papel dessas mutações são importantes e ficam em perspectivas futuras. Algumas mutações no gene G foram observadas em outro estudo com amostras brasileiras, corroborando com nossos achados;
7. Com base em análises filogenéticas e filogeográficas pudemos inferir uma única introdução do HRSV-A no estado do Amazonas e estimamos que a origem mais provável seja Filipinas;
8. Nas análises feitas com os 15 genomas de HRSV-B, inferimos duas introduções distintas do vírus no estado, sendo em ambas a origem mais provável a Austrália;
9. Entretanto o viés de baixa amostragem de genomas para análises filogenéticas e filogeográficas foi observado assim como em outros trabalhos
10. Entretanto o viés de baixa amostragem de genomas para análises filogenéticas e filogeográficas foi observado neste estudo, assim como em outros trabalhos. Dessa maneira, reforçamos a importância da vigilância genômica do

HRSV no Brasil e no mundo e esperamos contribuir com nossos achados para minimizar essa lacuna que existe.

REFERÊNCIAS

- Agoti CN, Gitahi CW, Medley GF, Cane PA, Nokes DJ (2013). Identification of group B respiratory syncytial viruses that lack the 60-nucleotide duplication after six consecutive epidemics of total BA dominance at coastal Kenya. *Influenza Other Respi. Viruses* 7: 1008–1012.
- Alonso WJ, Tamerius J, Freitas ARR (2020). Respiratory syncytial virus causes more hospitalizations and deaths in equatorial Brazil than influenza (including during the 2009 pandemic). *An. Acad. Bras. Cienc.* 92.
- Amarasinghe GK, Ayllón MA, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Blasdel KR, Brieese T, Brown PA, Bukreyev A, Balkema-Buschmann A, Buchholz UJ, Chabi-Jesus C, Chandran K, Chiapponi C, Crozier I, Swart RL de, Dietzgen RG, Dolnik O, Drexler JF, Dürrwald R, Dundon WG, Duprex WP, Dye JM, Easton AJ, Fooks AR, Formenty PBH, Fouchier RAM, Freitas-Astúa J, Griffiths A, Hewson R, Horie M, Hyndman TH, Jiāng D, Kitajima EW, Kobinger GP, Kondō H, Kurath G, Kuzmin I V., Lamb RA, Lavazza A, Lee B, Lelli D, Leroy EM, Lǐ J, Maes P, Marzano SYL, Moreno A, Mühlberger E, Netesov S V., Nowotny N, Nylund A, Økland AL, Palacios G, Pályi B, Pawęska JT, Payne SL, Prosperi A, Ramos-González PL, Rima BK, Rota P, Rubbenstroth D, Shī M, Simmonds P, Smither SJ, Sozzi E, Spann K, Stenglein MD, Stone DM, Takada A, Tesh RB, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, Hoogen B van den, Vasilakis N, Wahl V, Walker PJ, Wang LF, Whitfield AE, Williams J V., Zerbini FM, Zhāng T, Zhang YZ, Kuhn JH (2019). Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch. Virol.* 164: 1967–1980.
- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Michael Hendry R, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K (1985). Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 151: 626–633.
- Anderson LJ, Parker RA, Strilms RL (1990). Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. *J. Infect. Dis.* 161: 640–646.
- Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S (2005). Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001 - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 221–230.
- Auksornkitti V, Kamprasert N, Thongkomplew S, Suwannakarn K, Theamboonlers A, Samransamruajkij R, Poovorawan Y (2014). Molecular characterization of human respiratory syncytial virus, 2010-2011: Identification of genotype ON1 and a new subgroup B genotype in Thailand. *Arch. Virol.* 159: 499–507.
- Avila V, Calvo E, Barbosa J, Velandia-Romero ML, Castellanos JE (2018). Description of respiratory syncytial virus genotypes circulating in Colombia. *J. Infect. Dev. Ctries.* 12: 1112–1118.
- Bakker SE, Duquerroy S, Galloux M, Loney C, Rey A, Bhella D, Conner E, Eléouet J-F (2013). The respiratory syncytial virus nucleoprotein – RNA complex forms a left-handed helical nucleocapsid. *J. Virol.* 1734–1738.
- Battles MB, Mclellan JS (2019). Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nat. Rev. Microbiol.* 17.
- Belshaw R, Pybus OG, Rambaut A (2007). The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses. *Genome Res.* 17: 1496–1504.
- Birmingham A, Collins PL (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and

transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 11259–11264.

- Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, Barik S (2007). Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF- κ B-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth. *J. Virol.* 81: 1786–1795.
- Borchers, AT, Chang, C., Gershwin, ME et al. (2013) Respiratory Syncytial Virus - A Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 45, 331-379. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8368-9>.
- Broor S, Bharaj P, Chahar HS (2008). Human metapneumovirus: A new respiratory pathogen. *J. Biosci.* 33: 483–493.
- Broor S, Campbell H, Hirve S, Hague S, Jackson S, Moen A, Nair H, Palekar R, Rajatonirina S, Smith PG, Venter M, Wairagkar N, Zambon M, Ziegler T, Zhang W (2020). Leveraging the Global Influenza Surveillance and Response System for global respiratory syncytial virus surveillance—opportunities and challenges. *Influenza Other Respi. Viruses* 14: 622–629.
- Bukreyev A, Yang L, Fricke J, Cheng L, Ward JM, Murphy BR, Collins PL (2008). The Secreted Form of Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein Helps the Virus Evade Antibody-Mediated Restriction of Replication by Acting as an Antigen Decoy and through Effects on Fc Receptor-Bearing Leukocytes. *J. Virol.* 82: 12191–12204.
- Candeias JAN (1967). Isolamento de Vírus Respiratório Sincicial em crianças com quadros respiratórios agudos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9(1): 27–30.
- Cane PA, Matthews DA, Pringle CR (1992). *Analysis of relatedness of subgroup A respiratory syncytial viruses isolated worldwide.*
- Chanock R, Roizman B, Myers R (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): Isolation, properties and characterization. *Am. J. Epidemiol.* 66: 281–290.
- Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H (2005). Overexpression of the M2-2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Inhibits Viral Replication. 79: 13943–13952.
- Chidgey SM, Broadley KJ (2005). Respiratory syncytial virus infections: characteristics and treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 57: 1371–1381.
- Coates H V., Alling DW, Chanock RM (1966). An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. *Am. J. Epidemiol.* 83: 299–313.
- Collins PL, Graham BS (2008). Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *J. Virol.* 82: 2040–2055.
- Collins PL, Huang YT, Wertz GW (1984). Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes. *J. Virol.* 49: 572–578.
- Collins PL, Fearn R GB (2013). Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 372: 3–38.
- Cox NJ, Bender CA (1995). The molecular epidemiology of influenza viruses. *Semin. Virol.* 6: 359–370.
- Cui, G., Zhu, R., Qian, Y., Deng, J., Zhao, L., Sun, Y., & Wang, F. (2013). Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups a and B in children in recent five consecutive years. *PloS one*, 8(9),

- Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, Kumaki A, Zaraket H, Dapat C, Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H (2010). New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3423–3427.
- De-Paris F, Beck C, Souza Nunes L De, Machado ABMP, Paiva RM, Silva Menezes D Da, Pires MR, Santos RP Dos, Souza Kuchenbecker R De, Barth AL (2014). Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. *Viol. J.* 11: 1–6.
- Escribano-Romero E, Rawling J, García-Barreno B, Melero JA (2004). The Soluble Form of Human Respiratory Syncytial Virus Attachment Protein Differs from the Membrane-Bound Form in Its Oligomeric State but Is Still Capable of Binding to Cell Surface Proteoglycans. *J. Virol.* 78: 3524–3532.
- Eshaghi AR, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, Low DE, Gubbay JB (2012). Genetic variability of human respiratory syncytial virus a strains circulating in Ontario: A novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One* 7.
- Essa S, Owayed A, Altawalah H, Khadadah M, Behbehani N, Al-Nakib W (2015). The prevalence of human bocavirus, human coronavirus-NL63, human metapneumovirus, human polyomavirus KI and WU in respiratory tract infections in Kuwait. *Med. Princ. Pract.* 24: 382–387.
- Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE (2005). *Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults.*
- Falsey AR, Mcelhaney JE, Beran J, Essen GA Van, Duval X, Esen M (2014). Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viral Infections in Older Adults With Moderate to Severe In fl uenza-like Illness. *J. Infect. Dis.* 209: 1873–1881.
- Falsey AR, Walsh EE (2020). Respiratory syncytial virus: An old foe in a new era. *J. Infect. Dis.* 222: 1245–1246.
- Fearn R, Peeples ME, Collins PL (2002). Mapping the Transcription and Replication Promoters of Respiratory Syncytial Virus. *J. Virol.* 76: 1663–1672.
- Ferone EA, Berezin EN, Durigon GS, Finelli C, Felício MCC, Storni JG, Durigon EL, Oliveira DBLD (2014). Clinical and epidemiological aspects related to the detection of adenovirus or respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory tract infection. *J. Pediatr. (Rio. J).* 90: 42–49.
- Frabasile S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, Sierra MJ De, Ruchansky D, Vitoreira N, Berois M, Carballal G, Russi J, Arbiza J (2003). Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. *J. Med. Virol.* 71: 305–312.
- Freitas ARR, Donalisio MR (2016). Respiratory syncytial virus seasonality in Brazil: Implications for the immunisation policy for at-risk populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 111: 294–301.
- Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B (2007). Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *J. Virol.* 81: 8361–8366.
- FVS. Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas. (2019). Situação epidemiológica da Síndrome Respiratória Aguda Grave no Estado do Amazonas.

- García O, Martín M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Breña P, Martínez I, García-Barreno B (1994). Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J. Virol.* 68: 5448–5459.
- Ghazaly M, Nadel S (2018). Characteristics of children admitted to intensive care with acute bronchiolitis. *Eur. J. Pediatr.* 177: 913–920.
- Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J (2002). Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. : 753–757.
- Giallonardo F Di, Kok J, Fernandez M, Carter I, Geoghegan JL, Dwyer DE, Holmes EC, Eden JS (2018). Evolution of human respiratory syncytial virus (RSV) over multiple seasons in New South Wales, Australia. *Viruses* 10: 1–13.
- Gimferrer L, Andrés C, Campins M, Codina MG, Rodrigo JA, Melendo S, Martin MC, Fuentes F, Saiz MR, Esperalba J, Bruguera A, Vilca LM, Armadans L, Pumarola T, Antón A (2016). Circulation of a novel human respiratory syncytial virus Group B genotype during the 2014-2015 season in Catalonia (Spain). *Clin. Microbiol. Infect.* 22: 97.e5-97.e8.
- Glezen PW, Taber LH, Frank AL, Kasel JA (1986). Risk of Primary Infection and Reinfection With Respiratory Syncytial Virus. *Am J Dis Child* 140: 543–546.
- Gould PS, Easton AJ (2007). Coupled Translation of the Second Open Reading Frame of M2 mRNA Is Sequence Dependent and Differs Significantly within the Subfamily Pneumovirinae. 81: 8488–8496.
- Goya S, Galiano M, Nauwelaers I, Trento A, Openshaw PJ, Mistchenko AS, Zambon M, Viegas M (2020). Toward unified molecular surveillance of RSV: A proposal for genotype definition. *Influenza Other Respi. Viruses* 14: 274–285.
- Graham BS, Modjarrad K, McLellan JS, Diseases I, Spring S (2015). Novel Antigens for RSV Vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 35: 30–38.
- Griffin MP, Yuan Y, Therese Takas BS, Domachowske JB, Madhi SA, Manzoni P (2020). Single-Dose Nirsevimab for Prevention of RSV in Preterm Infants. *new Engl. J. of Med.* 383: 415–425.
- Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ (2017). Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* 30: 277–319.
- Haider MSH, Khan WH, Deeba F, Ali S, Ahmed A, Naqvi IH, Dohare R, Alsenaidy HA, Alsenaidy AM, Broor S, Parveen S (2018). BA9 lineage of respiratory syncytial virus from across the globe and its evolutionary dynamics. *PLoS One* 13: 1–22.
- Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC (1991). Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 163: 693–698.
- Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ (1990). Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: Associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J. Infect. Dis.* 162: 1283–1290.
- Haynes AK, Prill MM, Iwane MK, Gerber SI (2014). Respiratory Syncytial Virus — United States , July 2012 – June 2014. 63: 2012–2015.
- Hendricks DA, McIntosh K, Patterson JL (1988). Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *Virus Res.* 11: 15.

- Hervás D, Reina J, Hervás JA (2012). Meteorologic conditions and respiratory syncytial virus activity. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31: 176–181.
- Hibino A, Saito R, Taniguchi K, Zaraket H, Shobugawa Y, Matsui T, Suzuki H, Hrsv J (2018). Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus among children in Japan during three seasons and hospitalization risk of genotype ON1. : 1–19.
- Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T, Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H (2014). Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect. Genet. Evol.* 28: 183–191.
- Hirve S, Crawford N, Palekar R, Zhang W (2020). Clinical characteristics, predictors, and performance of case definition — Interim results from the WHO global respiratory syncytial virus surveillance pilot. *Influ. Other Respi Viruses.*: 647–657.
- Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, Vandepol S (1982). *Mutation Rates of RNA Viruses Rapid Evolution of RNA Genomes.*
- Huang YT, Wertz GW (1982). The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J. Virol.* 43: 150–157.
- Impact-RSV Study Group (1998) Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants. *Pediatrics* 102: 531-537. Doi: 10.1542/peds.102.3.531
- Jafri, Hasan S; MD Wu, Xionghua; Makari, Doris MD ; Henrickson, Kelly J. MD (2013) Distribution of Respiratory syncytial virus subtypes A and B among infants presenting to the emergency department with lower respiratory tract infection or apnea The Pediatric Infectious Disease Journal: abril de 2013 – Vol 32 - Edição 4 - p 335-340 doi: 10.1097 / INF.0b013e318282603a
- Jartti, T., Lehtinen, P., Vuorinen, T., & Ruuskanen, O. (2009). Bronchiolitis: age and previous wheezing episodes are linked to viral etiology and atopic characteristics. The Pediatric infectious disease journal, 28(4), 311–317. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31818ee0c1>
- Johnson JE, Gonzales RA, Olson SJ, Wright PF, Graham BS (2007). The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod. Pathol.* 20: 108–119.
- Johnson PR, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, Collins PL (1987). Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J. Virol.* 61: 3163–3166.
- Kabir MS (2018). Molecular methods for detection of pathogenic viruses of respiratory tract - A review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 8: 237–244.
- Kahn JS, Schnell MJ, Buonocore L, Rose JK (1999). Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing Respiratory Syncytial Virus (RSV) Glycoproteins : RSV Fusion Protein Can Mediate Infection and Cell Fusion. *Virology* 254: 81–91.
- Katoh K, Standley DM (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780.
- Ke Z, Dillard RS, Chirkova T, Leon F, Stobart CC, Hampton CM, Strauss JD, Rajan D, Rostad CA, Taylor J V., Yi H, Shah R, Jin M, Hartert T V., Peebles RS, Graham BS,

- Moore ML, Anderson LJ, Wright ER (2018). The morphology and assembly of respiratory syncytial virus revealed by cryo-electron tomography. *Viruses* 10.
- Kenmoe S, Vernet MA, Mischczak F, Dina J, Schoenhals M, Beng VP, Vabret A, Njouom R (2018). Genetic diversity of human respiratory syncytial virus isolated among children with acute respiratory infections in Southern Cameroon during three consecutive epidemic seasons, 2011-2013. *Trop. Med. Health* 46.
- Kiss G, Holl JM, Williams GM, Alonas E, Vanover D, Lifland AW, Gudheti M, Guerrero-Ferreira RC, Nair V, Yi H, Graham BS, Santangelo PJ, Wright ER (2014). Structural Analysis of Respiratory Syncytial Virus Reveals the Position of M2-1 between the Matrix Protein and the Ribonucleoprotein Complex. *J. Virol.* 88: 7602–7617.
- Krivitskaya V, Komissarova K, Pisareva M, Sverlova M, Fadeev A, Petrova E, Timonina V, Sominina A, Danilenko D (2021). Respiratory syncytial virus g protein sequence variability among isolates from st. Petersburg, russia, during the 2013–2014 epidemic season. *Viruses* 13.
- Krusat T, Streckert HJ (1997). Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch. Virol.* 142: 1247–1254.
- Krzyzaniak MA, Zumstein MT, Gerez JA, Picotti P, Helenius A (2013). Host Cell Entry of Respiratory Syncytial Virus Involves Macropinocytosis Followed by Proteolytic Activation of the F Protein. 9.
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* 1: 398–401.
- Laham FR, Mansbach JM, Piedra PA, Hasegawa K, Sullivan AF, Espinola JA, Camargo CA (2017). Clinical Profiles of Respiratory Syncytial Virus Subtypes A and B among Children Hospitalized with Bronchiolitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 36: 808–810.
- Lamarão LM, Ramos FL, Mello WA, Santos MC, Barbagelata LS, Justino MCA, Silva AF da, Quaresma AJPG, Silva VB da, Burbano RR, Linhares AC (2012). Prevalence and clinical features of respiratory syncytial virus in children hospitalized for community-acquired pneumonia in northern Brazil. *BMC Infect. Dis.* 12: 1–7.
- Law B JL, Carbonell-Estrany X, Simões EAFS (2002). An update on respiratory syncytial virus epidemiology : a developed country perspective. *Respir. Med.* 96: 1–7.
- Levine S, Kaliaber-Franco R, Paradiso PR (1987). Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 68: 2521–2524.
- Liljeroos L, Krzyzaniak MA, Helenius A, Butcher SJ (2013). Architecture of respiratory syncytial virus revealed by electron cryotomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 11133–11138.
- Liu W, Chen D, Tan W, Xu D, Qiu S, Zeng Z, Li X, Zhou R (2016). Epidemiology and clinical presentations of respiratory syncytial virus subgroups A and B detected with multiplex real-time PCR. *PLoS One* 11: 1–13.
- Lu B, Ma C, Brazas R, Jin H (2002). The Major Phosphorylation Sites of the Respiratory Syncytial Virus Phosphoprotein Are Dispensable for Virus Replication In Vitro. *J. Virol.* 76: 10776–10784.
- Madhi SA, Polack FP, Piedra PA, Munoz FM, Trenholme AA, Simões EAF, Swamy GK, Agrawal S, Ahmed K, August A (2020). Respiratory Syncytial Virus Vaccination during Pregnancy and Effects in Infants. *new Engl. J. o f Med.* 383: 426–439.

- Martinelli M, Frati ER, Zappa A, Ebranati E, Bianchi S, Pariani E, Amendola A, Zehender G, Tanzi E (2014). Phylogeny and population dynamics of respiratory syncytial virus (Rsv) A and B. *Virus Res.* 189: 293–302.
- Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS (2002). Correlation between Respiratory Syncytial Virus Genotype and Severity of Illness. *J. Infect. Dis.* 186: 839–842.
- Martínez I, Valdés O, Delfraro A, Arbiza J, Russi J, Melero JA (1999). Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: The use of alternative termination codons and lineage diversification. *J. Gen. Virol.* 80: 125–130.
- Marty A, Meanger J, Mills J, Shields B, Ghildyal R (2004). Association of matrix protein of respiratory syncytial virus with the host cell membrane of infected cells Brief Report. : 199–210.
- Matheson JW, Rich FJ, Cohet C, Grimwood K, Huang QS, Penny D, Hendy MD KJ (2006). Distinct patterns of evolution between respiratory syncytial virus subgroups A and B from New Zealand isolates collected over thirty-seven years. *J. Med. Virol.* 78: 1354–1364.
- Maurice Mufson BA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E (1985). *Two Distinct Subtypes of Human Respiratory Syncytial Virus.*
- Meissner HC (2016). Viral Bronchiolitis in Children (JR Ingelfinger, Ed.). *N. Engl. J. Med.* 374: 62–72.
- Melero JA, Mas V, McLellan JS (2017). Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. *Vaccine* 35: 461–468.
- Melero JA, Moore ML (2013). Influence of respiratory syncytial virus strain differences on pathogenesis and immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 372: 59–82.
- Mitchell I, Defoy I, Grubb E (2017). Burden of Respiratory Syncytial Virus Hospitalizations in Canada. 2017.
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24: 1757–1764.
- Morris JA, Blount RE, Savage RE (1956). Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92: 544–549.
- Moura FEA, Nunes ILAFS, Silva GB, Siqueira MM (2006). SHORT REPORT : Respiratory syncytial virus infections in northeastern brazil : seasonal trends and general aspects. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 165–167.
- Muñoz-Escalante JC, Comas-García A, Bernal-Silva S, Noyola DE (2021). Respiratory syncytial virus B sequence analysis reveals a novel early genotype. *Sci. Rep.* 11.
- Muñoz-Escalante JC, Comas-García A, Bernal-Silva S, Robles-Espinoza CD, Gómez-Leal G, Noyola DE (2019). Respiratory syncytial virus A genotype classification based on systematic intergenotypic and intragenotypic sequence analysis. *Sci. Rep.* 9: 1–12.
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274

- Norrby E, Marusyk H, Orvell C (1970). Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero). *J. Virol.* 6: 237–242.
- Noton SL, Tremaglio CZ, Fearn R (2019). Killing two birds with one stone: How the respiratory syncytial virus polymerase initiates transcription and replication. *PLoS Pathog.* 15: 1–8.
- Obando-pacheco P, Justicia-grande AJ, Rivero-calle I, Rodríguez-tenreiro C, Sly P, Ramilo O (2018). Respiratory Syncytial Virus Seasonality : A Global Overview. *J. Infect. Dis.* 217: 1356–1364.
- Ohuma EO, Okiro EA, Ochola R, Sande CJ, Cane PA, Medley GF, Bottomley C (2012). The Natural History of Respiratory Syncytial Virus in a Birth Cohort: The Influence of Age and Previous Infection on Reinfection and Disease. *Am. J. Epidemiol.* 176: 794–802.
- Otieno JR, Kamau EM, Oketch JW, Ngoi JM, Gichuki AM, Binter S, Otieno GP, Ngama M, Agoti CN, Cane PA, Kellam P, Cotten M, Lemey P, Nokes DJ (2018). Whole genome analysis of local Kenyan and global sequences unravels the epidemiological and molecular evolutionary dynamics of RSV genotype ON1 strains. *Virus Evol.* 4: 1–13.
- Palomo C, Garcia-Barreno B, Penas C, Melero JA (1991). The G protein of human respiratory syncytial virus: Significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. *J. Gen. Virol.* 72: 669–675.
- Papadopoulos NG, Gourgiotis D, Javadyan A, Bossios A, Kallergi K, Psarras S, Tsolia MN, Kafetzis D (2004). Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Respir. Med.* 98: 879–882.
- Pecchini R, Berezin EN, Felício MCC, Passos SD, Souza MCO de, Lima LR de AV de, Ueda M, Matsumoto TK, Durigon EL (2008). Incidence and clinical characteristics of the infection by the Respiratory Syncytial Virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. *Brazilian J. Infect. Dis.* 12: 476–479.
- Peret TCT, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ (2000). Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J. Infect. Dis.*: 1891–1896.
- Peret TCT, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ (1998). Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J. Gen. Virol.* 79: 2221–2229.
- Pomeroy LW, Bjørnstad ON, Holmes EC (2008). The evolutionary and epidemiological dynamics of the paramyxoviridae. *J. Mol. Evol.* 66: 98–106.
- Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, Alverson BK, Baley JE, Gadomski AM, Johnson DW, Light MJ, Marafa NF, Mendonca EA, Phelan KJ, Zorc JJ, Stanko-Lopp D, Brown MA, Nathanson I, Rosenblum E, Sayles S, Hernandez-Cancio S (2014). Clinical Practice Guideline : The Diagnosis , Management , and Prevention of Bronchiolitis abstract. *Pediatrics* 134: 1474–1502.
- Ramaekers K, Rector A, Cuyper L, Lemey P, Keyaerts E, Ranst M van (2020). Towards a unified classification for human respiratory syncytial virus genotypes. *Virus Evol.* 6.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

- Reeves RM, Wijhe M Van, Tong S, Lehtonen T, Stona L, Teirlinck AC, Fernandez V, Li Y (2020). Respiratory Syncytial Virus-Associated Hospital Admissions in Children Younger Than 5 Years in 7 European Countries Using Routinely Collected Datasets. *PLoS One* 13.
- Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb RA, Lee B, Maisner A, Rota P, Siddell SG, Simmonds P (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. 98: 10–14.
- Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA, Wertz GW (1994). The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J. Virol.* 68: 4538–4546.
- Robertson M, Eden J, Levy A, Carter I, Tulloch RL (2021). The spatial-temporal dynamics of respiratory syncytial virus 2 infections across the east-west coasts of Australia during 2016-17. : 1–22.
- Rojó GL, Goya S, Orellana M, Sancilio A, Rodríguez Pérez A, Montali C, García C, Sosa L, Musto A, Alvarez D, Castello A, Viegas M (2017). Unravelling respiratory syncytial virus outbreaks in Buenos Aires, Argentina: Molecular basis of the spatio-temporal transmission. *Virology* 508: 118–126.
- Rose EB, Wheatley A, Langley G, Gerber S, Haynes A (2018). Respiratory Syncytial Virus Seasonality — United States , 2014 – 2017. 67: 2014–2017.
- Sáez-López E, Cristóvão P, Costa I, Pechirra P, Conde P, Guiomar R (2020). Epidemiology and genetic variability of respiratory syncytial virus in Portugal, 2014-2018. *J. Clin. Virol.* 121.
- Salimi V, Viegas M, Trento A, Agoti CN, Anderson LJ, Avadhanula V, Bahl J, Bont L, Brister JR, Cane PA, Galiano M, Graham BS, Hatcher EL, Helfferscee O, Henke DM, Hirve S, Jackson S, Keyaerts E, Kragten-tabatabaie L, Lindstrom S, Nauwelaers I, Nokes DJ, Openshaw PJ, Peret TC, Piedra PA, Ramaekers K, Rector A, Trovão NS, Gottberg A Von, Zambon M, Zhang W, Williams TC, Barr IG, Buchholz UJ (2021). Proposal for Human Respiratory Syncytial Virus Nomenclature below the Species Level. 27: 1–9.
- Santos VM dos, Ferreira J de A, Lima JF, Barbagemata LS, Souza EMA de, Gonçalves M dos S, Sousa EC, Costa IB, Santos MC dos, Sousa RCM, Mello WA (2018). Circulação do vírus respiratório sincicial humano em cinco Estados da Região Amazônica brasileira: primeira descrição do genótipo ON1 no Pará. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 9: 39–46.
- Satake M, Venkatesan S (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J. Virol.* 50: 92–99.
- Schobel SA, Stucker KM, Moore ML, Anderson LJ, Larkin EK, Shankar J, Bera J, Puri V, Shilts MH, Rosas-Salazar C, Halpin RA, Fedorova N, Shrivastava S, Stockwell TB, Peebles RS, Hartert T V., Das SR (2016). Respiratory Syncytial Virus whole-genome sequencing identifies convergent evolution of sequence duplication in the C-terminus of the G gene. *Sci. Rep.* 6: 1–11.
- Sedeyn K, Schepens B SX (2019). Respiratory syncytial virus nonstructural proteins 1 and 2 : Exceptional disrupters of innate immune responses. *PLoS Pathog.* 15: 1–18.
- Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, Polack FP, Balsells E, Acacio S, Aguayo C, Alassani I, Ali A, Antonio M, Awasthi S, Awori JO, Azziz-Baumgartner E, Baggett HC, Baillie VL, Balmaseda A, Barahona A, Basnet

- S, Bassat Q, Basualdo W, Bigogo G, Bont L, Breiman RF, Brooks WA, Broor S, Bruce N, Bruden D, Buchy P, Campbell S, Carosone-Link P, Chadha M, Chipeta J, Chou M, Clara W, Cohen C, Cuellar E de, Dang DA, Dash-yandag B, Deloria-Knoll M, Dherani M, Eap T, Ebruke BE, Echavarría M, Freitas Lázaro Emediato CC de, Fasce RA, Feikin DR, Feng L, Gentile A, Gordon A, Goswami D, Goyet S, Groome M, Halasa N, Hirve S, Homaira N, Howie SRC, Jara J, Jroundi I, Kartasmita CB, Khuri-Bulos N, Kotloff KL, Krishnan A, Libster R, Lopez O, Lucero MG, Lucion F, Lupisan SP, Marcone DN, McCracken JP, Mejia M, Moisi JC, Montgomery JM, Moore DP, Moraleda C, Moyes J, Munywoki P, Mutyara K, Nicol MP, Nokes DJ, Nymadawa P, Costa Oliveira MT da, Oshitani H, Pandey N, Paranhos-Baccalà G, Phillips LN, Picot VS, Rahman M, Rakoto-Andrianarivelo M, Rasmussen ZA, Rath BA, Robinson A, Romero C, Russomando G, Salimi V, Sawatwong P, Scheltema N, Schweiger B, Scott JAG, Seidenberg P, Shen K, Singleton R, Sotomayor V, Strand TA, Sutanto A, Sylla M, Tapia MD, Thamthitawat S, Thomas ED, Tokarz R, Turner C, Venter M, Waicharoen S, Wang J, Watthanaworawit W, Yoshida LM, Yu H, Zar HJ, Campbell H, Nair H (2017). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 390: 946–958.
- Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H, Suzuki Y, Kumaki A, Dapat I, Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H (2009). Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2475–2482.
- Smith DK, Seales S, Budzik C, Jacksonville NH (2017). Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Children. *Am J Dis Child* 95: 94–99.
- Sobrinho FLDV, Aragon DC, Carlotti APCP (2021). Epidemiology and factors associated with the severity of viral acute lower respiratory infection in children hospitalized in Manaus, Amazonas, in 2017-2018: An observational study. *Medicine (Baltimore)*. 100: e25799.
- Spann KM, Tran KC, Collins PL, Irol J V (2005). Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3 , NF- B , and Proinflammatory Cytokines. *J. Virol.* 79: 5353–5362.
- Strimmer K, Haeseler A von (1997). Likelihood-mapping : A simple method to visualize phylogenetic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6815–6819.
- Suchard, M. A. et al. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 4, vey016
- Sullender WM, Sun L, Anderson LJ (1993). Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1224–1231.
- Suryadevara M, Domachowske JB (2021). Epidemiology and seasonality of childhood respiratory syncytial virus infections in the tropics. *Viruses* 13.
- Syd Johnson, Cynthia Oliver, Gregory A. Prince, Val G. Hemming, David S. Pfarr, Sheau-Chiann Wang, Melissa Dormitzer, John O'Grady, Scott Koenig, James K. Tamura, Robert Woods, Geetha Bansal, Debra Couchenour , Eric Tsao, William C. Hall, James F. Young, (1997). Development of a Humanized Monoclonal Antibody (MEDI-493) with Potent In Vitro and In Vivo Activity against Respiratory Syncytial Virus. *The Journal of Infectious Diseases* , Volume 176, Issue 5, Novembre de 1997, Páginas 1215–1224, <https://doi.org/10.1086/514115>
- Taleb SA, Thani AA Al, Ansari K Al, Yassine HM (2018). Human respiratory syncytial virus : pathogenesis , immune responses , and current vaccine approaches. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37: 1817–1827.

- Trento, A., Viegas, M., Galiano, M., Videla, C., Carballal, G., Mistchenko, A.S., Melero J. (2006). The rich-poor divide on America's college campuses is. *J. of Virol.* 80: 975–984.
- Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, Palomo C (2003). Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J. Gen. Virol.* 84: 3115–3120.
- Trento, A., Ábrego, L., Rodríguez-Fernandez, R., González-Sánchez, M. I., González-Martínez, F., Delfraro, A., Pascale, J. M., Arbiza, J., & Melero, J. A. (2015). Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution?. *Journal of virology*, 89(15), 7776–7785. <https://doi.org/10.1128/JVI.00467-15>
- Tseng HF, Sy LS, Ackerson B, Solano Z, Slezak J, Luo Y, Fischetti CA, Shinde V (2020). Severe morbidity and short- And mid- And long-term mortality in older adults hospitalized with respiratory syncytial virus infection. *J. Infect. Dis.* 222: 1298–1310.
- Umuhzoza T, Id WDB, Oyugi J, Musabyimana JP, Kinengyere AA, Mancuso JD (2021). Prevalence of human respiratory syncytial virus , parainfluenza and adenoviruses in East Africa Community partner states of Kenya , Tanzania , and Uganda : A systematic review and meta-analysis (2007 – 2020). *PLoS One* 16: 6–21.
- Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD (2001). Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: Identification of new subgroup A and B genotypes. *J. Gen. Virol.* 82: 2117–2124.
- Vianna LA, Siqueira MM, Volpini L, Louro I, Resende PC (2021). Seasonality, molecular epidemiology, and virulence of Respiratory Syncytial Virus (RSV): A perspective into the Brazilian Influenza Surveillance Program. *PLoS One* 16: 1–20.
- Vieira SE, Stewien KE, Queiroz D., Durigon E., Torok TJ, Anderson LJ, Miyao CR, Hein N, Botosso VF, Pahl MM, A.E. G, B. E, Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Torok TJ, Anderson LJ, Miyao CR, Hein N, Botosso VF, Pahl MM, Gilio AE, Ejzenberg B, Okay Y (2001). Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in Sao Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 43: 125–131.
- Villenave R, Thavagnanam S, Sarlang S, Parker J, Douglas I, Skibinski G, Heaney LG, McKaigue JP, Coyle P V., Shields MD, Power UF (2012). In vitro modeling of respiratory syncytial virus infection of pediatric bronchial epithelium, the primary target of infection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 5040–5045.
- Walsh EE, Hruska J (1983). Monoclonal Antibodies to Respiratory Syncytial Virus Proteins : Identification of the Fusion Protein. 47: 171–177.
- Waris M (1991). Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: Two-year cycles with alternating prevalence of groups A and B. *J. Infect. Dis.* 163: 464–469.
- Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Andrew Ball1' L (1985). *Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein (mRNA sequence/glycoprotein structure/paramyxovirus/O-linked oligosaccharides).*
- White LJ, Waris M, Cane PA, Nokes DJ, Medley GF (2005). The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England & Wales and Finland: Seasonality and cross-protection. *Epidemiol. Infect.* 133: 279–289.
- WHO (2017). Information for the molecular detection of Influenza viruses. *Who*: 1–60.

- World Health Organization - WHO (2014). Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care. *WHO Guidel.*: 1–156.
- World Health Organization (2020a) .Novel coronavirus (2019-nCoV): situation reports - 20.https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200209-sitrep-20-ncov.pdf?sfvrsn=6f80d1b9_4 (acessado em Fev/2020).
- World Health Organization (2020b). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. (Acesso em Março de 2020) <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
- Wu F, Zhao S, Bin Y, Chen Y-M, Wang W, Zhi-Gang S (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579: 265–269.
- Yoshihara K, Le MN, Okamoto M, Wadagni ACA, Nguyen HA, Toizumi M, Pham E, Suzuki M, Nguyen ATT, Oshitani H, Ariyoshi K, Moriuchi H, Hashizume M, Dang DA, Yoshida LM (2016). Association of RSV-A ON1 genotype with Increased Pediatric Acute Lower Respiratory Tract Infection in Vietnam. *Sci. Rep.* 6: 1–10.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7: 203–214.
- Zhou P, Yang X, Wang X, Hu B, Zhang L, Zhang W, Guo H, Jiang R, Liu M, Chen Y, Shen X, Wang X, Zhan F, Wang Y, Xiao G, Shi Z (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579.

ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de Anuência da FVS-AM;



TERMO DE ANUÊNCIA

Declaro, para os devidos fins que a **Diretora Presidente da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas-FVS-AM**, está de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “**Vigilância genômica de vírus respiratórios circulantes nos anos de 2019 e 2020 em Manaus, Amazonas**”, tendo como responsáveis o **Dr. Felipe Gomes Naveca** (Coordenador/Orientador), **Ligia Fernandes Abdalla** (Coorientadora) e **Fernanda Oliveira do Nascimento** (aluna de mestrado), pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógena Hospedeiro – PPGBio da FIOCRUZ-AM, os quais terão apoio e colaboração desta Instituição, de acordo com os termos constantes no **Processo Nº 01.02.017306.00002917.2019**.

Manaus, 16 de setembro de 2019.


ROSEMARY COSTA PINTO,
Diretora Presidente da FVS-AM

ANEXO 2 – PARECER CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: VIGILÂNCIA GENÔMICA DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS CIRCULANTES NOS ANOS DE 2019 E 2020 EM MANAUS, AMAZONAS

Pesquisador: Ligia Fernandes Abdalla

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 2

CAAE: 25430719.6.0000.5016

Instituição Proponente: Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.987.968

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas das Informações Básicas da Pesquisa, arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1464636.pdf", postado na Plataforma Brasil em 30/03/2020. O restante das informações foi retirado do Projeto Detalhado, arquivo "PROJETO_CEP.pdf", postado na Plataforma Brasil em 29/03/2020.

INTRODUÇÃO

Infecções do trato respiratório são comumente ocasionadas por vírus e acometem milhões de pessoas de todos os grupos por ano, em todo o mundo. Um grande número de vírus é relacionado a estas enfermidades, como o Influenza, o Vírus Sincicial Humano e outros, fazendo-se cada vez mais necessário o correto diagnóstico para o tratamento eficaz, uma vez que estes podem evoluir para infecções mais graves como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG). Devido ao impacto anual das epidemias causadas por estes vírus e o seu potencial pandêmico, é de fundamental importância a contínua vigilância, bem como a rápida identificação de novas cepas emergentes e possíveis alterações genéticas. Nesta pesquisa, almejamos caracterizar a epidemiologia molecular dos vírus respiratórios circulantes na cidade de Manaus – Amazonas nos anos de 2019 a 2020. As amostras utilizadas no estudo serão identificadas por RT-PCR pelo Laboratório Central em Saúde Pública – LACEN – AM. Será realizado o sequenciamento das mesmas, seguida de análises

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

filogenéticas comparando-as com sequências mundiais depositadas em banco de dados e os achados moleculares e clínicos serão correlacionados. Desta forma, esperamos compreender a epidemiologia molecular das linhagens virais circulantes na cidade e inferir uma possível origem dos casos encontrados, contribuindo assim para a vigilância, o controle e a prevenção de novos surtos na região.

HIPÓTESE

A Amazônia apresenta grande biodiversidade de microrganismos, principalmente de vírus, isto se deve grande parte às suas características geoclimáticas, porém, outro fator importante observado é o intenso fluxo migratório através de suas fronteiras, fato que pode facilitar a entrada de vírus procedentes de outros países vizinhos, tornando ainda mais complexa a realidade epidemiológica da região. Além de identificar os vírus circulantes, a vigilância epidemiológica das infecções provocadas por vírus respiratórios é importante para ter-se conhecimento de possíveis mudanças no perfil genético dos mesmos, uma vez que já se sabe da grande diversidade genética e o rápido processo evolutivo característico destes microrganismos. Devido a isso vários questionamentos foram feitos, principalmente após o surto de vírus respiratórios que houve no Estado no início do ano de 2019, tais como: Quais vírus estão circulando na região? Quais mutações apresentam? Há ou houve a introdução de novas linhagens de vírus respiratórios?

METODOLOGIA

1. Coleta das amostras realizada nas unidades de saúde e enviadas ao LACEN-AM: As unidades de saúde realizam a coleta rotineiramente por aspirado de nasofaringe ou swab combinado (nasal e oral) entre o terceiro e o sétimo dia após o início dos sintomas do paciente. Em seguida, as amostras são transportadas em tubos contendo 3 mL de Meio de Transporte Viral (MTV) ou PBS e são encaminhadas para o LACEN – AM onde é realizado o diagnóstico por RT-qPCR e posterior notificação do resultado para as autoridades de saúde.
2. PCR em tempo real com Transcrição Reversa (RT-qPCR) realizada como rotina pelo Lacen: No Lacen-AM a detecção dos agentes virais é realizada seguindo um protocolo de RT-qPCR em tempo real desenvolvido pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (EUA) (WHO 2009a), onde são detectados os vírus Influenza (A e B), Adenovírus, Metapneumovirus, Vírus Sincicial Respiratório Humano e Parainfluenza (1 a 3).
3. Seleção das amostras de interesse ao estudo: Após a identificação do agente viral realizada como rotina no Lacen-AM, uma alíquota de 200l ou mais das amostras positivas para vírus

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.987.968

respiratórios, principalmente RSV e Influenza (A e B) será disponibilizada e encaminhada ao Laboratório de Virologia no ILMD – FIOCRUZ AMAZÔNIA e armazenada a -80°C até a sua utilização.

4. Extração do RNA viral: As extrações do RNA serão realizadas com o kit comercial Biogene RNA kit sendo utilizado 170 l de amostra, seguindo as recomendações descritas pelo fabricante. O RNA será eluído em 50 L de água livre de nucleases do próprio kit, podendo ser imediatamente usado ou estocado a -80°C. O controle positivo MS2 será utilizado em todas as extrações.

5. Amplificação dos fragmentos gênicos para sequenciamento por PCR convencional: Para amplificação do fragmento gênico para sequenciamento o cDNA será sintetizado utilizando a enzima Super Script IV com volume final de 20 L e primers randômicos. Em resumo, os genes alvos para Influenza, como o HA e NA, para VSR e outros vírus serão amplificados por RT-PCR seguindo o protocolo divulgado pela OMS (2009) e alguns primers desenhados pelo grupo de pesquisa. Os amplicons serão purificados por precipitação com Polietilenoglicol (PEG), cujo objetivo é a remoção de nucleotídeos e iniciadores não incorporados na PCR que podem vir a interferir na reação de sequenciamento, utilizando o protocolo de Humphreys et al. 1975 adaptado pelo grupo. Em seguida, serão submetidos ao sequenciamento capilar tomando como base o método de dideoxynucleotídeos, utilizando os iniciadores apresentados na tabela em anexo, cujos alvos são as regiões utilizadas para genotipagem destes vírus.

6. Análises filogenéticas: As amostras obtidas neste estudo serão comparadas a sequências mundiais disponíveis no GenBank (ncbi.nlm.nih.gov), também com o auxílio do Programa BEAST v1. 10. 1 e outras ferramentas auxiliares como BLASTn, PhyML 3.0.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão incluídas nesta pesquisa amostras positivas testadas no painel de diagnóstico do LACEN (Adenovírus, Metapneumovírus, Parainfluenza 1, 2 e 3, Vírus Sincicial Respiratório, Influenza e atualmente SARS-CoV-2), bem como amostras negativas onde irão ser testadas para outros vírus respiratórios, como por exemplo Bocavírus, Rinovírus e Coronavírus (OC43, 229E, NL63) que não são testados no LACEN.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não foram apresentados.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Página 03 de 07

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.987.968

Caracterizar geneticamente os vírus respiratórios circulantes no estado do Amazonas - Brasil, nos anos de 2019 e 2020 oriundos de pacientes com sintomas de Síndrome Gripal e/ou Síndrome Respiratória Aguda Grave.

OBJETIVOS SECUNDÁRIO

- Caracterizar os genes da Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA) de Influenza;
- Caracterizar o gene G de Vírus Sincicial Respiratório Humano (RSV);
- Testar amostras negativas para outros vírus respiratórios, como por exemplo Rinovírus, Bocavírus, Coronavírus;
- Realizar análises filogenéticas dos vírus identificados;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Não existem riscos associados à participação deste estudo, uma vez que trabalharemos com as amostras de rotina enviadas ao Lacen - AM. No presente estudo serão utilizadas amostras de aspirado nasofaríngeo ou swab combinado enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (LACEN-AM) como rotina para o diagnóstico laboratorial de Síndrome Gripal e/ou Síndrome Respiratória Aguda Grave, portanto o diagnóstico é realizado pelo LACEN-AM. Portanto, não haverá nova coleta de material do paciente além daquela em que ele já foi submetido para fins de rotina diagnóstica, assim não existirão riscos associados à participação neste estudo. Para o paciente, poderá haver desconforto no momento da coleta do material por aspiração ou swab combinado (nasofaringe) estéril no momento da coleta em unidade de saúde para fins de rotina diagnóstica, mas ressalta-se que isso não será realizado pelos participantes deste estudo e sim pelos profissionais de saúde da unidade de saúde em que o paciente procurar atendimento.

BENEFÍCIOS

O LACEN-AM realiza o diagnóstico das amostras recebidas rotineiramente para os vírus: Influenza (A e B), Adenovírus, Metapneumovírus, Vírus Sincicial Respiratório Humano, Parainfluenza (1, 2 e 3) e SARS-CoV-2 e é de sua competência a liberação dos resultados. Após o resultado disponibilizado pelo LACEN ao paciente e ao seu médico serão selecionadas amostras que se adequem aos objetivos do presente projeto, tais como amostras positivas para qualquer vírus respiratório da rotina do LACEN. Assim, o benefício do diagnóstico laboratorial para o paciente e a equipe que o assiste é uma obrigação do LACEN com relação aos agentes infecciosos

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Página 04 de 07

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.987.968

testados na rotina. A inclusão de amostras negativas na rotina do LACEN no presente projeto trará benefícios indiretos a população em geral, visto que a informação gerada neste projeto servirá para subsidiar as ações de vigilância e consequentemente de melhoria no diagnóstico de rotina. Além disso, o conhecimento do perfil genético dos vírus que circulam em nossa região é mais uma ferramenta que auxiliará a Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas. Ressalta-se que todos os resultados que obtivermos serão enviados ao LACEN e a Fundação de Vigilância em Saúde por meio de relatório.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo descritivo, do tipo transversal, para realizar a vigilância genômica de vírus respiratórios circulantes nos anos de 2019 e 2020 na cidade de Manaus, Amazonas. Será realizada uma caracterização genética e análises filogenéticas dos vírus respiratórios circulantes oriundos de pacientes com sintomas de Síndrome Gripal e/ou Síndrome Respiratória Aguda Grave.

Serão analisadas amostras biológicas (aspirado de nasofaringe ou swab) enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (LACEN-AM), positivas e negativas de acordo com o painel de diagnóstico laboratorial (Adenovírus, Metapneumovírus, Parainfluenza 1, 2 e 3, Vírus Sincicial Respiratório, Influenza e SARS-CoV-2). Adicionalmente serão investigados outros vírus respiratórios não incluídos no painel do LACEN (como por exemplo OC43, 229E e NL63).

Não haverá novo contato nem nova coleta de material, nem emprego de informações pessoais dos pacientes. Serão utilizados apenas dados sociodemográficos, tais como sexo e idade, data e município da coleta. Foi solicitada dispensa de obtenção de TCLE.

Os resultados obtidos na pesquisa serão enviados ao LACEN-AM e à Fundação de Vigilância em Saúde por meio de relatórios.

Previsão de início do estudo em mai/2020 e encerramento previsto para dez/2022

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.987.968

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram identificados óbices éticos no protocolo.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|-------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1464636.pdf | 30/03/2020 23:34:09 | | Aceito |
| Outros | Carta_resposta_CEP.pdf | 30/03/2020 23:32:53 | Ligia Fernandes Abdalla | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO_CEP.pdf | 29/03/2020 01:02:56 | Ligia Fernandes Abdalla | Aceito |
| Outros | CARTA_LACEN.jpeg | 29/03/2020 00:59:20 | Ligia Fernandes Abdalla | Aceito |
| Outros | Orgonograma_FVS.pdf | 29/03/2020 00:50:34 | Ligia Fernandes Abdalla | Aceito |
| Cronograma | Cronograma_CEP.pdf | 29/03/2020 00:46:41 | Ligia Fernandes Abdalla | Aceito |
| Outros | TCUD_2020_CEP.pdf | 29/03/2020 00:37:56 | Ligia Fernandes Abdalla | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhaDeRostoPlataformaBrasil.pdf | 07/11/2019 00:44:22 | Ligia Fernandes Abdalla | Aceito |
| Outros | Termo_anuencia_virus_respiratorios.pdf | 04/11/2019 19:25:41 | Ligia Fernandes Abdalla | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

ANEXO 3 – ANÁLISES DO RSVsurver

RSVsurver Result

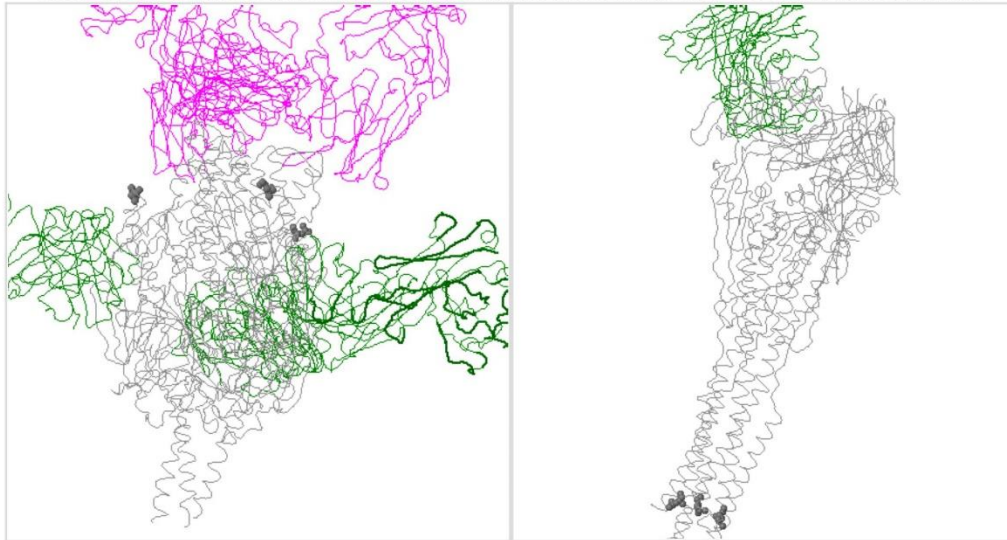
21/06/2021 11:09

The main application scenario for RSVsurver is to highlight phenotypically or epidemiologically interesting candidate mutations for further research and should ideally be combined with experimental testing and verification of any predicted phenotypes. Please take a look at the [Frequently Asked Questions](#) if you are new to RSVsurver.

Enabled by



3D structural visualization of the RSV F glycoprotein with mutations identified in the query sequences shown as colored balls



Spin ON Spin OFF Save IMAGE

Spin ON Spin OFF Save IMAGE

prefusion RSV F glycoprotein (PDB: 6apd, X-ray 4.1 Angstrom) in complex with AM22 (magenta ribbon) & Infant Antibody ADI-19425 (green ribbon).

postfusion RSV F glycoprotein (PDB: 6apb, X-ray 3.0 Angstrom) in complex with Infant Antibody ADI-14359 (green ribbon).

% AA identity:
99.477%

mutations:
3

List of variations displayed in structure (nearest residue if in loop/termini region)

List of mutations not in structure
L4P(N-term) T13A(N-term)

Q172H

| Query | Clade | Best reference hit | %id | %coverage | #mut: | List of mutations |
|------------------------------|-------|---|-------|-----------|-------|-------------------|
| VR002_BR_AM_Manus 2019-05-08 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | 100% | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | y97I#he |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.4% | 100% | 2 | A74V, V99A |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 97.8% | 100% | 2 | I2T, L21F |

<https://c91b15a9abed.ap.ngrok.io/cgi-bin/rsvmapBlast.pl>

Página 1 de 6

| | | | | | | |
|---------------------------------|-------|---|-------|-----------------------|----|---|
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.9% | 100% | 2 | E148G, S1320P |
| VR005_BR_AM_Manauas 2019-05-31 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | 100% | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | v971#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.7% | 100% | 4 | A74V, V99A, P192S#a, I310V |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.9% | 100% | 1 | I2T |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.8% | 100% | 5 | K1038R, S1320P, F1664L, P1720S, R1764K |
| VR006_BR_AM_Manauas 2019-04-202 | Other | NS1 hRSV/A/England/397/2017 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | NS2 hRSV/A/England/397/2017 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/A/England/397/2017 | 99.7% | 100% | 1 | V352A |
| | | P hRSV/A/England/397/2017 | 99.6% | 100% | 1 | L55P |
| | | M hRSV/A/England/397/2017 | 99.6% | 100% | 1 | M43I |
| | | SH hRSV/A/England/397/2017 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/A/England/397/2017 | 96.0% | 100% | 13 | P71L, H90Y, L101F, G106E, I134K, L142S, G224E, S243I, I265L, D284G, E295D, Y304H, T320A |
| | | F hRSV/A/England/397/2017 | 99.8% | 100% | 1 | T13A |
| | | M2-1 hRSV/A/England/397/2017 | 99.5% | 100% | 1 | S176P |
| | | M2-2 hRSV/A/England/397/2017 | 97.7% | 100% | 2 | Y24C, S44N |
| | | L hRSV/A/England/397/2017 | 99.4% | 100% | 13 | S100L, N143D, P171L, T179S, R256K, Y598H, D1034E, L1438Q, I1653V, K1661N, N1723S, E1725G, G1731D |
| VR007_BR_AM_Manauas 2019-04-22 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.2% | 100% | 1 | I43V |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | v971#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.5% | 100% | 1 | G58R |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 97.7% | 99.7% | 7 | A74V, T131A, I137T, I252T, L284P, P304L, T306I |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.8% | 100% | 1 | Q172H#hao |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.5% | 100% | 1 | K189Q |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 97.8% | 100% | 2 | I2T, M27T |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.9% | 100% | 2 | I369T, T1987I |
| VR013_BR_AM_Manauas 2019-05-15 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | v971#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.6% | 100% | 1 | K222I |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.5% | 100% | 1 | G58R |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic- | 98.1% | | 6 | A74V, T131A, I137T, I252T, L284P, T306I |

| | | | | | | |
|--------------------------------|-------|---|-------|--------------|---|---|
| | | VIDRL056/2019 | | <u>99.7%</u> | | |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 97.8% | <u>100%</u> | 2 | I2T, M27T |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.9% | <u>100%</u> | 2 | I369T, T1987T |
| VR016_BR_AM_Manauas 2019-05-09 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | <u>100%</u> | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | <u>100%</u> | 1 | V97I#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.7% | <u>100%</u> | 4 | A74V, V99A, P192S#A, I310V |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.9% | <u>100%</u> | 1 | I2T |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.8% | <u>100%</u> | 4 | S1320P, F1664L, P1720S, R1764K |
| VR018_BR_AM_Manauas 2019-02-21 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | <u>100%</u> | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | <u>100%</u> | 1 | V97I#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.4% | <u>100%</u> | 2 | A74V, V99A |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 97.8% | <u>100%</u> | 2 | I2T, L21F |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 1 | S1320P |
| VR019_BR_AM_Manauas 2019-05-10 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | <u>100%</u> | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | <u>100%</u> | 1 | V97I#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.5% | <u>100%</u> | 1 | A39V |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.4% | <u>100%</u> | 5 | A74V, V99A, P192S#A, P245S, I310V |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | <u>100%</u> | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.9% | <u>100%</u> | 1 | I2T |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.8% | <u>100%</u> | 5 | K1038R, S1320P, F1664L, P1720S, R1764K |

| | | | | | | |
|--------------------------------------|-------|---|-------|---|----|--|
| VR020_BR_AM_Manaus 2019-05-082 | Other | NS1 hRSV/A/England/397/2017 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | NS2 hRSV/A/England/397/2017 | 99.2% | 100% | 1 | H5Q |
| | | N hRSV/A/England/397/2017 | 99.7% | 100% | 1 | V352A |
| | | P hRSV/A/England/397/2017 | 99.6% | 100% | 1 | L55P |
| | | M hRSV/A/England/397/2017 | 99.6% | 100% | 1 | M43I |
| | | SH hRSV/A/England/397/2017 | 98.4% | 100% | 1 | I38S |
| | | G hRSV/A/England/397/2017 | 96.6% | 100% | 11 | P71L, H90Y, L101F, I134K, L142S, G224E, S243I, K262E, I265L, D284G, Y304H |
| | | F hRSV/A/England/397/2017 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/A/England/397/2017 | 99.5% | 100% | 1 | S176P |
| | | M2-2 hRSV/A/England/397/2017 | 97.7% | 100% | 2 | Y24C, S44N |
| L hRSV/A/England/397/2017 | 99.4% | 100% | 14 | N47Y, N143D, P171L, T179S, R256K, Y598H, Y845H, L1438Q, I1653V, K1661N, N1723S, E1725G, G1731D, Y2163N | | |
| VR022_BR_AM_Manaus 2019-04-12 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.2% | 100% | 1 | D6N |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | y97Y#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.0% | 100% | 4 | A74V, ins229T, Y285H, T287A |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.9% | 100% | 3 | T65A, T1796S, I2087T | | |
| VR023_BR_AM_Iranduba 2019-04-12 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | 100% | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | y97Y#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.0% | 100% | 3 | A74V, V99A, S305F |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 97.8% | 100% | 2 | I2T, L21F |
| L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 1 | S1320P | | |
| VR024_BR_AM_Manaus 2019-04-11 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | y97Y#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.4% | 100% | 2 | A74V, Y285H |

| | | | | | | |
|-------------------------------|-------|---|-------|----------------------|---|------------------------|
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.8% | 100% | 1 | L4P |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.9% | 100% | 1 | I2T |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 1 | T476I |
| | | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | 100% | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.2% | 100% | 1 | T60A |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | V97I#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| VR026_BR_AM_Manaus 2019-04-16 | Other | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.4% | 100% | 2 | A74V, V99A |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 96.7% | 100% | 3 | I2T, L21F, E80G |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 1 | S1320P |
| | | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | 100% | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.2% | 100% | 1 | D6N |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | V97I#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| VR027_BR_AM_Manaus 2019-04-16 | Other | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.4% | 100% | 2 | A74V, V99A |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 97.8% | 100% | 2 | I2T, L21F |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.9% | 100% | 2 | S1320P, N1905Y |
| | | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | 100% | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | V97I#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| VR028_BR_AM_Manaus 2019-04-24 | Other | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.4% | 100% | 2 | A74V, V99A |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 97.8% | 100% | 2 | I2T, L21F |
| | | L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.9% | 100% | 2 | F305Y, S1320P |

| | | | | | | |
|--------------------------------------|-------|---|----------------------|----------------------|--|--|
| VR029_BR_AM_Manacapuru 2004-09 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | 100% | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | V97I#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.5% | 100% | 1 | F10Y |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.7% | 100% | 4 | A74V, V99A, P192S#A, I310V |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.9% | 100% | 1 | I2T |
| L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | | 99.8% | 100% | 5 | K1038R, S1320P, F1664L, P1720S, R1764K | |

| | | | | | | |
|--------------------------------------|-------|---|----------------------|----------------------|--|---|
| VR030_BR_AM_Manaus 2019-04-25 | Other | NS1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.3% | 100% | 1 | K74E |
| | | NS2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | N hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 99.7% | 100% | 1 | V97I#ho |
| | | P hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | SH hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.5% | 100% | 1 | A39V |
| | | G hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.4% | 100% | 5 | A74V, V99A, P192S#A, P245S, I310V |
| | | F hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-1 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 100% | 100% | 0 | no mutations |
| | | M2-2 hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | 98.9% | 100% | 1 | I2T |
| L hRSV/B/Australia/Vic-VIDRL056/2019 | | 99.8% | 100% | 5 | K1038R, S1320P, F1664L, P1720S, R1764K | |

[Right-click here to save/download query summary report table for archiving or import to Excel \(Tab-separated, one query per line\) \(protseqs\)](#)
[Right-click here to save/download location to mutation summary report table for archiving or import to Excel \(Comma-separated\)](#)

[Back to Reference Selection](#)



Developed by A*STAR Bioinformatics Institute (BII), Singapore.
 © 2021 A*STAR Bioinformatics Institute (BII).

RSVsurver