

Ministério da Saúde

FIUCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIELA BANDEIRA BRANCANTE MACHADO

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VIRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO EM CRIANÇAS COM INFEÇÕES RESPIRATÓRIAS DE 2006 A 2010.

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e
Molecular

Orientador: Prof (a). Dr(a). Marilda Mendonça Siqueira

RIO DE JANEIRO

2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

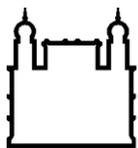
M149 Machado, Daniela Bandeira Brancante

Identificação e caracterização molecular do vírus sincicial respiratório humano em crianças com infecções respiratórias de 2006 a 2010 / Daniela Bandeira Brancante Machado. – Rio de Janeiro, 2012.
xviii, 64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012.
Bibliografia: f. 65-80

1. Vírus Sincicial Respiratório. 2. Proteína G. 3. Genótipos. 4. RNA polimerase. 5. RNA dependente. I. Título.

CDD 579.256



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: DANIELA BANDEIRA BRANCANTE MACHADO

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VIRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO EM CRIANÇAS COM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS DE 2006 A 2010.

ORIENTADOR: Prof(a). Dr(a). Marilda Mendonça Siqueira

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Juliana de Almeida Leite - Presidente
Prof. Dr. Juan Ramon Arbiza
Prof. Dr. Monick Lindenmeyer Guimarães
Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão
Prof. Dr. Fernando Couto Motta

Rio de Janeiro, 30 de Julho de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marilda Mendonça Siqueira, minha orientadora, pela confiança, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realizar este projeto.

Ao Dr. Thiago Moreno, profissional íntegro e competente, por suas correções precisas em todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. Fernando Mota, pela valiosa ajuda na realização do projeto e, pela disposição em sempre ajudar da melhor maneira possível.

A Dra. Juliana Leite, pelas valiosas sugestões e correções fundamentais na elaboração do manuscrito.

A toda equipe do Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo e amigos que por lá já passaram, pela troca constante de aprendizado, pelos conselhos, pelas conversas e pelos momentos de confraternização.

Aos meus queridos pais, Roberto e Vera Lúcia, responsáveis pela minha formação e caráter, por terem me ensinado a seguir em frente e superar as dificuldades que encontrasse pelo caminho. Além do apoio e estímulos inesgotáveis.

Aos meus maravilhosos irmãos, Pedro e Ana Lúcia, por sempre me alegrarem, seja guiando meus passos como irmão mais velho ou me fazendo voltar a ser criança como minha irmã mais nova. Agradeço, também, à Julie, Oscar e o mais novo membro da família, pelo apoio sempre oferecido.

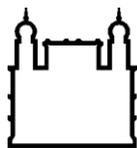
Aos funcionários, sempre solícitos, da Secretaria Acadêmica de pós-graduação na Fiocruz, que além de prestativas sempre demonstraram apoio e carinho.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."

(Cora Coralina)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VIRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO EM CRIANÇAS COM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS DE 2006 A 2010.

RESUMO

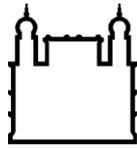
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniela Bandeira Brancante Machado

Vírus Sincicial Respiratório (VSR) humano pertence à família *Paramyxoviridae* sendo o principal patógeno causador de infecções do trato respiratório inferior, em crianças menores de cinco anos, em todo o mundo. Esse vírus infecta aproximadamente 90% das crianças menores de dois anos e embora há mais de 20 anos o desenvolvimento de uma vacina tenha sido estudado, ainda não há nenhuma eficiente e segura. O VSR é classificado em grupos A e B, com uma variabilidade, entre eles, em torno de 50% de aminoácidos da proteína G. Existem diferentes genótipos dentro de cada grupo que também são identificados pela proteína G. Essa proteína, que tem de 282 a 319 aminoácidos dependendo do grupo, é uma glicoproteína que promove a adsorção do vírus à célula. A variabilidade está concentrada no ectodomínio, que consiste em duas regiões variáveis separados por uma região conservada, presente em ambos os grupos. O VSR possui uma enzima RNA polimerase que catalisa a reação RNA polimerase RNA dependente (RpRd) e é alvo de ação do antiviral ribavirina. A maior subunidade dessa enzima é a proteína L que apresenta seis blocos conservados identificados de I a VI, flanqueados por sequências variáveis. Nos blocos II e III encontramos os sítios de ligação de RNA genômico e o sítio ativo da polimerase viral, respectivamente. O objetivo desse estudo foi identificar os genótipos de VRS, bem como sua diversidade genética no

que diz respeito aos genes G e L, em crianças menores de cinco anos com infecções respiratórias. Para isso, realizamos um estudo retrospectivo no qual aspirado de nasofaringe positivo para VSR pelas metodologias de Imunofluorescência Indireta ou RT-PCR dos estados do Rio de Janeiro (2006 a 2010) e do Rio Grande do Sul (2009) foram utilizados. Os últimos dois terços do gene G foram sequenciados em 125 amostras, nas quais 74 eram VSR A e 51 amostras eram VSR B. Enquanto para o gene L, foram sequenciados os blocos II e III de 28 amostras. Observamos que a maioria das amostras do grupo A pertencem ao genótipo GA2 e apenas três ao genótipo GA5, enquanto no grupo B a maioria das amostras era do genótipo BA e cinco amostras do genótipo GB3. Identificamos diversos polimorfismos no gene G; enquanto no gene L, os blocos II e III, amplamente conservados, os polimorfismos foram sinônimos na sequência de nucleotídeos.

Palavras-chaves: Vírus Sincicial Respiratório, proteína G, genótipos, RNA polimerase RNA dependente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN CHILDREN WITH
RESPIRATORY INFECTIONS, FROM 2006 TO 2010.**

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniela Bandeira Brancante Machado

Respiratory Syncytial Virus (RSV) belongs to the family Paramyxoviridae human being the main causative pathogen of lower respiratory tract infections in children under five years worldwide. This virus infects approximately 90% of children under two years and although there are more than 20 years developing a vaccine has been studied, there is still no effective and safe. RSV is classified into groups A and B, with variability between them, around 50% amino acid protein G. Different genotypes within each group are also identified by protein G. This protein, which has 282 to 319 amino acids depending on the group, is a glycoprotein that promotes the adsorption of the virus to the cell. The variability is concentrated in the ectodomain, which consists of two variable regions separated by a conserved region present in both groups. RSV has an RNA polymerase enzyme that catalyzes the reaction RNA dependent RNA polymerase (RpRd) and is the target of action of the antiviral ribavirin. The largest subunit of this enzyme is protein L which has six conserved blocks identified from I to VI, flanked by variable sequences. In blocks II and III we find the binding sites and active site genomic RNA viral polymerase, respectively. The aim of this study was to identify the genotypes of RSV, as well as their genetic diversity with respect to G and L genes in children under five years with respiratory

infections. For this, we conducted a retrospective study in which nasopharyngeal aspirate positive for RSV by indirect immunofluorescence methods or RT-PCR in the states of Rio de Janeiro (2006-2010) and Rio Grande do Sul (2009) were used. The last two thirds of the G gene were sequenced in 125 samples in which 74 were RSV A and RSV B. 51 samples were As for the L gene, were sequenced blocks II and III of 28 samples. We note that most of the samples belong to group A genotype GA2 and only three genotype GA5, while in group B was most samples the genotype AB and five samples of genotype GB3. Identified several gene polymorphisms G, while the L gene, blocks II and III, largely preserved in the polymorphisms were synonymous nucleotide sequence.

Keywords: Respiratory Syncytial Virus, G protein, genotypes, RNA dependent RNA polymerase.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico e classificação do Vírus Sincicial Respiratório	1
1.2. Morfologia e genoma viral	2
1.2.1. Proteína G.....	5
1.2.2. Proteína L	7
1.3. Caracterização antigênica e gênica	8
1.4. Replicação viral.....	10
1.5. Aspectos clínicos	12
1.6. Aspectos imunológicos	13
1.7. Diagnóstico laboratorial.....	16
1.8. Epidemiologia da infecção por VSR.....	17
1.9. Transmissão, prevenção e terapêutica	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	23
3.1. Coleta de amostras clínicas	23
3.2. População estudada	24
3.3. Etapas do estudo	25

3.4.	Extração de RNA	26
3.5.	Identificação dos grupos do Vírus Sincicial Respiratório.....	26
3.5.1.	RT-PCR multiplex	26
3.5.2.	Análise dos produtos amplificados.....	27
3.6.	Amplificação do fragmento gênico para sequenciamento	27
3.6.1.	RT-PCR do fragmento gênico G	27
3.6.2.	RT-PCR do fragmento gênico L.....	27
3.7.	Purificação do produto da reação de RT-PCR.....	28
3.8.	Reação de sequenciamento para os fragmentos gênicos G e L.....	29
3.9.	Purificação do DNA.....	29
3.10.	Sequenciamento e análise das sequências	29
3.11.	Análise dos dados e construção das topologias	30
3.11.1.	Gene G	30
3.11.2.	Gene L	31
3.12.	Aspectos éticos.....	31
4.	RESULTADOS	32
4.1.	Identificação dos grupos circulantes	32
4.2.	Análise filogenética do gene G.....	34
4.2.1.	Análise da variabilidade na sequência de aminoácidos do gene G	
– VSR A	36	

4.2.2. Análise da variabilidade na sequência de aminoácidos do gene G - VSR B	44
4.3. Padronização da reação de RT-PCR do gene L.....	51
4.3.1. Análise filogenética da variabilidade na sequência de nucleotídeos e aminoácidos do gene L.....	52
5. DISCUSSÃO.....	55
5.1. Identificação dos grupos de VSR e co-circulação dos genótipos....	56
5.2. Caracterização molecular dos segmentos gênicos G e L	59
5.2.1. Gene G	59
5.2.2. Gene L	60
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Lista de Figuras

Figura 1-1 Taxonomia do Vírus Sincicial Respiratório humano.....	2
Figura 1-2 Micrografia eletrônica de transmissão do Vírus Sincicial Respiratório...3	
Figura 1-3 Organização dos genes no genoma do Vírus Sincicial Respiratório.3	
Figura 1-4 Modelo representativo do Vírus Sincicial Respiratório humano.....4	
Figura 1-5 Estrutura linear da proteína G.....	6
Figura 1-6 Estrutura tridimensional da proteína G.	7
Figura 1-7 Esquema linear da proteína L do VSR.....	8
Figura 1-8 Diagrama da replicação e transcrição do Vírus Sincicial Respiratório. 12	
Figura 3-1 Fluxograma das etapas e técnicas utilizadas para a realização do presente estudo.	25
Figura 4-1 Gel de agarose a 2% após eletroforese apresentando os produtos da amplificação do gene da proteína G para os diferentes grupos do Vírus Sincicial Respiratório, obtidos na reação de RT-PCR multiplex.....	32
Figura 4-2 Fluxograma das amostras incluídas no estudo.....	33
Figura 4-3 Distribuição das amostras VSR A e VSR B segundo ano de coleta (2006 a 2010).....	33
Figura 4-4 Relação filogenética das amostras de Vírus Sincicial Respiratório (região da segunda porção variável do gene G) grupo A circulantes no Brasil de 2006 a 2010.....	35
Figura 4-5 Relação filogenética das amostras de Vírus Sincicial Respiratório (região da segunda porção variável do gene G) grupo B circulantes no Brasil de 2006 a 2010.....	36
Figura 4-6. Análise filogenética entre as 74 sequências do gene G do Vírus Sincicial Respiratório do grupo A.....	38

Figura 4-7 Alinhamento dos aminoácidos inferidos das 74 sequências da proteína G do Vírus Sincicial Respiratório e a amostra padrão Long (AY911262).	39
Figura 4-8 Alinhamento dos aminoácidos inferidos das 74 sequências da proteína G do Vírus Sincicial Respiratório e a amostra padrão Long (AY911262).	40
Figura 4-9 Análise filogenética entre as 51 sequências do gene G do Vírus Sincicial Respiratório do grupo B.	45
Figura 4-10 Alinhamento dos aminoácidos inferidos das 46 sequências da proteína G do Vírus Sincicial Respiratório e a amostra padrão AY3333364.	46
Figura 4-11 Alinhamento dos aminoácidos inferidos das 46 sequências da proteína G do Vírus Sincicial Respiratório e a amostra padrão AY3333364.	47
Figura 4-12 Alinhamento dos aminoácidos inferidos das 5 sequências da proteína G do Vírus Sincicial Respiratório do genótipo GB3 e a amostra padrão CH18537.	48
Figura 4-13 Gel de agarose a 2% após eletroforese, apresentando os produtos obtidos na reação de RT-PCR do protocolo estabelecido com a enzima Superscript III da invitrogen.	51
Figura 4-14 Gel de agarose a 2% após eletroforese, apresentando os produtos obtidos na reação de RT-PCR dos fragmentos do gene L, em duas condições diferentes.	52
Figura 4-15 Análise filogenética entre as 21 sequências do gene L do Vírus Sincicial Respiratório do grupo A.	53
Figura 4-16 Análise filogenética entre as 7 sequências do gene L do Vírus Sincicial Respiratório do grupo B.	54

Índice de tabelas

Tabela 1-1 Resumo das funções das proteínas do Vírus Sincicial Respiratório	4
Tabela 3-1 Distribuição das amostras incluídas no estudo, segundo o ano e a unidade federativa.	24
Tabela 3-2 Informações gerais dos iniciadores utilizados para amplificação do gene L.....	28
Tabela 4-1 Substituições nos resíduos de aminoácidos (região C-terminal da proteína G) nas sequências estudadas do Vírus Sincicial Respiratório do grupo A circulantes durante os anos de 2006 a 2010, em relação à amostra padrão Long.....	41
Tabela 4-2 Polimorfismos encontrados nas amostras do genótipo GA2 do Vírus Sincicial Respiratório em relação a diferentes amostras na europa e estados unidos.	42
Tabela 4-3 Polimorfismos encontrados nas amostras do genótipo GA2 do Vírus Sincicial Respiratório em relação a diferentes amostras na Ásia.....	43
Tabela 4-4 Polimorfismos encontrados nas amostras do genótipo GA5 do Vírus Sincicial Respiratório em relação a diferentes amostras na Itália.	44
Tabela 4-5 Substituições nos resíduos de aminoácidos (região C-terminal da proteína G) nas sequências estudadas do Vírus Sincicial Respiratório do genótipo BA circulantes durante os anos de 2006 a 2010, em relação à amostra padrão BA/4128/99B.....	49
Tabela 4-6 Substituições nos resíduos de aminoácidos (região C-terminal da proteína G) nas sequências estudadas do Vírus Sincicial Respiratório do genótipo GB3 circulantes durante os anos de 2006 a 2010, em relação à amostra padrão CH18537.....	49

Tabela 4-7 Polimorfismos encontrados nas amostras do grupo B do Vírus Sincicial Respiratório em relação a diferentes amostras na Europa.	50
Tabela 4-8 Polimorfismos encontrados nas amostras do grupo B do Vírus Sincicial Respiratório em relação a diferentes amostras na América.	50

Lista de abreviaturas

AAP	Associação Americana de Pediatras (<i>American Association of Pediatrics</i>)
ANF	Aspirado Nasofaríngeo
CCA	Agente de coriza de chimpanzés (<i>chimpanzee coryza agent</i>)
CDC	Centro para Controle de Doenças e Prevenção (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>), Estados Unidos da América
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
C-terminal	carboxi-terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
GAGs	glicosaminoglicanas
HS	Heparano-sulfato
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LACENS	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LBA	Lavado bronco-alveolar
LVRS	Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo
Mabs	Anticorpos monoclonais (<i>Monoclonals anti-bodies</i>)
mRNA	RNA mensageiro

NJ	Agrupamento de vizinhos (<i>neighbor-joining</i>)		
NK	Natural killer		
nm	nanômetros		
N-terminal	amino-terminal		
OMS	Organização Mundial da Saúde		
Pb	pares de base		
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)		
RJ	Rio de Janeiro		
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)		
RNAv	Ácido ribonucleico viral (<i>viral Ribonucleic acid</i>)		
RNP	Ribonucleoproteína		
RpRd	RNA-polimerase-RNA-dependente		
RS	Rio Grande do Sul		
RSV-IVIG	Imunoglobulina intravenosa contra o VSR (<i>Intravenous Immune Globulin</i>)		
RT	Transcrição reversa (<i>Reverse transcription</i>)		
SNF	Secreção de Nasofaríngeo		
Th	Linfócitos T auxiliares (<i>Helper</i>)		
TNF	Fator de necrose tumor (<i>Tumoral necrosis factor</i>)		
UV	Ultra-violeta		
VSR	Vírus	Sincicial	Respiratório

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e classificação do Vírus Sincicial Respiratório

As infecções respiratórias agudas são descritas desde a antiguidade por egípcios, chineses e gregos e os vírus respiratórios ocupam um papel de destaque dentre as possíveis etiologias para essas infecções. Atualmente, o Vírus Sincicial Respiratório (VSR) é mundialmente considerado o agente etiológico de doenças do trato respiratório com maior importância pediátrica, tendo em vista que crianças podem desenvolver pneumonia e bronquiolite quando infectadas por esse vírus (1). A primeira infecção pelo VSR ocorre nos primeiros dois anos de vida, em cerca de 95% das crianças, sendo que o pico de incidência geralmente ocorre nos primeiros meses de vida (2). Os casos de reinfecção pelo VSR são comuns durante toda a vida, porém os sintomas clínicos em crianças com idade mais avançada e em adultos são de natureza mais branda (3). Alguns estudos associam a infecção pelo VSR a taxas relevantes de morbidade e mortalidade em idosos (4) e em indivíduos imunocomprometidos (5, 6).

Em 1956, o VSR foi isolado pela primeira vez a partir de chimpanzés com sintomas clínicos comuns às doenças respiratórias: coriza, tosse e espirros. Foi constatado que 100% da colônia de chimpanzés estava infectada e o agente patogênico foi denominado agente de coriza em chimpanzés (*chimpanzee coryza agent* - CCA). A secreção colhida da garganta de um chimpanzé doente foi inoculada em cultura de células hepáticas causando destruição e morte celular após sete dias da inoculação (7). O material isolado foi inoculado em diversos animais de laboratório porém somente os primatas desenvolveram os sinais da doença (8). Posteriormente, um vírus similar ao CCA foi isolado de duas crianças hospitalizadas nos Estados Unidos, sendo que uma apresentava pneumonia e a outra laringobronquite (crupe). Sendo assim, devido à sua afinidade pelo aparelho respiratório e à sua capacidade de formar sincícios em culturas celulares, o nome do vírus foi substituído por Vírus Sincicial Respiratório (8, 9).

O VSR logo passou a ser considerado um importante agente patogênico de doenças respiratórias agudas, especialmente bronquiolite, broncopneumonia (10) e pneumonia (11-13) no mundo todo. No Brasil, em 1964, Candeias e colaboradores

foram os primeiros a identificar o VSR em amostras respiratórias de quatro crianças com menos de seis meses de idade apresentando broncopneumonia e bronquiolite (14). A partir de 1981, a detecção do VSR passou a fazer parte dos boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde (15).

O VSR humano, com base em sua morfologia, está classificado como membro da ordem *Mononegavirales*, que possui outros representantes importantes, como o vírus da raiva (família *Rhabdoviridae*) e o vírus Ebola (família *Filoviridae*) (16). Ele está incluído na família *Paramyxoviridae*; na subfamília *Pneumovirinae* junto ao Metapneumovírus Humano, recentemente descoberto e no gênero *Pneumovirus*, a qual também pertence o Vírus Sincicial Respiratório Bovino e o Vírus da Pneumonia de Camundongos (16) (Figura 1-1), sugerindo que houve saltos de hospedeiros entre essas espécies durante a evolução desses vírus (1).

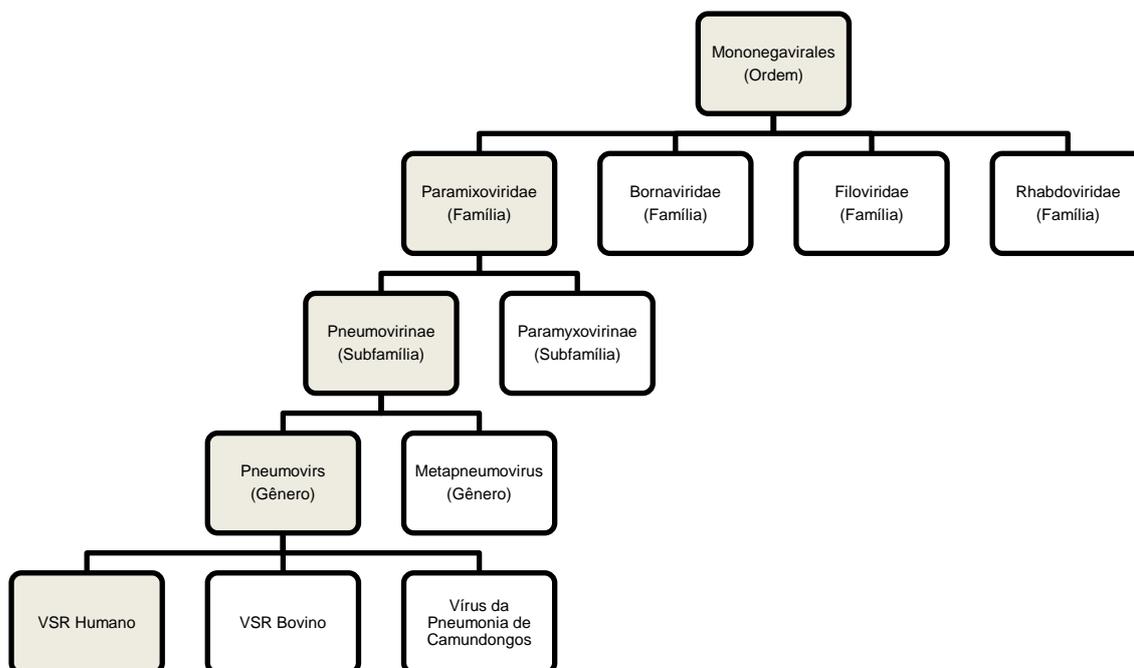


FIGURA 1-1 TAXONOMIA DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO.

1.2. Morfologia e genoma viral

As partículas de VSR tem estruturas esféricas irregulares que medem de 100 a 350 nanômetros (nm) de diâmetro (Figura 1-2). Frequentemente também são encontradas partículas com formas filamentosas longas que tem um diâmetro de 60 a 200 nanômetros e mais de 10µm de comprimento (17).

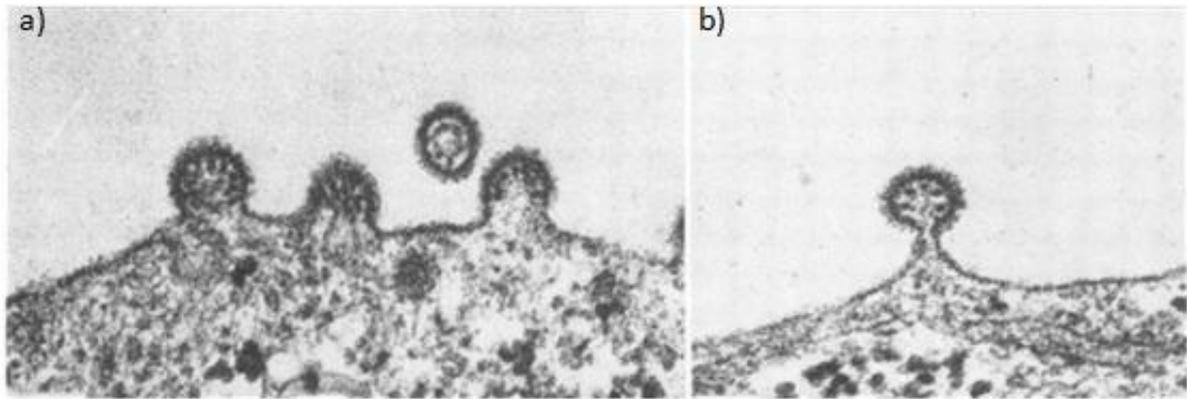


FIGURA 1-2 MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.

a) diferentes estágios do processo de brotamento das partículas de Vírus Sincicial Respiratório na membrana citoplasmática de células Vero. b) estágio final do brotamento evidenciando o estrangulamento da membrana plasmática para a liberação do vírus. Fonte: Norrby, Marusyk et al., 1970 (17).

O genoma do VSR é formado por uma fita simples de RNA, não-segmentado e com polaridade negativa (18). É composto de cerca de 15.222 nucleotídeos (19) e pesa aproximadamente 5×10^6 daltons (18). Através de diferentes técnicas como mapeamento transcricional e clonagem de cDNA, foram identificados 10 diferentes genes virais (18, 20, 21). O genoma viral está esquematicamente representado na Figura 1-3.

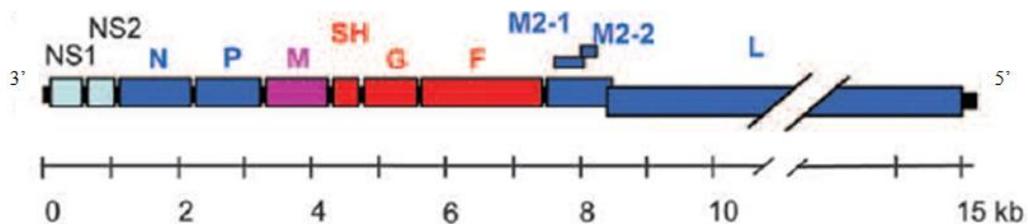


FIGURA 1-3 ORGANIZAÇÃO DOS GENES NO GENOMA DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.

O sentido negativo do genoma do RNA está representado 3' → 5' mostrando as regiões extragênicas (retângulos pretos) e as regiões dos dez genes virais (retângulos coloridos). M2-1 e M2-2 são sobrepostos devido à ORF do RNA mensageiro. Os genes M2 e L se sobrepõem ligeiramente. Os blocos em azul claro representam os genes das proteínas não-estruturais; os blocos em azul escuro representam os genes das proteínas associadas ao nucleocapsídeo enquanto o bloco rosa representa o gene da proteína do envelope e os blocos em vermelho representam genes das glicoproteínas transmembrana. Fonte: Collins e Graham, 2008 (1).

A partícula viral possui um envelope externo, no qual se encontram inseridas 3 glicoproteínas de superfície: proteína de fusão (F), a proteína de adesão (G) e proteína pequena hidrofóbica (SH). Essas proteínas projetam-se a partir da bicamada lipídica do envelope e não se encontram, necessariamente, dispostas num arranjo homogêneo; duas proteínas estão presentes na matriz do vírus e são conhecidas por M e M₂₋₁. O nucleocapsídeo – um complexo proteico associado ao RNA viral (RNA_v) - é formado pela fosfoproteína (P), a nucleoproteína (N), a maior

subunidade da polimerase (L) e o fator de transcrição M₂₋₂. Há também duas proteínas não estruturais 1 e 2 (NS-1 e NS-2) (19, 21-26). O VSR encontra-se esquematicamente representado na Figura 1-4 e um resumo das funções destas proteínas encontra-se descrito na Tabela 1-1.

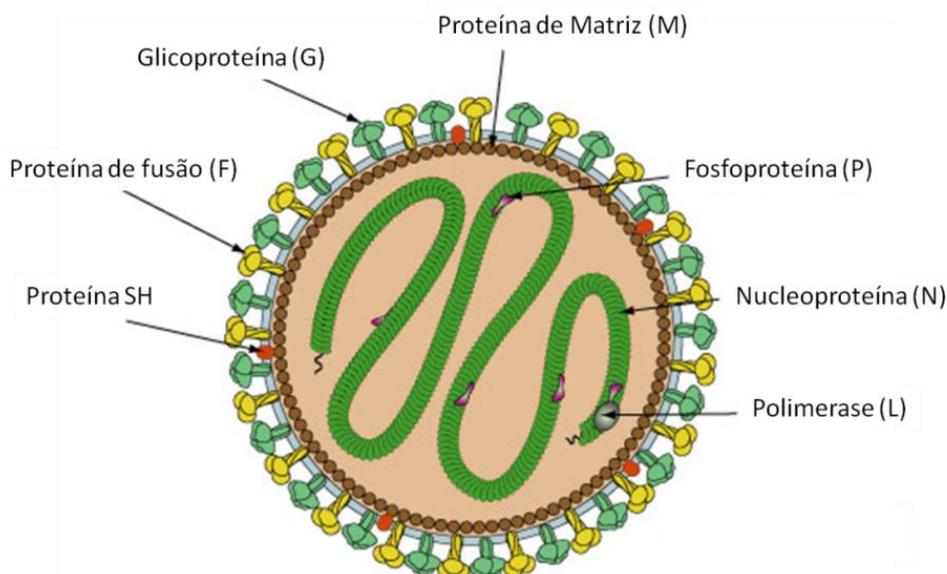


FIGURA 1-4 MODELO REPRESENTATIVO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO.
 Fonte: adaptado de Swiss Institute of Bioinformatics (27)

TABELA 1-1 RESUMO DAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

Proteínas	Funções
Nucleoproteína (N)	Regulação da transcrição e da replicação do RNAv;
Fosfoproteína (P)	Fator de tradução e replicação;
M2-1	Fundamental para o processo de transcrição;
L (Polimerase)	atividades enzimáticas de RpRd, poliadenilação e formação de estrutura de cap do mRNA viral
Matriz (M)	Media a morfogênese viral;
Fusão (F)	Promove a fusão do vírus à célula
Glicoproteína (G)	Promove a adesão do vírus à célula
SH	Função desconhecida
M2-2	Controle do balanço entre transcrição e replicação
NS1	Indução e sinalização de interferons (IFN)
NS2	Inibição de apoptose

Fonte: Alterado de Collins, 2007 (19).

1.2.1. Proteína G

A proteína G tem função de promover a adesão do vírus à célula hospedeira (28) e parece que, embora não seja necessária para infecção de certos tipos celulares (29, 30), é requerida para que o vírus apresente infecciosidade eficiente *in vivo* (31), podendo ser essa a razão para sua presença em todos os vírus isolados (32). A proteína G é análoga a hemaglutinina de outros vírus da família Paramyxoviridae, porém sem apresentar ação hemaglutinante (19).

A massa molecular dessa proteína, deduzida a partir da análise da sequência de nucleotídeos, é de apenas 32,588Da (33). Porém, alterações pós-traducionais no complexo de Golgi levam à formação de um peptídeo de 80 a 90kDa (26, 34). A proteína é ainda palmitilada, possivelmente em um único resíduo de cisteína localizado na cauda citoplasmática na porção amino-terminal (N-terminal) (35). Essas alterações pós-traducionais podem ser importantes tanto para a infecciosidade quanto para a antigenicidade (36, 37). A sequência de aminoácidos revela uma proteína contendo 30% de serina e treonina e 10% de prolina promovendo uma semelhança global a uma classe de proteínas conhecidas como mucinas (38). Ainda não se sabe qual a importância dessa similaridade, apesar de alguns estudos tentarem especular que poderia alterar as propriedades físico-químicas do vírus, facilitando a dispersão ou o escape da rede do muco (1).

O gene que codifica a proteína G do VSR tem aproximadamente 950 nucleotídeos. A proteína G é uma glicoproteína transmembrana tipo II, permanecendo ancorada à membrana próxima a sua porção N-terminal por um único sítio hidrofóbico localizado entre os aminoácidos 38 a 66, no qual existe um peptídeo sinal, que não é clivado (Figura 1-5). A deleção destes resíduos impede a glicosilação, a expressão na membrana celular e secreção, demonstrando a necessidade destes aminoácidos para ancoragem do vírus à célula (33, 38, 39).

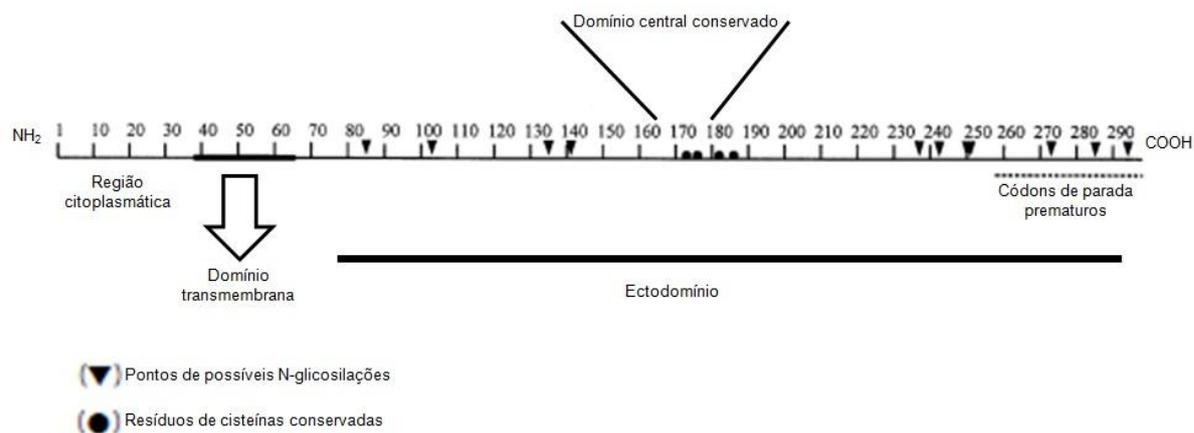


FIGURA 1-5 ESTRUTURA LINEAR DA PROTEÍNA G

Próximo à região amino-terminal encontra-se a região citoplasmática, seguida pelo domínio transmembrana e na porção final da proteína encontra-se o ectodomínio, evidenciando o domínio conservado, os resíduos de cisteínas, os códons de parada alternativos e os pontos de possíveis glicosilações relatados por Melero e colaboradores em 1997. Fonte: adaptado de Melero e colaboradores (32).

A proteína G possui uma extensa variabilidade entre os dois grupos, comparando-se com outras proteínas. No entanto, embora exista uma diversidade global da glicoproteína G nos grupos, no ectodomínio é possível identificar um domínio central conservado de 13 aminoácidos que abrangem os nucleotídeos 164 ao 176 na sequência de referência A2 e são candidatos a serem domínios importantes no transporte, processamento, atividade biológica e neutralização cruzada entre os grupos (40). Há também um segmento contendo quatro cisteínas pouco espaçadas (posições 173, 176, 182, e 186) que são conservadas. A primeira região variável, que antecede esse cluster de cisteína, possui estrutura em forma de haste devido a múltipla O-glicosilação o que possivelmente torna a região de interação com o receptor distante suficiente do envelope viral, facilitando a interação vírus-célula (32). A segunda região variável, que corresponde à região C-terminal da proteína G, reflete a variabilidade global do gene da proteína G e é analisada em estudos epidemiológicos moleculares (41). Os resíduos de cisteína presentes na região conservada são ligados entre si por pontes dissulfídicas da seguinte maneira 173-186 e 176-182 (42) como é possível observar no esquema da Figura 1-6.

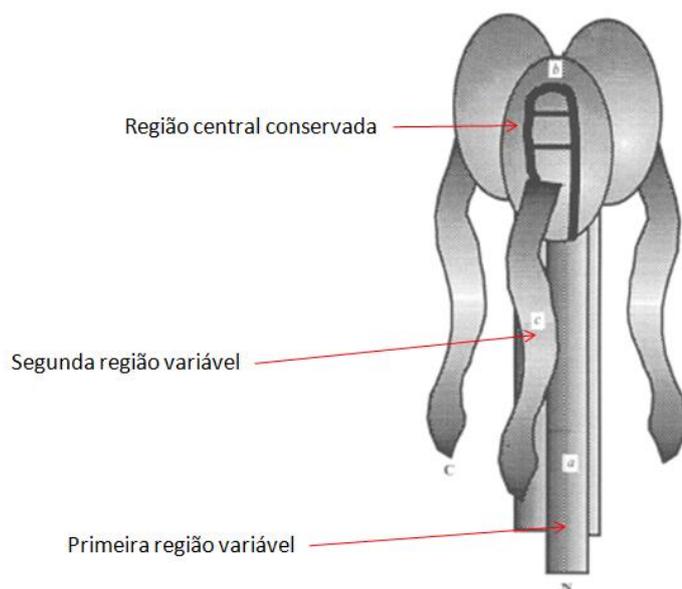


FIGURA 1-6 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA G.

Mostrando a região N-terminal e C-terminal. Em a) primeira região variável; em b) região central conservada e em c) segunda região variável. Fonte: adaptado de Langedijk e colaboradores (43)

Outra forma da proteína é produzida em abundância nas células infectadas: a versão solúvel. Essa versão não permanece ancorada na membrana, pois não têm os 65 resíduos de aminoácidos iniciais da porção N-terminal, onde fica localizada a região transmembrana da proteína. Essa forma constitui cerca de 20% do total de proteína G sintetizada em células infectadas pelo VSR *in vitro*, no entanto é secretada rapidamente e aproximadamente 80% é liberado na cultura celular em 24 horas (44). Essa forma solúvel permanece monomérica (45). A função biológica dessa forma solúvel no ciclo do vírus ainda é desconhecida, mas parece estar relacionada com a imunopatologia nas infecções tendo em vista que é a principal forma da proteína G apresentada precocemente ao sistema imune após a infecção (46). Alguns estudos associam a diminuição da forma solúvel com o aumento da resposta pró-inflamatória sugerindo que a redução da produção da forma solúvel ocorre em detrimento à resposta imune inflamatória que ocorre no pulmão. Sendo assim, o VSR poderia reduzir a resposta inflamatória em células pulmonares com a produção da forma solúvel conferindo vantagens ao vírus (47).

1.2.2. Proteína L

A proteína L é a maior proteína do VSR sendo constituída de 2.165 aminoácidos. Ela está localizada na porção 5' terminal do genoma viral e é a proteína estrutural de menor abundância na partícula viral (19). Atribui-se a essa

proteína as atividades enzimáticas de RNA-polimerase-RNA-dependente (RpRd), além da poliadenilação e formação de estrutura de cap do mRNA viral (48-50). Baseados no alinhamento de sequências das polimerases de diferentes famílias virais da ordem Mononegavirales foram estipulados seis regiões altamente conservadas com alta homologia e com possíveis domínios funcionais. Sendo assim, na porção N-terminal fica o primeiro sitio conservado I que deve estar associada à oligomerização do L e/ou interação do L com a proteína P (51-56). O domínio II parece estar envolvido com o reconhecimento do RNA genômico ou “*templates*” sintéticos, devido à presença de aminoácidos ricos em cargas positivas (57). O sítio ativo da enzima RNA polimerase parece estar no domínio III, já que este apresenta o motivo GDNQ (58, 59). Já o sítio IV apresenta o provável sitio de ligação aos ribonucleotídeos (57, 60, 61). O domínio V possui um motivo conservado GxxT[n]HR que parece mediar o capeamento do RNA mensageiro viral de uma maneira não usual (61-63). No que diz respeito ao domínio VI, sua função ainda não é conhecida (57). O esquema linear da proteína L evidenciando os seis blocos conservados encontra-se na Figura 1.7. A RpRd é determinante para a patogênese viral então esse complexo é um alvo atrativo para as terapias antivirais (64).

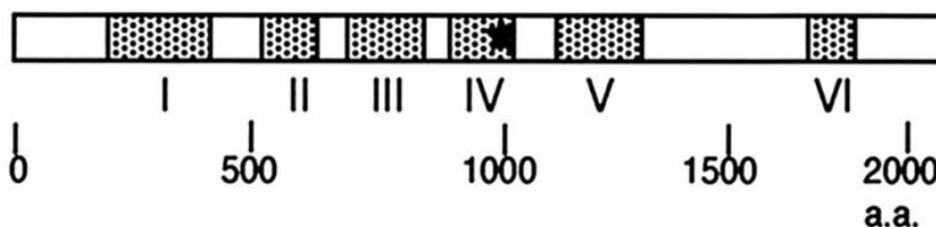


FIGURA 1-7 ESQUEMA LINEAR DA PROTEÍNA L DO VSR.

As regiões com bolinhas representam as sequências de aminoácidos conservados entre as polimerases de alguns vírus da família Paramyxoviridae. O bloco I parece estar associado à oligomerização do L e/ou interação do L com a proteína P. O bloco II parece estar envolvido com o reconhecimento do RNA genômico ou “*templates*” sintéticos. O bloco III possui o sítio ativo da enzima RNA polimerase. O bloco IV apresenta o provável sitio de ligação aos ribonucleotídeos. O bloco V parece mediar o capeamento do RNA mensageiro viral. O bloco VI não tem função conhecida.

Fonte: adaptado de Cartee e colaboradores (65).

1.3. Caracterização antigênica e gênica

Pioneiramente, Coates e colaboradores, em 1966, publicaram um trabalho mostrando a variabilidade antigênica de isolados de VSR pelo teste de neutralização com soro hiperimune (66). Com o advento da técnica que utiliza anticorpos monoclonais (MAbs) foi possível distinguir isolados antigênicos (67) identificando dois grupos de VSR, chamados de A e B (68). Estudos complementares mostraram

que variações entre os 2 grupos eram mais extensas do que mutações aleatórias e que a proteína G era a proteína que apresentava maior divergência entre eles (68, 69). Sendo assim, foram identificados três tipos de epítomos na proteína G: a) epítomos conservados que estavam presentes em todos os isolados virais tanto no grupo A como no grupo B; b) epítomos grupos-específicos divididos por todos os vírus do grupo antigênico e c) epítomos isolado-específica ou epítomos variáveis que estão presentes em certos isolados do mesmo grupo antigênico (70). A variabilidade de isolados dentro dos grupos A e B do VSR foram inicialmente demonstrada através de diferenças nas reações com Mabs e depois usando métodos de clivagem com enzimas de restrição, ensaio com RNase, ensaio de mobilidade de heterodímeros e análise de sequenciamento de nucleotídeos (71-73).

As análises das sequências dos genes N, P, SH, e G confirmaram a divisão de VSR em dois grupos e também identificaram alguns genótipos dentro de cada grupo (40, 74-76). Inicialmente, os genótipos foram definidos baseados em três critérios: mapa de restrição de parte do gene N, sequenciamento de parte do gene da proteína SH e sequenciamento e mapa de restrição do gene da proteína G (75). Historicamente, a nomenclatura atribuída por Peret e colaboradores (41, 77) e Venter e colaboradores (78) para os diferentes genótipos era: nome da proteína-subgrupo-variante.

Inicialmente, foram identificados seis genótipos, chamados de SHL1 a SHL6, entre isolados de VSR A e dois, denominados de NP1 e NP3 foram identificados entre VSR B (75). Porém, a análise filogenética da região hipervariável do gene da proteína G permitiu a identificação de vários genótipos, sendo inicialmente descritos o GA1 a GA5 e GB1 a GB4 (77) seguidos de GA6 e GA7 (41). Essa classificação ficou mundialmente conhecida e em 2001, os genótipos SAA1 e SAB1 a SAB3 foram descritos pela primeira vez na África do Sul (78). O genótipo BA, que possui uma duplicação de 60 nucleotídeos, foi inicialmente descrito na Argentina (79). Com a ampla distribuição mundial, novas divisões desse genótipo foram descritas, sendo BA-1 a BA-6 (80) e posteriormente BA-7 a BA-10 (81). Outros dois genótipos de B foram descritos em 2005 no Uruguai, sendo chamados de URU1 e URU2 (82). Em 2011, na África do Sul mais um genótipo foi descrito para o grupo B chamado de SAB4 (83). Mais recentemente, no Japão foram descritos mais dois genótipos para o

grupo A do VSR, sendo denominados de NA1 e NA2 (84) e em 2012 foi identificado um novo genótipo na Coreia denominado CB-A (85) e outro novo genótipo com uma duplicação de 72 nucleotídeos no Canadá denominado ON1 (86).

1.4. Replicação viral

A infecção viral inicia-se quando a proteína G do VSR interage com o receptor da célula (19). Alguns estudos tem demonstrado que glicosaminoglicanas (GAGs) sulfatadas presentes na membrana celular, principalmente o sulfato de heparano (HS), são essenciais para a entrada do VSR em linhagens de células contínuas (31, 43, 87-91). Entretanto, a interação vírus-célula não ocorre apenas por interação de cargas entre o vírus e subunidades sacarídicas sulfatadas. O processo é dependente da conformação das GAGs, sendo necessário que apresentem, em sua estrutura, no mínimo 10 subunidades de sacarídeos para mediar à infecção pelo VSR em culturas celulares, além da presença do ácido idurônico (92, 93). Embora o processo de adesão do vírus esteja relacionado principalmente à proteína G, foi demonstrado que vírus mutantes, com deleção dos genes SH e G inteiros, são capazes de infectar células *in vitro*, sugerindo que a proteína F também possa interagir com a HS (30, 94).

Interações com anexinas II, ICAMs, receptores Toll-like e receptores para proteínas surfactantes A ou D também podem estar associadas ao processo de ligação do VSR as células *in vitro* (95).

Posteriormente à adesão, ocorre a penetração viral. O envelope viral incorpora-se à membrana celular, fato que pode ser observado através da técnica de imunofluorescência (96), e ocorre a fusão do vírus e membrana celular por ação da proteína de fusão F (28, 97). Esse processo é pH independente (98). A proteína F também media a fusão de células infectadas com as células adjacentes que ainda não foram infectadas induzindo a formação de sincícios (35).

Com o nucleocapsídeo liberado no citoplasma tem início o processo de transcrição do genoma viral. Os genes são transcritos na direção 3' 5' a partir de um promotor localizado na terminação 3' (99). Com exceção do gene M2 que contém duas ORFs e produzem duas proteínas, cada gene é transcrito separadamente e

traduzido como uma única proteína viral. A enzima RpRd adere-se à região promotora (*leader*) do genoma iniciando a transcrição do primeiro nucleotídeo. Na junção entre a região promotora e o primeiro gene (NS1), ocorre a liberação do transcrito e a polimerase recomeça a transcrição de forma sequencial do início ao fim, guiada pelos sinais de início e final do gene, região de terminação (*trailer*). Esse mecanismo resulta na produção de RNAs mensageiros de cópias iguais ao gene original sem modificações. Os RNAs são poliadenilados na extremidade 3' e recebem um "cap" na extremidade 5' (19).

A maturação viral ocorre com a montagem do nucleocapsídeo, pela combinação do RNA genômico com a proteína N, que é acompanhado pela adição das proteínas P e L. Para montagem do envelope, as proteínas de superfície sofrem glicosilação quando passam pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Essas proteínas ocupam lugar das proteínas celulares, na membrana plasmática. As proteínas de matriz agregam-se na porção interna do envelope nascente. Por último, o nucleocapsídeo chega à superfície e é liberado por brotamento, levando uma porção da membrana plasmática, em um processo inverso à penetração por fusão (100).

Adicionalmente à transcrição e à tradução de proteínas, ocorre a replicação do genoma viral que produz uma fita de RNA intermediária positiva, esta servirá como molde para gerar cópias do genoma viral. A produção do intermediário positivo requer que a maquinaria de produção de mRNAs entre em um modo "anti-terminação" (19).

Todas as etapas da replicação do VSR ocorrem no citoplasma celular (100) e o diagrama da replicação e transcrição do VSR está representada na Figura 1.8.

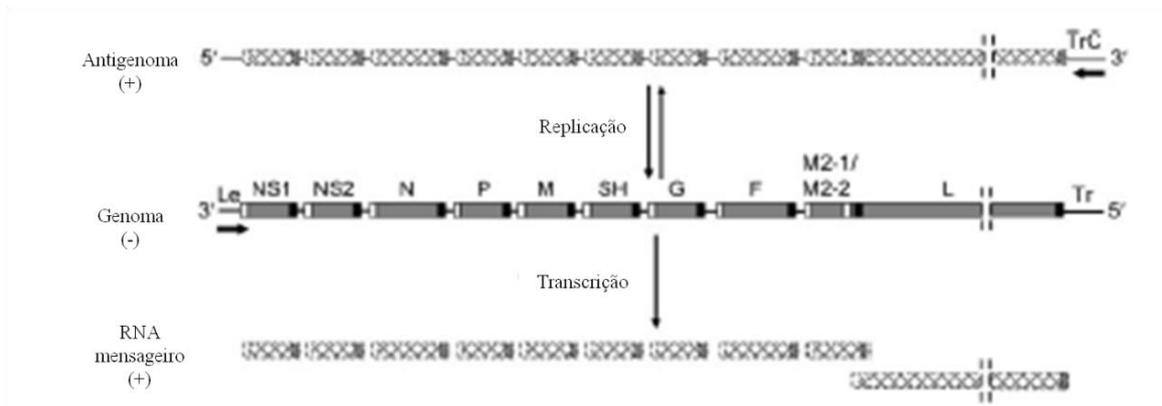


FIGURA 1-8 DIAGRAMA DA REPLICAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO.

O mecanismo de replicação do genoma viral ocorre a partir da fita de RNA intermediária (antigenoma), produzida pela polimerase viral, que servirá de molde para cópias do genoma viral. Para a transcrição os RNAs mensageiros são formados a partir do genoma viral (-).

Fonte: adaptado de Cowton e colaboradores (101).

1.5. Aspectos clínicos

O aspecto clínico da infecção varia de acordo com a idade do indivíduo. Os grupos que apresentam maior morbidade na infecção pelo VSR, devido à sua fragilidade imunológica, são os neonatos, prematuros, indivíduos portadores de doenças cardíacas e os imunocomprometidos (5, 102). A infecção ocorre pela inoculação através de grandes partículas em aerossol ou contato direto no nariz ou olhos e resulta na replicação viral na nasofaringe, com um período de incubação de 4 a 5 dias (1). No início da infecção, o vírus se replica na nasofaringe, alcançando altos títulos de até 10^6 TCID₅₀ (doses por mL de secreção nasal) em crianças pequenas infectadas por VSR (1).

A infecção primária usualmente ocorre de seis meses a dois anos de idade, geralmente sintomática. As primeiras manifestações clínicas são caracterizadas pelo comprometimento das vias aéreas superiores, com secreção nasal de cor clara, tosse moderada, e febre baixa, seguido do comprometimento das vias aéreas inferiores (103). A tosse é um dos sintomas mais comuns e afeta cerca de 90 a 97% dos pacientes. A febre é observada em aproximadamente 50% das pessoas com doença respiratória pelo VSR (5). Já foram descritas ocorrências de otite média e sinusite, além de diminuição do apetite (104-106).

Normalmente, a infecção é altamente restrita às células superficiais do epitélio respiratório (107). A migração do vírus do trato respiratório superior ao trato inferior provavelmente envolve a aspiração de secreções ou migração via epitélio

respiratório (103) e as células ciliadas dos bronquíolos e pneumócitos tipo-1 nos alvéolos são os principais alvos da infecção no trato respiratório baixo. Parece que outras células, incluindo epitélio não ciliado e células dendríticas intraepitelial, também podem ser infectadas, mas as células basais parecem ser poupadas (108). Em crianças menores de cinco anos de idade com doenças agudas do trato respiratório baixo, o VSR pode ser um contribuinte importante para ocorrência de asma e resfriado recorrente (109). Nos adultos imunocomprometidos, a infecção por VSR está associada à morbidade e letalidade significantes, apesar da gravidade das manifestações clínicas dependerem da magnitude da imunodepressão. Em pacientes que se submeteram a transplante de medula óssea, a taxa de letalidade é de 45% a 80% dentre os que se infectam com o VSR (110, 111). Em idosos, o VSR pode causar doença respiratória no trato inferior, sendo a pneumonia a complicação mais frequente a levar à hospitalização (112, 113). O VSR se assemelha aos vírus para-influenza em que a primeira infecção na infância é frequentemente associada com doença do trato respiratório inferior grave, enquanto que a reinfeção durante a vida adulta está associada com doença respiratória superior leve afebril (11).

Diversos estudos sobre a patogenicidade ocasionada pelo VSR demonstraram não haver diferença significativa entre os grupos A e B (114, 115), entretanto, alguns outros identificaram maior gravidade relacionada com o grupo A do vírus (116, 117). Há ainda autores que verificaram relação do grupo B com doenças mais graves (118). Os dados da literatura são divergentes, não ficando clara a existência ou não de patogenicidade diferenciada entre os grupos. São necessários estudos adicionais, que possam determinar padrões em relação à diferença do grau de severidade e proporcionem assim melhor entendimento das infecções causadas por este vírus.

Devido ao não diagnóstico laboratorial e consequente associação a resfriados recorrentes (asma) e alergias durante a infância, o impacto da infecção do VSR é provavelmente subestimado (119).

1.6. Aspectos imunológicos

A infecção pelo VSR resulta em modificações de genes celulares e de genes que regulam fatores como citocinas, quimiocinas e moléculas de superfície celular.

Alguns destes fatores têm propriedades antivirais diretas enquanto outros estimulam o influxo e ativação de células exterminadoras naturais (NK), granulócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T efetivos (1). As células epiteliais respiratórias e macrófagos alveolares das crianças, embora sejam os principais alvos da infecção pelo VSR são também as primeiras linhas de defesa inata contra o vírus, produzindo diversos mediadores inflamatórios. Estes mediadores são responsáveis por ativarem a cascata de citocinas pró-inflamatórias com recrutamento e migração de leucócitos aos tecidos infectados que produzem interleucinas (120). Além do efeito citopático direto do vírus no epitélio respiratório, a resposta inflamatória local do hospedeiro desempenha um papel fundamental no desenvolvimento dos sinais e sintomas da doença e envolve componentes da resposta imune, tanto inata quanto adaptativa (humoral e celular)(121). No período tardio da infecção, a infecção viral é acompanhada pela infiltração de células inflamatórias nos pulmões, induzidas por quimiocinas e citocinas, neste ponto, células mononucleares de sangue periférico são observadas em torno dos alvéolos (122).

A infecção primária pelo VSR induz a resposta por anticorpos IgM em 5 a 10 dias, dependendo da idade do paciente. A resposta específica por IgG pode ser vista em muitos pacientes de 20 a 30 dias do início dos sintomas. Os anticorpos IgG VSR específicos declinam e atingem baixos títulos após um ano da primeira infecção. Após a reinfecção pelo VSR, os anticorpos atingem altos títulos rapidamente, sendo detectáveis em 5 a 7 dias (111).

A secreção de IgA é particularmente importante na neutralização no trato respiratório alto, onde a ação da IgG não é eficiente e apesar da resposta IgA ter um curto tempo de duração, durante a reinfecção pode atingir altos níveis. Já a IgG é capaz de neutralizar o vírus no trato respiratório baixo e portanto promove remoção eficiente neste compartimento (1). Ainda assim, reinfecções com VSR podem ocorrer ao longo da vida, e estas infecções ocorrem mesmo na presença de anticorpos pré-existentes (123).

Aparentemente, na maioria dos casos, os anticorpos de neutralização maternos oferecem proteção contra o VSR (19). Os anticorpos de classe IgG

passam da mãe para a criança pela via placentária entre a 26^a e 32^a semanas de gestação (124). Um estudo envolvendo crianças menores de um ano de idade demonstrou que, nesta fase, a maioria dos anticorpos detectados é de origem materna (125). Foi demonstrado também que a presença de títulos elevados de anticorpo materno está correlacionada com doença menos grave podendo até proteger contra infecções pelos vírus (124, 125). Por outro lado, a maioria das infecções graves de VSR ocorre em crianças nos primeiros seis meses de vida, mesmo na presença de anticorpos maternos (124). Uma possível explicação seria a evidência de que a transmissão transplacentária é grupo específica, sendo assim a criança não teria anticorpos de neutralização (126). Outra possibilidade seria devido às evidências existentes de que crianças nessa idade podem montar uma resposta imune mais eficiente quando os títulos dos anticorpos maternos são baixos, sugerindo que a imunossupressão somada à imaturidade do sistema imune das crianças seja o principal obstáculo para o desenvolvimento da resposta humoral eficiente (127, 128).

Diversos estudos mostram uma menor incidência de anticorpos neutralizantes no grupo de crianças com 6 meses a 1 ano de idade em relação aos soros de pessoas com mais idade, indicando a alta incidência de infecção pelo VSR na população (66, 129-131). A soroconversão em crianças menores de três meses é rara (132, 133), mas passa a ocorrer a partir dos oito meses de idade (133). Dados sorológicos e estudos de imunização realizados com animais de laboratório indicam que a proteção contra o VSR é mediada pela neutralização de anticorpos que reconhecem tanto a proteína G quanto a outra proteína de superfície F (134-136). Embora não se conheça muito bem o papel da proteína G em relação à imunidade inata, já se sabe que quando F e G estão presentes a diminuição de IFN- γ é 70 vezes maior do que quando apenas F está sendo expressa em camundongos (137).

As proteínas F ou G, quando expressas por vírus da vaccínia recombinantes, induzem diferentes classes de linfócitos T auxiliares na resposta imune de camundongos BALB-c, sendo que a proteína F induz preferencialmente a resposta imune tipo Th1, e a proteína G induz principalmente a resposta Th2 (138, 139). Além do papel da proteína G, parece haver uma relação entre os resíduos de cisteína da proteína G e a resposta imunológica mediada pelos linfócitos T citotóxicos de

camundongos, uma vez que essa resposta é significativamente reduzida quando a forma de proteína solúvel recombinante de vírus recombinantes, que não possui esses resíduos, é apresentada (140).

Anticorpos neutralizantes no trato respiratório claramente contribuem para remoção viral e certamente tem um importante papel na proteção contra a reinfecção (19). Apesar de serem frequentes, as infecções subsequentes tendem a ser menos graves (111), não ficando claro se a reinfecção frequente por VSR é reflexo da resposta imune inadequada ou das estratégias de evasão viral (1).

1.7. Diagnóstico laboratorial

O sucesso do diagnóstico laboratorial é dependente, entre outros fatores, do tipo de amostra, da forma de coleta e do acondicionamento pós-coleta. Em geral, tem sido observado maior sensibilidade das técnicas empregadas quando as amostras clínicas do VSR são obtidas por aspiração ou lavado nasal de secreções de nariz ou nasofaringe ou por “*swab*” nasal e não decorrentes de aspirados traqueal ou lavado bronco-alveolar (LBA). Devido ao VSR ser um vírus lábil, a amostra depois de colhida deve ser guardada sob refrigeração a 4°C ou inoculada rapidamente em cultura celular (19). Existem diferentes técnicas para diagnosticar o VSR e apesar de, historicamente, o isolamento viral em cultura de células ser o padrão ouro (19), alguns laboratórios ainda encontram dificuldades para isolar o VSR. Sendo assim, o diagnóstico do VSR, normalmente, é realizado por detecção de antígenos do VSR em células epiteliais de nasofaringe, por imunofluorescência ou ensaio enzimático. Esses métodos são rápidos, não necessitam de partículas virais viáveis e apresentam estabilidade nas lâminas fixadas. No ensaio de imunofluorescência, há necessidade de um técnico bem treinado para leitura das lâminas, já que pode haver inespecificidade devido à presença de muco na amostra. Outra desvantagem da técnica de imunofluorescência é que a lâmina deve conter um bom número de células, dessa forma, a coleta, o transporte e processamento das amostras devem ser adequados (141). A sorologia pode ser útil para o diagnóstico retrospectivo da infecção pelo VSR em crianças maiores e adultos. Um aumento de anticorpos no soro ou na saliva medidos por neutralização ou ensaio imunoenzimático revelou-se um bom indicador de reinfecção (142). A técnica

molecular de reação de PCR tem se mostrado mais sensível para o diagnóstico do VSR (143, 144). Essa técnica também permite o ensaio multiplex, que detecta alguns vírus respiratórios simultaneamente (102).

A formação de sincícios, que é característica do efeito citopático produzido pelo vírus, é progressiva e a degeneração completa geralmente ocorre cerca de 4 dias após a formação inicial dos sincícios (145). Os sincícios são facilmente corados por eosina, sendo essa propriedade utilizada para a quantificação do VSR (17). O método de placa de Kisch e colaboradores (146) tem não só a vantagem de alta precisão, mas também permite o isolamento de progenitura de uma única partícula viral. Outro sistema de ensaio com base na contagem de sincícios primário foi descrito por Taylor-Robinson e colaboradores (147), embora este método não permita a clonagem do vírus, é preciso e reprodutível. A desvantagem principal destes procedimentos é o período de tempo relativamente longo necessário para o aparecimento de placas (9 a 10 dias) ou de sincícios (3 dias). Schieble e colaboradores (148) mostraram que o procedimento de contagem de células-fluorescente fornece um método rápido e preciso para a dosagem de infecciosidade do VSR.

1.8. Epidemiologia da infecção por VSR

A infecção pelo VSR é descrita em várias partes do mundo e os padrões de sazonalidade e a duração dos surtos epidêmicos variam consideravelmente entre regiões. Em países de clima temperado, as epidemias têm sido descritas nos meses de inverno, como na Irlanda (149) na China (150) e no Japão (151). Nas regiões de clima tropical, as epidemias parecem ocorrer nas estações chuvosas (152). No Brasil, que é um país de dimensões continentais com grande diversidade climática, a sazonalidade do VSR varia de acordo com a região (153). Na região nordeste, que apresenta clima tropical, Moura e colaboradores relataram surtos na estação chuvosa, durante a primeira metade do ano (154). Já na região sul, onde a temperatura é mais fria, o pico dos surtos é no inverno (155) ocorrendo frequentemente entre os meses de abril a agosto (156). No sudeste do país, região subtropical, as epidemias do VSR têm sido relatadas no outono, nos meses de março e abril, com período variável de duração sendo até abril no Espírito Santo e

estendendo-se até setembro no Rio de Janeiro (157). Alguns estudos tentam explicar essa divergência na sazonalidade do VSR. Um modelo matemático revelou que, em alguns países, o fator climático é a variável que mais contribui para as epidemias do VSR (158). Waris e White relataram a importância da mudança climática, mas ressaltaram que fatores como aumento da temperatura e maior incidência de luz ultravioleta contribuem para o declínio da infecção viral (159). Entretanto, é possível que a sazonalidade do vírus não esteja relacionada a fatores climáticos, mas sim, a hábitos sociais que proporcionam a aglomeração populacional, aumentando o risco de contaminação por VSR (131, 159, 160). Talvez essa combinação de fatores e o reservatório do vírus em adultos com doenças pulmonares crônicas e indivíduos imunocomprometidos expliquem a epidemia natural por VSR (161).

Na maioria das epidemias de VSR relatadas é descrita a co-circulação de diferentes genótipos dos grupos A e B, sendo que, no Brasil, na região nordeste, foram encontradas amostras pertencentes aos genótipos GA2, GA5, GA7, GB3 e SAB3 circulantes no ano de 1999 (162) enquanto na região sudeste, foram encontrados os genótipos GA2, GA5 e GB3 circulando nesse mesmo ano (126). Em 2004, em São Paulo, os genótipos encontrados foram GA2, GA5, SAB1, SAB3 e BA (Campos 2007), enquanto em Campinas no mesmo período também foram detectados os genótipos GA2, GA5, SAB1, SAB3 e BA, além de SAA1, GB3 e URU2 (163). Um estudo abrangendo países da América Central e do Sul investigou a circulação do VSR entre os anos de 2007 a 2009 e encontrou os genótipos GA2 e GA5 para o grupo A e o genótipo BA para o grupo B (164). Na África do Sul, os genótipos GA2, GA5, GA7, GB3, SAB1, SAB2 e SAB3 foram encontrados no período de 1997 a 2000 (78). Já o estudo com amostras em 2006 identificou os genótipos GA5 e BA (165). Na Europa, na Suécia, no período de 2002 a 2003 os genótipos GA2, GA5, GB3 foram encontrados (166). Na Itália também foram encontrados os genótipos GA2 e GA5 em amostras do grupo A durante 1997 a 2006 (167), tal como na Alemanha nos anos de 98 a 2007, sendo encontrado também o genótipo GA7 (168). Na China, foram encontrados os genótipos GA2, GA3, GA5 e GB3 entre 2000 e 2003 (169). Nos períodos de 2002 a 2003 e 2003 a 2004 os principais genótipos encontrados em dois vilarejos rurais, próximos a Delhi, na Índia, foram GA2 e GA5 no primeiro ano e GA5 e BA no ano seguinte (170).

Apesar do genótipo GA1 não ter sido identificado no últimos 15 anos na Europa nem na América do Sul, ele foi detectado de 2006 a 2010 em uma cidade dos Estados Unidos (171), indicando que esse genótipo pode estar sendo re-introduzido na América do Norte. Entretanto, a falta de dados epidemiológicos dificulta o entendimento da circulação desse vírus, uma vez que esse genótipo pode ter circulado continuamente ao longo desses anos.

1.9. Transmissão, prevenção e terapêutica

Existem três vias de transmissão do VSR. A primeira é por pequenas partículas de aerossol, geralmente por tosse ou espirros, não sendo necessário contato direto. A segunda via é por gotas ou partículas maiores, e isso requer contato direto de pessoa a pessoa. A terceira via, e mais importante delas, é a contaminação de superfícies onde o vírus pode ser transmitido à pele e permanecer viável por tempo suficiente para auto-inoculação no trato respiratório. A facilidade da transmissão desse vírus respiratório, provavelmente, é a responsável pela ocorrência de infecções hospitalares (172). De acordo com Couch e colaboradores, em 1997, há três categorias gerais de opções de controle para as infecções respiratórias que são: a prevenção da exposição; fornecimento da imunidade e administração de antivirais (173).

Desde a descoberta do VSR, procura-se desenvolver uma vacina segura e eficaz. Na década de 60, foram feitos testes clínicos com a primeira delas, utilizando vírus inativado com formalina. Embora muitas crianças que receberam a vacina tenham produzido anticorpos neutralizantes específicos, elas não ficaram protegidas contra a infecção natural e ainda desenvolveram uma doença mais severa quando infectadas com o vírus selvagem, havendo alguns casos de morte (174).

Desde então, as vacinas atenuadas tem sido mais estudadas. Em 2000, Wright e colaboradores desenvolveram uma vacina, com vírus atenuado, muito promissora, porém nos ensaios clínicos foi verificado que o vírus não estava totalmente atenuado causando congestionamentos nasais (175). Alguns estudos tentaram produzir vacinas atenuadas a partir de mutações e alguns chegaram aos ensaios clínicos, mas nenhum foi eficaz (176).

A labilidade e a heterogeneidade no tamanho da partícula representam obstáculos para a caracterização e formulação de uma vacina estável (177). Outra estratégia para o desenvolvimento de vacinas é utilizar vetores para expressar proteínas do VSR. Um estudo descreveu a eficácia da imunização de camundongos utilizando o vírus vaccínia recombinante que expressava a proteína G do VSR, porém sem avanços nos ensaios clínicos (178).

Apesar das diversas abordagens desenvolvidas e testadas, ainda não existe nenhuma vacina definida para uso em humanos. Um grande esforço tem sido feito para entender a resposta imune contra o VSR possibilitando o desenvolvimento de uma vacina que leve à imunização sem causar a hiper-reatividade apresentada nos ensaios clínicos. Além disso, é necessário identificar possíveis variações antigênicas entre diferentes isolados de VSR que podem influenciar a eficácia de qualquer vacina em perspectiva.

Para a prevenção do VSR, dois tipos de imunoglobulinas contra o VSR estão disponíveis: a imunoglobulina VSR-específica RSV-IGIV (Respigam, MedImmune Inc.) e o palivizumab (Synagis, MedImmune, Inc.).

A RSV-IGIV (RespiGam) é uma preparação policlonal contendo anticorpos neutralizantes concentrados produzidos do soro de adultos humanos. Foi inicialmente usada para profilaxia das infecções pelo VSR com bons resultados, porém possui a desvantagem de ser um preparado para infusões intravenosas, o risco teórico dos agentes adventícios e a possibilidade de interferir com outras vacinas vivas pediátricas, devido a sua natureza polivalente. Ela ainda é contraindicada em pacientes cardiopatas devido ao volume de sua dosagem, sendo assim seu uso está sendo substituído desde o desenvolvimento do palivizumab (176).

Atualmente, a forma de tratamento mais efetiva da infecção pelo VSR é a imunização passiva com o uso de um anticorpo monoclonal IgG quimérico humanizado contra a proteína F, chamado palivizumab que inibe a entrada do vírus na célula (179). Mostrou-se eficaz na prevenção de infecções graves pelo VSR em pacientes de risco para infecções graves. A profilaxia com o palivizumab vem sendo recomendada em algumas populações de risco durante o período de maior

circulação deste vírus na comunidade (180). Assim, a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, em norma técnica aprovada em 2007, indica e disponibiliza o palivizumab profilático em aplicações mensais nos seis meses anteriores ao período de sazonalidade do VSR para os seguintes pacientes: crianças menores de um ano de idade que nasceram prematuras; crianças menores de dois anos de idade, portadores de patologia congênita com repercussão hemodinâmica importante ou com doença pulmonar crônica da prematuridade.

O único medicamento licenciado para o tratamento da infecção pelo VSR, atualmente, é a ribavirina inalatória. A ribavirina é um análogo sintético da guanosina que atua na inibição da replicação viral de vírus DNA e RNA, inibindo a síntese de proteínas virais estruturais (180). Seu uso é limitado pela dúvida quanto à eficácia, custo e devido à dificuldade técnica para administração inalatória (181). A Academia Americana de Pediatria (AAP) considera o uso em crianças com doença grave pelo VSR ou com risco para desenvolver quadros graves, como os imunodeprimidos, portadores de doença pulmonar grave e/ou cardiopatias com comprometimento hemodinâmico significativo. A ribavirina também é usada no tratamento de outros vírus como o influenza. Apesar de apresentar alguma eficiência, a ribavirina causa efeitos colaterais, tornando seu uso limitado (179).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar os genótipos do VSR, a partir de amostras clínicas coletadas durante os anos de 2006 a 2010, de modo a estudar a caracterização molecular desse vírus em dois estados do Brasil.

2.2. Objetivos específicos

Identificar os genótipos circulantes nos estados do Rio de Janeiro (2006 a 2010) e do Rio Grande do Sul (2009);

Realizar a caracterização molecular do gene G;

Padronizar o protocolo de sequenciamento do fragmento gênico L do VSR;

Realizar a análise molecular do fragmento gênico L.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras clínicas

O Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS) estabelecido no Instituto Oswaldo Cruz (IOC) na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) constitui o Laboratório de Referência Nacional para o Ministério da Saúde, integrando a Rede Nacional de Vigilância para Influenza. Desta forma, Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS) de diversos estados brasileiros enviam continuamente amostras clínicas (aspirado ou secreção de nasofaringe) de pacientes com síndrome gripal. No escopo da vigilância é realizado o teste de Imunofluorescência Indireta Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) onde são detectados os vírus: Parainfluenza, Influenza, VSR e Adenovírus. Com a ocorrência da pandemia de influenza em 2009, foi padronizada a metodologia de RT-PCR em tempo-real com iniciadores desenvolvidos pelo CDC para identificação dos subtipos de influenza, incluindo o pandêmico (CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A (H1N1)). Em 2010, as atividades do laboratório foram normalizadas e a técnica de imunofluorescência indireta voltou a ser rotina do laboratório. Além de exercer o papel de referência, o LVRS tem uma forte presença na pesquisa realizando parcerias e desenvolvendo estudos. Sendo assim, as amostras de 2006 a 2008 inseridas nesse trabalho fazem parte do projeto de identificação de novos agentes virais, desenvolvido em parceria com a Foundation Merieux, na França. No escopo do estudo, amostras de aspirado nasofaríngeo de crianças com quadro clínico de doenças do trato respiratório agudo foram coletadas em hospitais públicos na cidade do Rio de Janeiro. Na execução do projeto, as amostras foram testadas através da reação de RT-PCR multiplex a fim de detectar os seguintes vírus: VSR, bocavírus, rinovírus, metapneumovírus, coronavírus, influenza e parainfluenza.

Tentando resgatar os vírus que circularam em 2009, outro projeto de pesquisa do LVRS padronizou a utilização do kit comercial FTD Respiratory 21 (Fast-track Diagnostics), para a detecção de 21 patógenos respiratórios, incluindo o VSR. Este projeto encontra-se em andamento, e as amostras positivas para o VSR foram incluídas no presente estudo.

3.2. População estudada

Foi realizada uma seleção no banco de dados do laboratório do conjunto de amostras positivas para VSR ao longo dos anos de 2006 a 2010. Os critérios de seleção foram:

1. Crianças menores de cinco anos de idade até a data de entrada no hospital;
2. Data de coleta da amostra dentro dos anos de 2006 a 2010;
3. VSR detectado pelas metodologias de Imunofluorescência, RT-PCR e/ou RT-PCR em tempo-real.
4. Crianças atendidas em hospitais do estado do Rio de Janeiro*
5. Crianças com residência no estado do Rio de Janeiro*

*Para o ano de 2009 foram incluídas amostras de pacientes do estado do Rio Grande do Sul

O quantitativo de amostras elencadas para o presente estudo, segundo a unidade federativa encontra-se descrito na Tabela 3-1.

TABELA 3-1 DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS INCLUÍDAS NO ESTUDO, SEGUNDO O ANO E A UNIDADE FEDERATIVA.

UF/Ano	2006	2007	2008	2009	2010	Total
RJ	11	52	5	1	30	100
RS	0	0	0	26	0	25
Total	11	52	5	27	30	125

Fonte: Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, IOC, FIOCRUZ.

3.3. Etapas do estudo

Para a execução deste trabalho, diferentes protocolos e técnicas foram padronizados. O fluxograma contendo as etapas envolvidas no desenvolvimento do presente estudo encontra-se ilustrado na Figura 3-1.

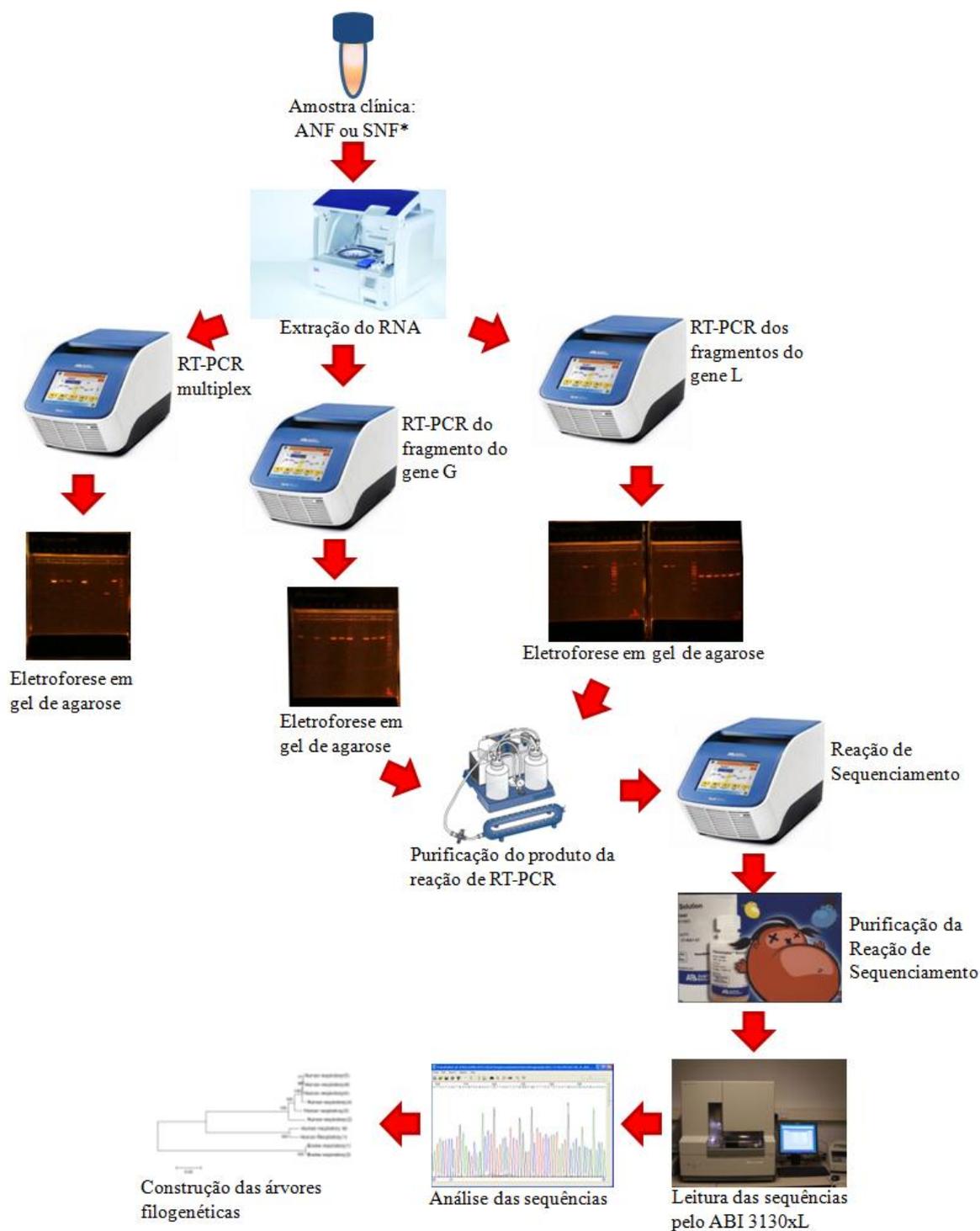


FIGURA 3-1 FLUXOGRAMA DAS ETAPAS E TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A REALIZAÇÃO DO PRESENTE ESTUDO.
*ANF – Aspirado nasofaríngeo e SNF – Secreção nasofaríngeo.

3.4. Extração de RNA

As extrações de RNA virais foram realizadas utilizando o kit comercial QIAamp Viral RNA minikit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. Sucintamente, em uma sala específica para a manipulação de amostras, 140µL do espécime original foi inicialmente adicionado à 560µL de solução desnaturante (tampão AVL) capaz de inativar RNAses e assegurar a liberação do RNA. O tubo contendo a solução foi homogeneizado e mantido à temperatura ambiente por 10 minutos. Durante essa etapa, o vírus é inativado e os tubos foram encaminhados para a sala de extração de ácidos nucleicos.

Na sala de extração, esses tubos foram inseridos no extrator automático QIAcube (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com o manual do fabricante. O equipamento prossegue o processamento adicionando 560µL de etanol para permitir a ligação do RNA à membrana de sílica em gel “QIAamp”. Contaminantes foram eliminados em duas etapas de lavagem sucessivas, usando 500µL de cada tampão AW1 e AW2. O RNA foi eluído em 60µL de tampão AVE, podendo ser imediatamente usado ou estocado a -80°C. As extrações de RNA de amostras clínicas foram realizadas com o controle positivo (amostra padrão Long isolado em cultura de células) e o controle negativo (água adicionada à mistura no lugar da amostra).

3.5. Identificação dos grupos do Vírus Sincicial Respiratório

3.5.1. RT-PCR multiplex

A preparação das reações de PCR foi realizada em uma sala de pré-PCR, onde não é permitida a manipulação de produto amplificado nem amostra clínica. A reação foi encaminhada à sala de extração e em uma cabine de segurança biológica, destinada apenas para essa finalidade, foi adicionado o RNA extraído. Após cada utilização da cabine de segurança biológica, foi necessário realizar a limpeza da superfície interna com hipoclorito de sódio a 5% e luz ultravioleta por 20 min, como rotina interna obrigatória.

As reações também foram realizadas com um controle positivo (RNA da amostra padrão Long isolado em cultura de células) e um controle negativo (água

adicionada à mistura no lugar da amostra). O RT-PCR multiplex foi realizado com kit OneStep RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Alemanha) utilizando o conjunto de iniciadores descritos por Zlateva e colaboradores em 2007 (182), que abrangem uma região do gene da proteína G capaz de diferenciar os dois grupos.

A síntese de cDNA foi realizada por 30 min. a 55°C e para inativar a enzima “*transcriptase reversa*” a temperatura é elevada a 95°C por 15 min. Durante esse período, ocorre a ativação da enzima “*hot-start Taq DNA polimerase*” para iniciar o processo de amplificação do fragmento desejado. Para a amplificação foram realizados 40 ciclos compostos por 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C, além de uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Essa reação ocorreu no termociclador Verity (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

3.5.2. Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram analisados em gel de eletroforese (E-Gel Agarose Gel Electrophoresis System, Invitrogen), onde não é necessária a adição de corante. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Bioeasy) para correlacionar a altura da banda presente no gel com a quantidade de pares de base do fragmento. A leitura do gel foi feita em transiluminador de luz ultravioleta.

3.6. Amplificação do fragmento gênico para sequenciamento

3.6.1. RT-PCR do fragmento gênico G

A reação de RT-PCR do fragmento gênico G foi realizada conforme o estudo realizado por Zlateva e colaboradores em 2007, seguindo o mesmo fluxo organizacional já descrito acima. Realizamos a reação de RT-PCR com o kit OneStep RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Alemanha) amplificando um fragmento do gene da proteína G de aproximadamente 900 pares de base (pb) para o VSR A e 800 pb para o VSR B. Como alguns iniciadores estão inseridos na região do gene seguinte ao gene G, o fragmento final estudado são 645 nt para o VSR A e 773 nt para o VSR B.

3.6.2. RT-PCR do fragmento gênico L

Para realizar as reações de RT-PCR dos fragmentos do gene L, foram selecionadas 30 amostras dos anos de 2009 e 2010 que ainda tinham volume inicial suficiente para os ensaios, sendo 21 VSR A e 9 VSR B. Foram utilizados três pares de iniciadores, totalizando um fragmento de aproximadamente 1.000nt. Um par de iniciadores foi descrito por Carrromeu e colaboradores (183) e os outros dois foram cedidos por J. Arbiza e colaboradores por comunicação pessoal (Tabela 3-2). Para a padronização do ensaio foram testados dois kits de enzimas comerciais: SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen, New York, EUA) e One-Step RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Ambas foram testadas seguindo as orientações de cada fabricante. Padronizamos o ensaio utilizando o kit OneStep RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Alemanha) com seguintes componentes: 1µL dos iniciadores a 15pmol/µL; 2µL de dNTP; 0,5µL de RNase out (40U/nL); 2µL de enzima; 10µL de mix da reação em 40µL de reação final completando com água livre de contaminantes. A essa mistura foram adicionados 10µL do RNA extraído. Após a mistura os componentes foram submetidos à amplificação no termociclador Verity (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos). A reação de transcrição reversa é realizada a 50°C por 30 min., seguida de uma desnaturação inicial das moléculas à temperatura de 95°C/15min. A seguir, programamos 40 ciclos para amplificação de 94°C/30seg para desnaturação, 60°C/1min para hibridização, 72°C/1min para extensão e 1 ciclo final de 72°C/10min.

TABELA 3-2 INFORMAÇÕES GERAIS DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE L.

Iniciador	Posição ^a	Sequência 5' 3'	Polaridade
LD1F	785-816	CTGTGACAACCTATAATCAATTCTTGACATGG	+
LD1R	1721-1752	CTCTAATACTCTTCTTGATTTATCACTCTCGG	-
LD2F	1867-1894	CTCAGTGTAGGTAGAATGTTTGCAATGC	+
LD2R	2218-2248	GTGCATGCCTATATGTGCATATTATTGTGAC	-
CASF	1721-1750	CCGAGAGTGATAAATCAAGAAGAGTATTAG	+
CASR	2740-2768	AATAGACTTTCACCTCTATATTCTAATTC	-

^aPosição do nucleotídeo de acordo com a posição do gene da amostra de referencia Long para VSR A.

3.7. Purificação do produto da reação de RT-PCR

Os produtos amplificados foram purificados a fim de remover dNTPs e iniciadores residuais da reação de PCR, utilizando-se o kit comercial QIAquick

Extraction Gel (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Adicionou-se 500µL de tampão (QG) ao produto do PCR. Os tubos foram homogeneizados e mantidos a temperatura ambiente por 5 min. As soluções foram transferidas para as colunas devidamente posicionadas no equipamento QIAvac (QIAGEN). Após a interação da amostra com a sílica em gel da coluna, foi realizada a lavagem com 750µL do tampão de lavagem (PE). As colunas foram retiradas do equipamento e adicionadas a 50µL de eluente (EB). Após a centrifugação, as colunas foram removidas e descartadas e as amostras de DNA foram retidas no tubo. O produto de PCR purificado foi armazenado no freezer a -30°C.

3.8. Reação de sequenciamento para os fragmentos gênicos G e L

Na extensão enzimática, foi utilizado o kit ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequencing 3.1v (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos) e para cada amostra foram utilizados iniciadores em ambas as direções. A reação de sequenciamento foi composta por 2µL de BigDye, 3µL de tampão de diluição 5x e 1µL de iniciador com 1µL do produto de PCR purificado, completando com água para 20µL. Cada iniciador estava na concentração de 3,2pmoles. A reação foi realizada no termociclador Verity (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos) com o programa: 96°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos, em 25 ciclos.

3.9. Purificação do DNA

A purificação foi realizada a fim de remover o excesso de dideoxynucleotídeos “terminadores” presentes na reação de sequenciamento. O método utilizado foi o kit BigDye XTerminator Purification (Applied biosystems, CA, Estados Unidos), onde 110µL de uma solução pré-preparada, de Xterminator com tampão, é adicionada a cada reação. Essa solução permanece agitando por 30min. Após, a placa é centrifugada por 2 min a 1.500 RPM e inserida no sequenciador automático.

3.10. Sequenciamento e análise das sequências

Os produtos foram submetidos à corrida eletroforética no sequenciador automático ABI3130XL (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos), de 16

capilares com 50cm cada. O polímero utilizado foi o POP-7 (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos) nas condições padrões do equipamento. Os eletroferogramas foram analisados com o programa Sequencher 5.0.

3.11. Análise dos dados e construção das topologias

As sequências foram alinhadas no programa MEGA 5.0 utilizando o método de distância do algoritmo *Neighbor Joining* e pairwise deletion. A significância estatística da topologia de árvore foi testada por bootstrap (1.000 réplicas).

3.11.1. Gene G

Para identificar os genótipos das amostras, as sequências publicadas no GenBank de acordo com os genótipos previamente estabelecidos: GA1-GA7/GB1-GB4 (41, 77), SAA1/SAB1-SAB3 (78), NA1/ NA2 (84), BA1-BA10 (79-81). Além dessas, sequências mais atuais foram adicionadas para comparação, sendo elas da Alemanha (168), Itália (167) e Suécia (184). A sequência de referência VR-26 (GenBank AY911262) foi utilizada para análise do gene G no grupo VSR A e para B foi utilizado CH18537 (GenBank M17213) e para as amostras com a inserção de 60 nucleotídeos BA4128/99B (GenBank AY333364). Após a identificação dos genótipos, a variabilidade das sequências obtidas foi analisada utilizando o fragmento total (640pb) sequenciado correspondente à região extracelular da proteína G, do aminoácido 85 ao 298. Esta seção inclui a primeira região variável da proteína G, os 13 aa da região conservada na posição 164-176 além da segunda região variável desta proteína. As sequências consenso de cada genótipo foram geradas no programa Sequencher 5.0. Para identificar a similaridade entre as nossas sequências e as sequências disponíveis no GenBank, utilizamos a ferramenta Blast (disponível no site do GenBank). Selecionamos as sequências que apresentaram altas porcentagens de identidade em relação às nossas e incluímos na análise da árvore filogenética. As sequências obtidas estão disponíveis online no GenBank com os números de depósito: VSR A de JX182791 a JX182864 e VSR B de JX908832 a JX908882.

3.11.2. Gene L

Para a análise de polimorfismos na região do gene L foi utilizada a amostra de referência VR-26 (GenBank AY911262) e as sequências disponíveis no GenBank para essa região.

3.12. Aspectos éticos

As amostras clínicas que foram coletadas no escopo do Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica de Influenza do Ministério da Saúde dispensa a aprovação do Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos. Neste trabalho, a identidade de todos os pacientes foi preservada, uma vez que as amostras foram identificadas apenas pelo número de registro de entrada no banco de dados do LVRS.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação dos grupos circulantes

No banco de dados do LVRS, foram selecionadas 171 amostras de acordo com os critérios de seleção para o nosso estudo. Destas, 28 não tinham quantidade de amostra inicial suficiente para os ensaios pretendidos. O ensaio de RT-PCR utilizado para a identificação dos grupos de VSR foi realizado nas 143 amostras restantes. Esse ensaio resultava em um fragmento de aproximadamente 280 pb para amostras do grupo A e de aproximadamente 800 pb para amostras do grupo B como apresentado na Figura 4-1.



FIGURA 4-1 GEL DE AGAROSE A 2% APÓS ELETROFORESE APRESENTANDO OS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA G PARA OS DIFERENTES GRUPOS DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO, OBTIDOS NA REAÇÃO DE RT-PCR MULTIPLEX.

Poço 1: controle negativo da reação de RT-PCR. Poços 2, 6, 8 e 10 amostras do grupo A. Poços 3, 4, 5, 7 e 11 amostras do grupo B. A amostra do poço 9 foi negativa e o procedimento adotado nesses casos era a realização do RT-PCR para amplificação do fragmento gênico G para o sequenciamento. Poço 12: marcador molecular de 100pb.

Nesse ensaio 18 amostras não foram positivas para nenhum dos dois grupos de VSR, mesmo após a re-extração, a repetição do ensaio e a realização do RT-PCR para amplificação do fragmento gênico G para o sequenciamento. Essa perda pode ter sido devido às condições do armazenamento ou a diferenças entre as técnicas. Sendo assim, foi possível identificar que 74 amostras pertenciam ao grupo A enquanto 51 amostras pertenciam ao grupo B (Figura 4-2).

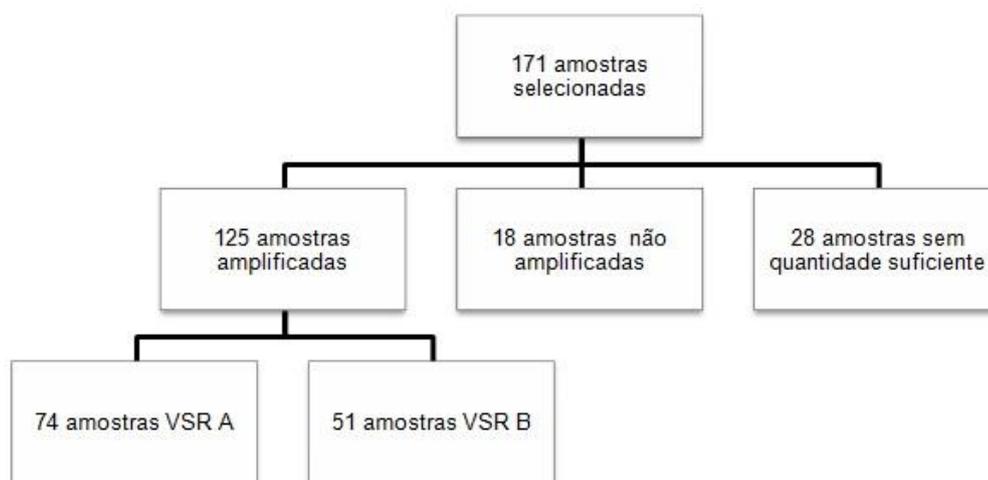


FIGURA 4-2 FLUXOGRAMA DAS AMOSTRAS INCLUÍDAS NO ESTUDO.

Relacionando os resultados obtidos nesse ensaio com a data de coleta das amostras foi possível concluir que os dois grupos do VSR circularam simultaneamente durante os anos estudados. A distribuição das amostras estudadas, segundo o grupo identificado e o ano de coleta encontra-se representada na Figura 4-3.

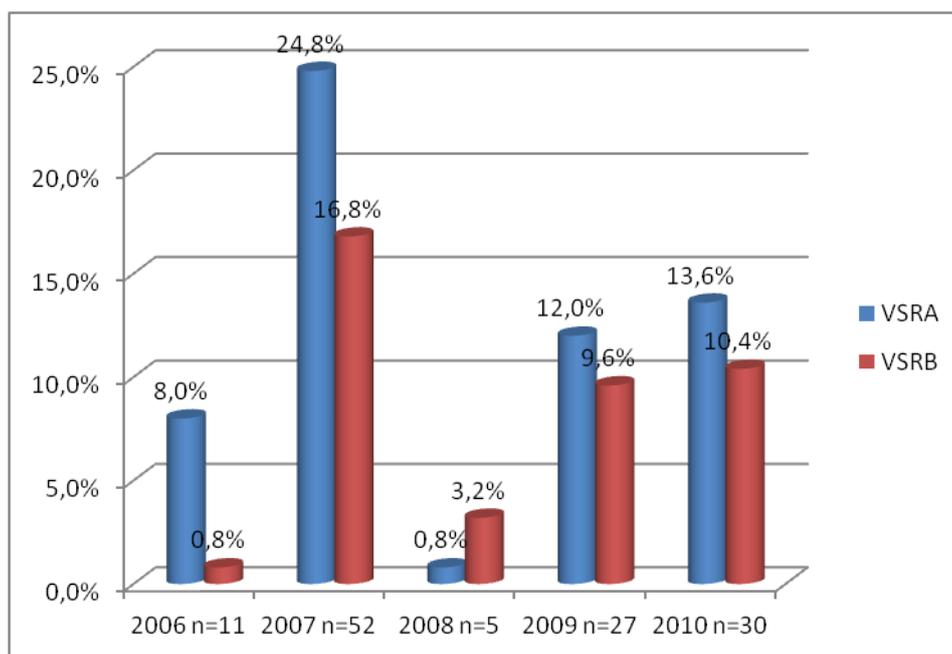


FIGURA 4-3 DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS VSR A E VSR B SEGUNDO ANO DE COLETA (2006 A 2010).

Durante todos os anos do estudo foram identificadas 125 (100%) amostras, amplificadas por RT-PCR multiplex da região G, sendo que a quantidade total de amostras estudadas para cada ano está representada ao lado do ano (Ex.:2006 n=11) e a porcentagem representando a quantidade de amostras de cada grupo está em cima de cada barra representativa.

Em 2006, apenas 1 (0,8%) amostra analisada era do grupo B enquanto 10 (8%) eram do grupo A, totalizando 11 (8,8%) amostras estudadas nesse ano. Em

2007, um maior número de amostras foi analisado (41,6%), sendo 31 (24,8%) do grupo A e 21 (16,8%) do grupo B. Das 5 (4%) amostras analisadas em 2008, apenas 1 (0,8%) amostra era do grupo A enquanto 4 (3,2%) eram do grupo B ao passo que em 2009 das 27 (21,6%) amostras identificadas, 15 (12%) eram do grupo A e 12 (9,6%) do grupo B. Em 2010, 17 (13,6%) amostras pertenciam ao grupo A enquanto 13 (10,4%) pertenciam ao grupo B, totalizando 30 (24%) amostras estudadas nesse ano.

4.2. Análise filogenética do gene G

A definição dos genótipos do VSR é realizada pelo alinhamento dos 270 nucleotídeos da segunda porção variável do gene da proteína G, sendo assim, realizamos o alinhamento desta região, entre as nossas amostras sequenciadas e as amostras previamente caracterizadas em diferentes genótipos.

Na árvore filogenética ilustrada na Figura 4-4 é possível observar as relações filogenéticas entre as nossas sequências e algumas sequências mundiais, para o VSR A. O resultado da análise filogenética evidenciou a circulação de dois genótipos: GA2 e GA5. É importante destacar que a árvore foi enraizada utilizando a amostra padrão Long (AY911262). Essa sequência foi obtida de uma das primeiras amostras isoladas do VSR sendo mundialmente considerada a sequência de referência em estudos evolutivos. Ela é considerada, também, a raiz da árvore do grupo A, uma vez que o vírus já acumulou tantos polimorfismos que se encontra distante filogeneticamente dessa amostra.

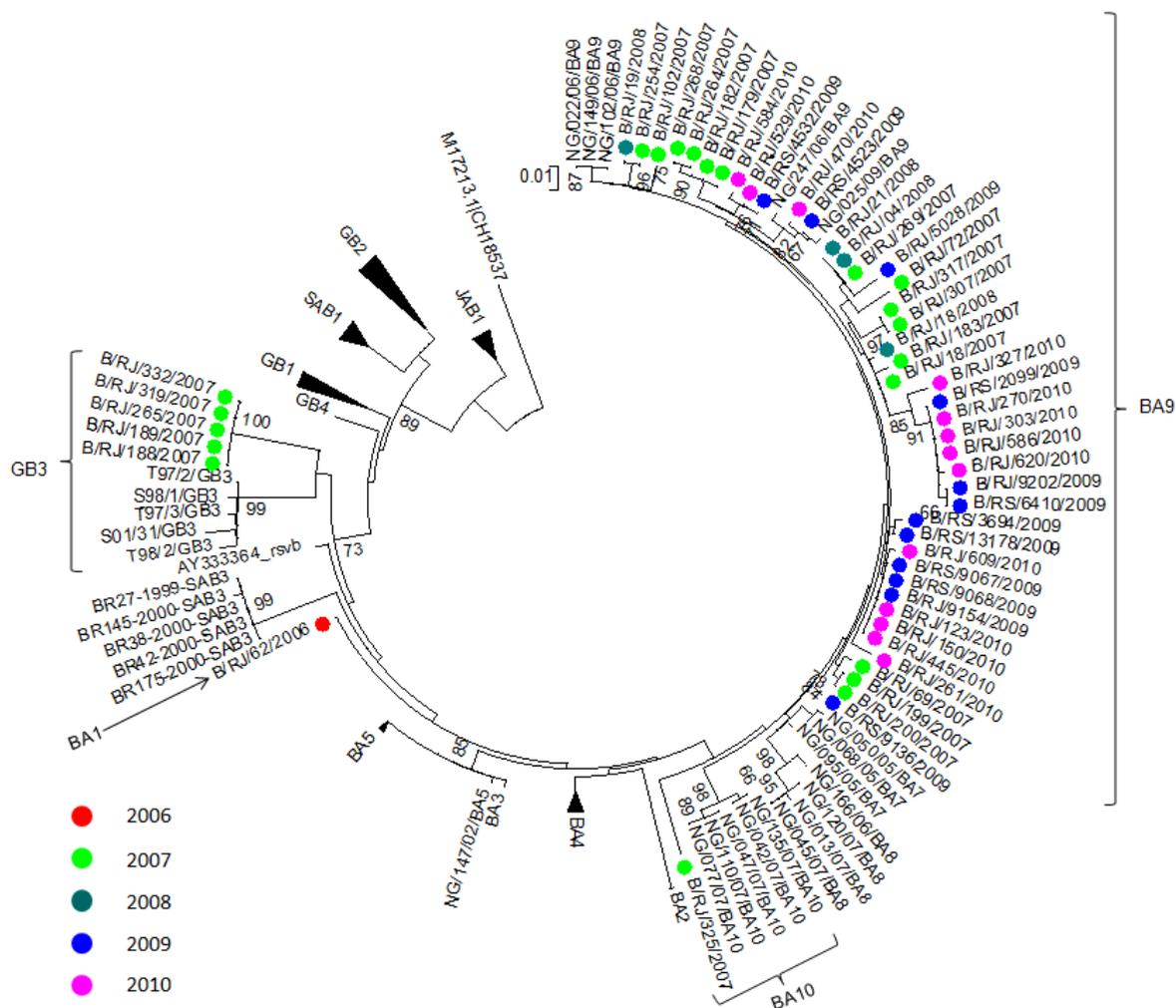


FIGURA 4-5 RELAÇÃO FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (REGIÃO DA SEGUNDA PORÇÃO VARIÁVEL DO GENE G) GRUPO B CIRCULANTES NO BRASIL DE 2006 A 2010.

Árvore filogenética inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (*Neighbour-joining*). Os valores de *bootstrap* acima de 65% encontram-se indicados próximos aos ramos. A distância evolucionária foi calculada pela distância p. Os anos das coletas das amostras desse estudo estão evidenciados com bolas coloridas para cada ano, conforme a legenda na figura. Sequências de amostras dos principais genótipos já descritos para o grupo B estão agrupadas, permitindo a melhor visualização dos resultados.

4.2.1. Análise da variabilidade na sequência de aminoácidos do gene G – VSR A

Para melhor caracterização das nossas amostras, construímos a árvore filogenética apenas com as sequências obtidas. A árvore filogenética se encontra na Figura 4-6. Foi possível analisar que as amostras de 2009 e 2010 se agrupam no topo da árvore. Porém é possível observar também que para um determinado ano, por exemplo, 2006, dois ou mais agrupamentos de amostras podem estar distantes entre si.

Em 2006, das 10 amostras estudadas, nove pertencem ao genótipo GA2 e uma ao genótipo GA5. As amostras RJ/24/2006 e RJ/26/2006 (em vermelho), que apresentaram o mesmo perfil de polimorfismos, foram encontradas em pacientes menores de sete meses com datas de coleta com dois dias de diferença no mesmo hospital, sugerindo que a mesma linhagem viral circulante tenha sido detectada.

Em 2007, o perfil de polimorfismos idêntico foi encontrado nas amostras RJ/68/2007, RJ/82/2007 e RJ/92/2007 (em verde) que se agrupam em um mesmo ramo da árvore. Essas amostras foram coletadas de crianças com até três anos de idade com intervalo de coleta de 14 dias no mesmo hospital, sugerindo que seria o mesmo vírus detectado. A única amostra de 2008 tem o perfil parecido com amostras de 2007.

Em 2009, temos o conjunto de amostras RS/3221/2009, RS/4187/2009, RS/4535/2009 e RS/9098/2009 (em azul), que são de municípios diferentes do Rio Grande do Sul, no mês de julho.

No ano de 2010, as amostras RJ/107/2010, RJ/262/2010, RJ/613/2010, RJ849/2010 e RJ/956/2010 (em rosa) se agrupam em um ramo devido ao seu perfil de polimorfismos.

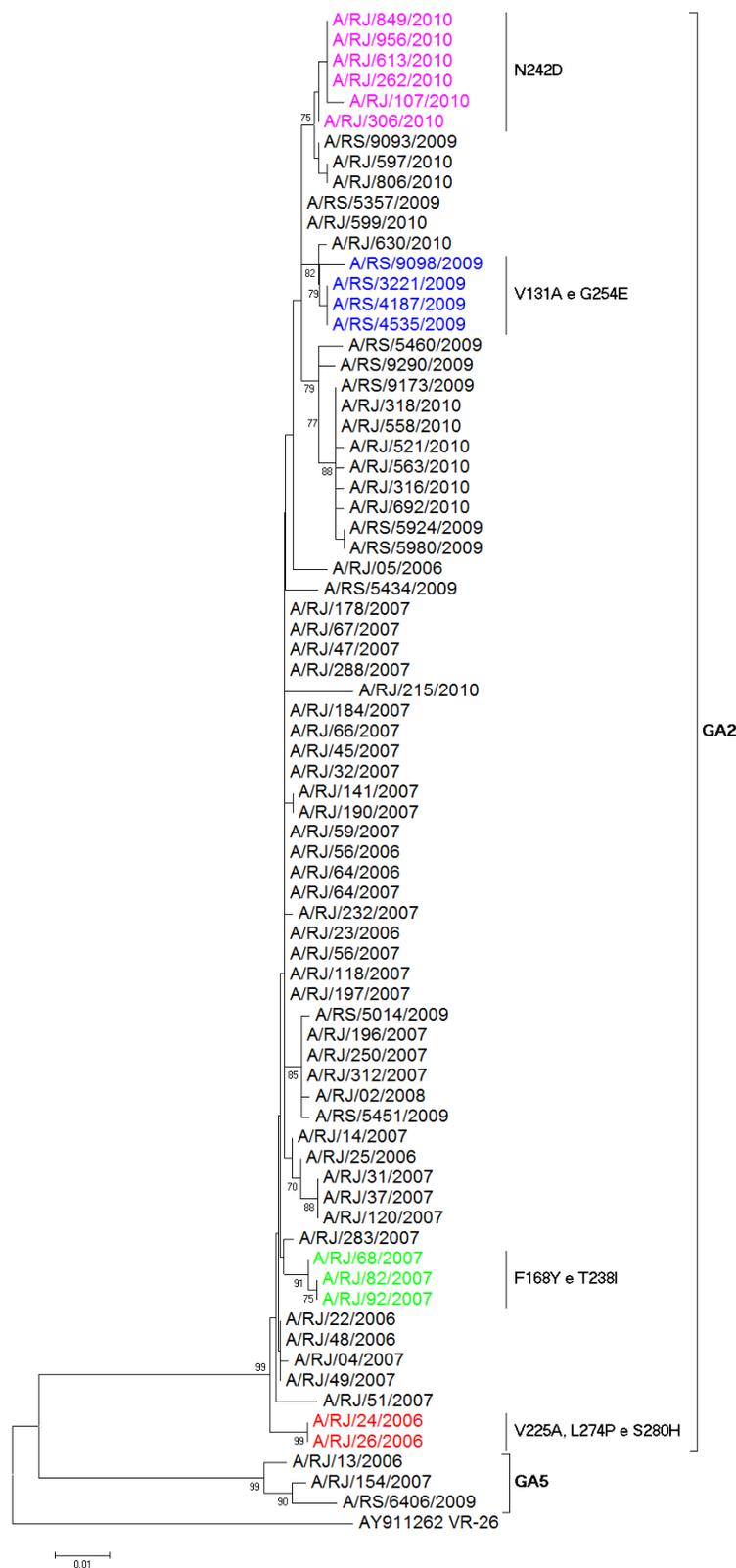


FIGURA 4-6. ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE AS 74 SEQUÊNCIAS DO GENE G DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO DO GRUPO A.

Árvore filogenética inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Neighbour-joining). Os valores de bootstrap acima de 65% encontram-se indicados próximo aos ramos. A distância evolucionária foi calculada pela distância p. A sequência padrão Long enraizou a árvore filogenética. Os aminoácidos referentes aos perfis de polimorfismos das amostras em destaque estão representadas na frente de cada ramo, sendo em vermelho 2006, em verde 2007, em azul 2009 e em rosa 2010.

O alinhamento das seqüências de aminoácidos inferidos, das amostras analisadas, encontra-se na Figura 4-7 e Figura 4-8.

A seqüência padrão Long, foi utilizada como referência para identificar os polimorfismos. Não foram verificadas inserções ou deleções nas amostras estudadas.

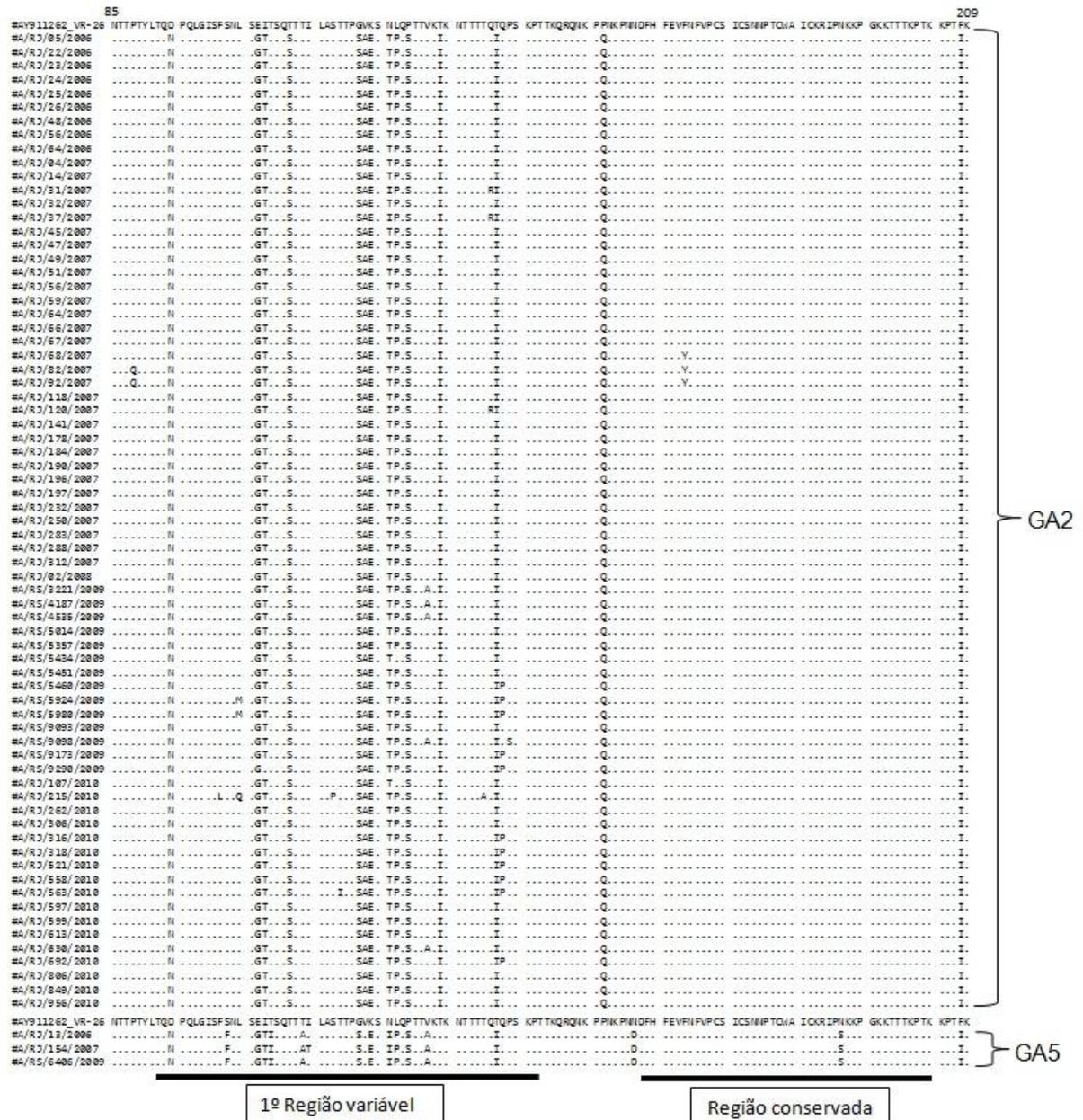


FIGURA 4-7 ALINHAMENTO DOS AMINOÁCIDOS INFERIDOS DAS 74 SEQUÊNCIAS DA PROTEÍNA G DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO E A AMOSTRA PADRÃO LONG (AY911262).

210

```

#AY911262_VR-26 TTKKDLKPQT TKPKVPTTK PTEEPTINT KTNITTTLLT NMTTGNPKLT SQMETFHSTS SEGNLSPSQV STTSEHPSQP SPPNITTRQ*
#A/RJ/05/2006 I...P...R...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...N...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/22/2006 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/23/2006 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/24/2006 ...P...A...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...H...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/25/2006 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/26/2006 ...P...A...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...H...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/48/2006 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/56/2006 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/64/2006 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/04/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/14/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/31/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/32/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/37/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/45/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/47/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/49/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/51/2007 ...P.S.A...AL...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/56/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/59/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/64/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/66/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/67/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/68/2007 ...P...L...K...I...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/82/2007 ...P...L...K...I...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/92/2007 ...P...L...K...I...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/118/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/120/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/141/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/178/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/184/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/190/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/196/2007 ...P...L...K...D...R...SY...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/197/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/232/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/250/2007 ...P...L...K...D...R...SY...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/283/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/288/2007 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/312/2007 ...P...L...K...D...R...SY...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/02/2008 ...P...L...K...D...R...SY...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/3221/2009 ...P...L...K...D...R...S...E...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/4187/2009 ...P...L...K...D...R...S...E...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/4535/2009 ...P...L...K...D...R...S...E...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/5014/2009 ...P...L...K...D...R...SY...EH...K...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/5357/2009 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/5434/2009 ...NP...IL...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/5451/2009 ...P...L...K...D...R...SY...EH...E...L...T...A...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/5460/2009 ...NP...L...K...D...R...F...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/5924/2009 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/5980/2009 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/9093/2009 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...K...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/9098/2009 ...P...L...K...D...R...S...E...EH...E...L...T...V...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/9173/2009 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RS/9290/2009 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/107/2010 ...P...L...K...D...D.R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/215/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/262/2010 ...P...L...K...D...D.R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/306/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/316/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/318/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/521/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...P.L...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/558/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/563/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/597/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...K...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/599/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/613/2010 ...P...L...K...D...D.R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/630/2010 ...P...L...K...D...R...S...E...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/692/2010 ...P...L...K...D...R.K...S...EH...E...L...T...P...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/806/2010 ...P...L...K...D...R...S...EH...E...L...T...K...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/849/2010 ...P...L...K...D...D.R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#A/RJ/956/2010 ...P...L...K...D...D.R...S...EH...E...L...T...Y...YL...S P...SS...K*
#AY911262_VR-26 TTKKDLKPQT TKPKVPTTK PTEEPTINT KTNITTTLLT NMTTGNPKLT SQMETFHSTS SEGNLSPSQV STTSEHPSQP SPPNITTRQ*
#A/RJ/13/2006 ...A.S...DK...P.R...S...EH...N.EK.L...T...I...Y...YL...P...S.I.D...
#A/RJ/154/2007 ...A.S...DK...P.R...S...LGH...E...L...T...I...Y...YL...P...S.I.D...
#A/RS/6406/2009 ...A.S...DK...P.R...S...LGH...E...L...T...I...Y...YL...P...S.I.D...

```

298

GA2

GA5

2º Região variável

FIGURA 4-8 ALINHAMENTO DOS AMINOÁCIDOS INFERIDOS DAS 74 SEQUÊNCIAS DA PROTEÍNA G DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO E A AMOSTRA PADRÃO LONG (AY911262).

Todas as amostras do genótipo GA2 tinham o polimorfismo no códon 298 resultando em uma proteína com 297 aminoácidos. A amostra RJ/215/2010 possui um perfil de polimorfismo único, principalmente na 1ª região variada que a torna distante filogeneticamente das outras amostras. Como a 2ª região variável que é utilizada para definir os genótipos, ela se encaixa no genótipo GA2, mas é possível que seja um novo genótipo.

As três amostras incluídas no genótipo GA5 foram de pacientes menores de sete meses sendo que a amostra RS/6409/2009 foi diagnosticada com Influenza A pandêmico, permanecendo internado em um hospital do Rio Grande do Sul e medicado com Tamiflu. As amostras do genótipo GA5 apresentaram um polimorfismo no resíduo 191 sendo que, para o grupo A, o sítio de ligação do VSR à heparina localiza-se entre os aminoácidos 184-198 (185).

No alinhamento entre as amostras estudadas com a amostra padrão Long, foi possível identificar a localização dos resíduos de aminoácidos que sofreram alterações em todas as amostras. Identificamos também os polimorfismos específicos para o genótipo GA2 e os específicos para o genótipo GA5. Esses polimorfismos estão na Tabela 4-1.

TABELA 4-1 SUBSTITUIÇÕES NOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA G) NAS SEQUÊNCIAS ESTUDADAS DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO DO GRUPO A CIRCULANTES DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2010, EM RELAÇÃO À AMOSTRA PADRÃO LONG.

Amostras	Resíduos de aminoácidos																																						
	94	102	106	108	111	113	121	122	123	128	133	141	156	161	191	208	215	227	232	233	241	244	250	251	257	258	263	265	269	274	279	285	286	289	290	292	293	295	297
Long	D	S	E	T	T	G	V	K	P	T	T	P	N	N	F	L	T	E	E	T	T	N	N	K	L	E	F	S	L	V	H	P	P	S	P	P	T	R	Q
GA2	N	G	S			S	A	E	S	I	I	Q			I	P				K	R	S		E	H	L	T			Y	L	S	P	S	S	K			
GA5	N	F	G	I		A	S		E	S		I	D	S	I		S	D	K	P	R		S	E	H	K	L		T	I	Y	L	P	S	I	D			

Sequências compostas por aproximadamente 215 aminoácidos e pertencentes ao grupo A do VSR. D=Ácido Aspártico; S=Serina; E=Ácido Glutâmico; T=Treonina; G=Glicina; V=Valina; K=Lisina; P=Prolina; N=Asparagina; F=Alanina; L=Leucina; H=Histidina; R=Arginina; A=Alanina; I=Isoleucina; Q=Glutamina; Y=Tirosina.

As amostras do grupo A agruparam-se entre si e ficaram distantes de outras amostras isoladas no mundo. Após uma análise no BLAST (ferramenta do GenBank), notou-se que as amostras do genótipo GA2 tinham maior porcentagem de identidade em relação às sequências circulantes na Europa, Estados Unidos (Tabela 4-2) e Ásia (Tabela 4-3). Enquanto as amostras do genótipo GA5 apresentaram maior identidade em relação às amostras circulantes na Itália (Tabela 4-4).

TABELA 4-2 POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DO GENÓTIPO GA2 DO VÍRUS SINCIAL RESPIRATÓRIO EM RELAÇÃO A DIFERENTES AMOSTRAS NA EUROPA E ESTADOS UNIDOS.

NI: Não identificado

Amostra	Sequência Similar			Polimorfismos
	País	Ano	Nome	
A/RJ/24/2006				P142Q/V225A/L226P/Y276H
A/RJ/26/2006				P142Q/V225A/L226P/Y276H
A/RS/5460/2009				D214N/L248F
A/RS/5924/2009				L104M
A/RS/5980/2009				L104M
A/RS/9290/2009				T107I
A/RJ/521/2010		2008	NL20752390	P276L
A/RJ/563/2010				T118I
A/RJ/692/2010				T246K
A/RS/9173/2009	Holanda			NI
A/RJ/316/2010				NI
A/RJ/318/2010				NI
A/RJ/558/2010				NI
A/RS/5014/2009				I94N/N132K/E262K
A/RS/5451/2009				I94N/N132K/V279A
A/RJ/196/2007		2007	NL20751976	I94N/N132K
A/RJ/250/2007				I94N/N132K
A/RJ/312/2007				I94N/N132K
A/RJ/02/2008				I94N/N132K
A/RJ/283/2007	Inglaterra	2009	NCL3909/09	D237N

Amostra	Sequência Similar			Polimorfismos
	País	Ano	Nome	
A/RS/5434/2009	Estados Unidos	2007	A/WI/629-2/07	P126L/V225I

TABELA 4-3 POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DO GENÓTIPO GA2 DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO EM RELAÇÃO A DIFERENTES AMOSTRAS NA ÁSIA.

NI: Não identificado

Amostra	Sequência Similar			Polimorfismos
	País	Ano	Nome	
A/RJ/215/2010				F101L/L104Q/S117P/T139A
A/RJ/05/2006				T210I/K221R/S275N
A/RJ/31/2007				T125I/Q140R
A/RJ/37/2007				T125I/Q140R
A/RJ/120/2007				T125I/Q140R
A/RJ/23/2006				NI
A/RJ/32/2007				NI
A/RJ/45/2007				NI
A/RJ/141/2007				NI
A/RJ/25/2006				NI
A/RJ/56/2006				NI
A/RJ/64/2006				NI
A/RJ/14/2007				NI
A/RJ/47/2007			BK136	NI
A/RJ/56/2007				NI
A/RJ/59/2007				NI
A/RJ/64/2007	Tailândia	2006		NI
A/RJ/66/2007				NI
A/RJ/67/2007				NI
A/RJ/118/2007				NI
A/RJ/178/2007				NI
A/RJ/184/2007				NI
A/RJ/190/2007				NI
A/RJ/197/2007				NI
A/RJ/232/2007				NI
A/RJ/288/2007				NI
A/RJ/82/2007				P88Q/F168Y/S190P/PD237N/T238I
A/RJ/92/2007				P88Q/F168Y/S190P/PD237N/T238I
A/RJ/51/2007				S190P/P217S/T219A/V225A
A/RJ/68/2007				F168Y/S190P/D237N/T238I
A/RJ/22/2006			BK153	S190P
A/RJ/48/2006				S190P
A/RJ/04/2007				S190P
A/RJ/49/2007				S190P
A/RS/9098/2009				V131A/P143S/E213K/G254E/E271V
A/RS/3221/2009				V131A/P143S/E213K/G254E
A/RS/4187/2009				V131A/E213K/G254E
A/RS/4535/2009				V131A/E213K/G254E
A/RJ/107/2010				P126L/E213K/N242D
A/RS/9093/2009				E213K/E271K
A/RJ/262/2010				E213K/N242D
A/RJ/597/2010	Arabia Saudita	2009	Riyadh/91/2009	E213K/E271K
A/RJ/613/2010				E213K/N242D
A/RJ/630/2010				E213K/G254E
A/RJ/806/2010				E213K/E271K
A/RJ/849/2010				E213K/N242D
A/RJ/956/2010				E213K/N242D
A/RS/5357/2009				E213K
A/RJ/306/2010				E213K
A/RJ/599/2010				E213K

TABELA 4-4 POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DO GENÓTIPO GA5 DO VÍRUS SINCIAL RESPIRATÓRIO EM RELAÇÃO A DIFERENTES AMOSTRAS NA ITÁLIA.

NI: Não identificado

Amostra	Sequência Similar			Polimorfismos
	País	Ano	Nome	
A/RJ/13/2006	Itália	2005/2006	RMa2005/06	L256P
A/RS/6406/2009		2001/2002	RMd2001/02	T227S/I236A/E257G/P286L/T295I
A/RJ/154/2007				I114T/T227S/P286L

4.2.2. Análise da variabilidade na sequência de aminoácidos do gene G - VSR B

As 51 amostras do grupo B do VSR foram analisadas e a árvore filogenética está representada na Figura 4-9. Aparentemente, as amostras do grupo B não apresentaram correlação entre os anos, sendo frequente a semelhança entre amostras de anos bastante distantes.

Na árvore estão realçadas as amostras RJ/179/2007 e RJ/182/2007 (em verde claro) que têm um perfil idêntico entre si e foram coletadas da mesma criança sendo uma amostra de aspirado nasofaríngeo e a outra colhida três dias depois de aspirado traqueal. As amostras RJ/199/2007 e RJ/200/2007 (em verde musgo) são da mesma criança sendo aspirado traqueal e aspirado nasofaríngeo; e as amostras RJ/264/2007 e RJ/ 268/2007 (em verde escuro) foram coletadas de gêmeas no mesmo dia.

O alinhamento entre as sequências do genótipo BA e a amostra padrão BA4128/99B está na Figura 4-10 e Figura 4-11, enquanto o alinhamento entre as sequências do genótipo GB3 e a amostra padrão CH18537 está na Figura 4-12. Em ambos os casos, foi possível identificar a localização dos resíduos de aminoácidos que sofreram alterações em todas as amostras. Identificamos também os polimorfismos específicos para o genótipo BA (Tabela 4-5) e os específicos para o genótipo GB3 (Tabela 4-6).

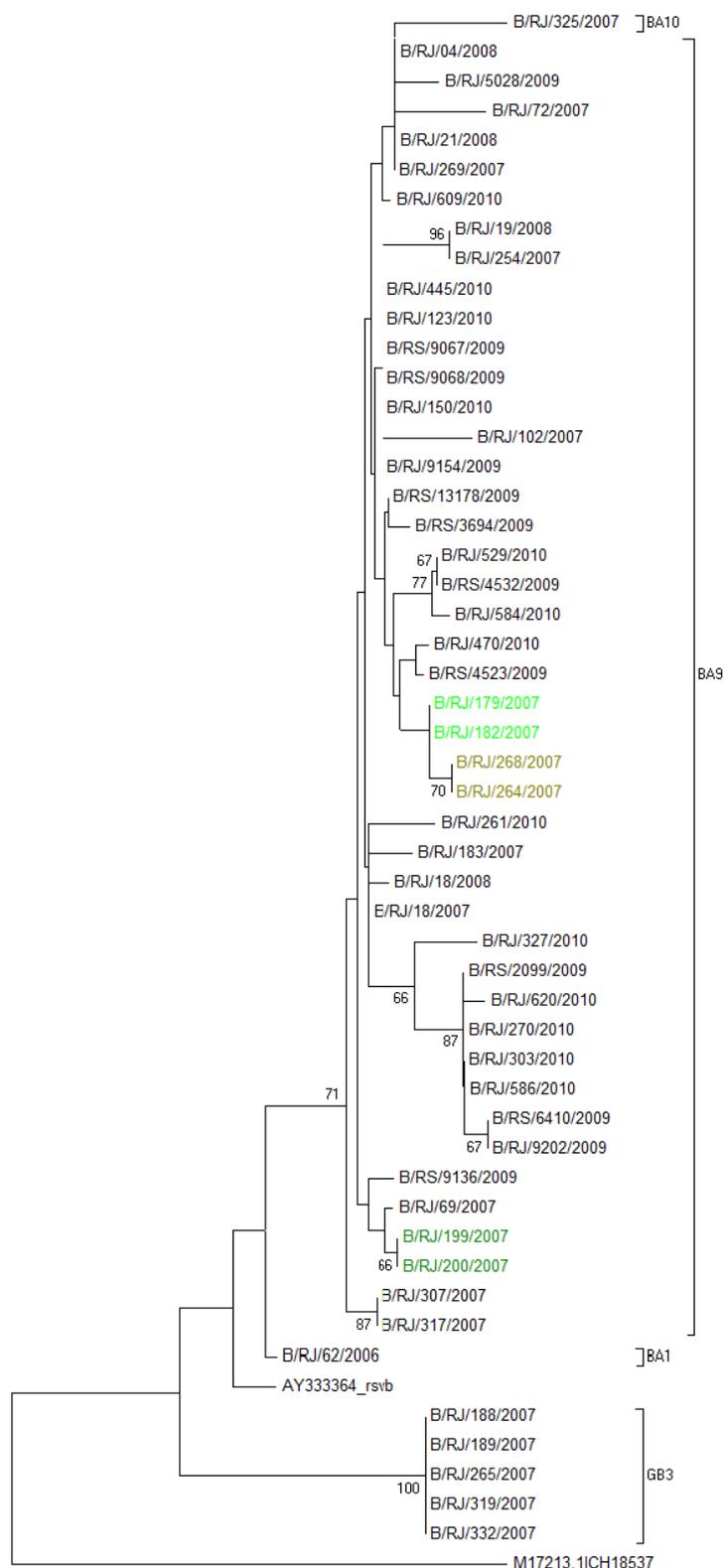


FIGURA 4-9 ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE AS 51 SEQUÊNCIAS DO GENE G DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO DO GRUPO B.

Árvore filogenética inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Neighbour-joining). Os valores de bootstrap acima de 65% encontram-se indicados próximo aos ramos. A distância evolucionária foi calculada pela distância p. A sequência padrão CH18537 enraizou a árvore filogenética.

#AY333364_r_svb	ANHKVTLTV	TVQTIKNHTE	KNITTYLTQV	SPERVSPSKQ	LTTTPPIYTN	SATISPNTKS	ETHHTTAQTK	GRTTTPTQNN	KPSTKPRPKN	PPKKPKDDYH	FEVFNFPVCS	ICGNLQLCKS	ICKTIPSNKP	KKKPTIKPTN	KPPTKITTN
#B/RJ/62/2006		R			P	L	H							T	
#B/RJ/18/2007					P	H		Y	S						
#B/RJ/69/2007			L		P	H		Y	S						
#B/RJ/72/2007				S	P	H		Y	S	R	T				
#B/RJ/102/2007					P	H		Y	S						I
#B/RJ/179/2007					P	H			S						Y
#B/RJ/182/2007					P	H			S						Y
#B/RJ/183/2007		T			P	H		Y	S						Y
#B/RJ/199/2007					P	H			S						
#B/RJ/200/2007					P	H			S						
#B/RJ/254/2007					P	H			S	S					
#B/RJ/264/2007					P	H			S						Y
#B/RJ/268/2007					P	H			S						Y
#B/RJ/269/2007					P	H		Y	S						
#B/RJ/307/2007					P	H		Y	S						
#B/RJ/317/2007					P	H		Y	S						
#B/RJ/325/2007					P	H		Y	S						
#B/RJ/04/2008					P	H		Y	S		K				S
#B/RJ/18/2008					P	H		Y	S						
#B/RJ/19/2008					P	H			S	S					
#B/RJ/21/2008					P	H		Y	S		K				S
#B/RS/2099/2009					P	H		Y	S						
#B/RS/3694/2009					P	H		Y	S						
#B/RS/4523/2009					P	H				R					
#B/RS/4532/2009			N		P	H			S						
#B/RS/5028/2009					P	L	H		Y	S		K			S
#B/RS/6410/2009					P	H		Y	S						
#B/RS/9067/2009					P	H			S						
#B/RS/9068/2009					P	H			S						
#B/RS/9136/2009					P	H	A		D	S					
#B/RS/9154/2009					P	H			S						
#B/RS/9202/2009					P	H		Y	S						
#B/RJ/13178/2009					P	H	HK			S					
#B/RJ/123/2010					P	H		I	AS						
#B/RJ/150/2010					P	H		I	AS						
#B/RJ/261/2010					P	S	H	D	Y	S					
#B/RJ/270/2010					P	H			S						
#B/RJ/303/2010					P	H		Y	S						
#B/RJ/327/2010					P	H		Y	S						T
#B/RJ/445/2010					P	H			AS						
#B/RJ/470/2010					P	H				R					T
#B/RJ/529/2010				N	P	H			S						
#B/RJ/584/2010				N	P	S	H			S					
#B/RJ/586/2010					P	H		Y	S						
#B/RJ/609/2010				H	P	H			S						
#B/RJ/620/2010					P	H		Y	S						

Região transmembrana

1º Região variável

Região conservada

FIGURA 4-10 ALINHAMENTO DOS AMINOÁCIDOS INFERIDOS DAS 46 SEQUÊNCIAS DA PROTEÍNA G DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO E A AMOSTRA PADRÃO AY333364.
O traço (-) representa a deleção do aminoácido.

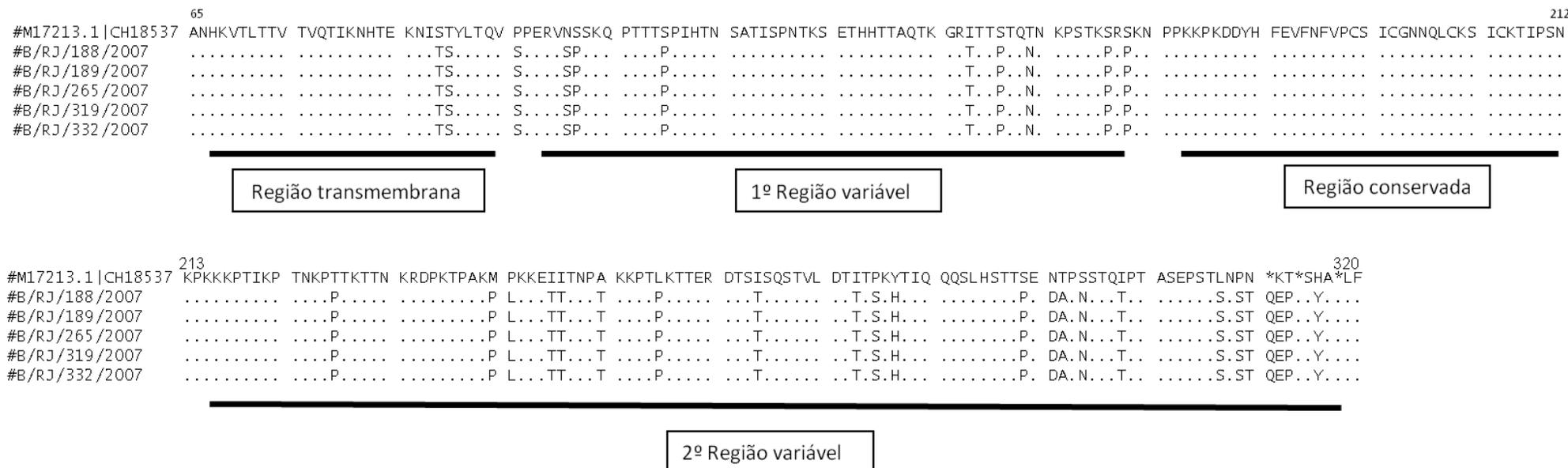


FIGURA 4-12 Alinhamento dos aminoácidos inferidos das 5 sequências da proteína G do Vírus Sincicial Respiratório do genótipo GB3 e a amostra padrão CH18537. A numeração da amostra padrão BA/3997/99B foi utilizada como referência. Os traços representam a o espaço da duplicação dos 60 nucleotídeos que todas as amostras do genótipo BA possuem. O * representa o códon de parada da proteína.

TABELA 4-5 SUBSTITUIÇÕES NOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA G) NAS SEQUÊNCIAS ESTUDADAS DO VÍRUS SINCICAL RESPIRATÓRIO DO GENÓTIPO BA CIRCULANTES DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2010, EM RELAÇÃO À AMOSTRA PADRÃO BA/4128/99B.

Amostras	Resíduos de aminoácidos										
	85	105	112	159	160	218	236	247	270	295	316
BA/4128/99B	K	L	Y	P	K	K	T	S	T	P	*
BA1	R	P	H			T		P	I		
BA9		P	H	-	-	T		P	I		Q
BA10		P	H	-	-	T	I	P		L	Q

Sequências compostas por aproximadamente 330 aminoácidos e pertencentes ao genótipos BA. S=Serina; T=Treonina; K=Lisina; P=Prolina; L=Leucina; H=Histidina; R=Arginina; I=Isoleucina; Q=Glutamina; Y=Tirosina.

TABELA 4-6 SUBSTITUIÇÕES NOS RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS (REGIÃO C-TERMINAL DA PROTEÍNA G) NAS SEQUÊNCIAS ESTUDADAS DO VÍRUS SINCICAL RESPIRATÓRIO DO GENÓTIPO GB3 CIRCULANTES DURANTE OS ANOS DE 2006 A 2010, EM RELAÇÃO À AMOSTRA PADRÃO CH18537.

Amostras	Resíduos de aminoácidos					
	89	222	273	274	294	295
CH18537	T	M	N	T	K	T
GB3	S	P	D	A	E	P

Sequências compostas por aproximadamente 330 aminoácidos e pertencentes ao genótipos GB3. S=Serina; T=Treonina; K=Lisina; P=Prolina; D=Ácido Aspártico; E=Ácido Glutâmico; N=Asparagina; A=Alanina; M=Metionina.

Utilizando a ferramenta Blast foi possível identificar a maior similaridade entre as sequências já depositadas no banco de dados GenBank e as nossas amostras sequenciadas. Os polimorfismos encontrados estão na Tabela 4-7 e Tabela 4-8. Ao comparar sequências de diferentes locais no mundo foi possível observar grande correlação com amostras isoladas em lugares distantes.

TABELA 4-7 POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DO GRUPO B DO VÍRUS SINCIAL RESPIRATÓRIO EM RELAÇÃO A DIFERENTES AMOSTRAS NA EUROPA.

NI: Não identificado

Amostra	Sequência Similar			Polimorfismos
	País	Ano	Nome	
B/RJ/261/2010				P109S/E125D/H128Y/A131S/E226G/T298/Q313*
B/RJ/69/2007				S95L/H128Y/V271A
B/RS/3694/2009				I229S/Q313*
B/RS/9136/2009		2003	BE/12963/03	T122A/G135D
B/RS/13178/2009				T113K/Q313*
B/RJ/199/2007				NI
B/RJ/200/2007				NI
B/RJ/325/2007		2004	BE/257/04	H128Y/T236I/S257P/S267P/I270T/Y287H/P295L/Q313*
B/RJ/72/2007				P101S/L118I/H128Y/Q142R/P150T/K221R/S267P/L272P/Y287H
B/RS/5028/2009				P110L/L118I/H128Y/N154K/P206S/S257L/L272P/Y287H/S288P
B/RJ/264/2007				L118I/N204Y/L219P/S285F
B/RJ/268/2007				L118I/N204Y/L219P/S285F
B/RJ/307/2007	Bélgica			L118I/H128Y/P223L/S257L
B/RJ/317/2007				L118I/H128Y/P223L/S257L
B/RS/6410/2009				L118I/H128Y/E305K/P306L
B/RJ/9202/2009				L118I/H128Y/E305K/P306L
B/RJ/179/2007		2004	BE/13183/04	L118I/N204Y/L219P
B/RJ/182/2007				L118I/N204Y/L219P
B/RJ/18/2008				L118I/H128Y/T312I
B/RS/2099/2009				L118I/H128Y/P306L
B/RJ/270/2010				L118I/H128Y/P306L
B/RJ/303/2010				L118I/H128Y/P306L
B/RJ/586/2010				L118I/H128Y/P306L
B/RJ/620/2010				L118I/H128Y/P306L
B/RJ/18/2007				L118I/H128Y
B/RJ/254/2007	Holanda	2008	NL20752084/07-08	NI
B/RJ/19/2008				NI
B/RJ/470/2010	Inglaterra	2009	NCL609/09.0	I94V/Y112H/I200T
B/RS/4523/2009				I94V/Y112H

TABELA 4-8 POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DO GRUPO B DO VÍRUS SINCIAL RESPIRATÓRIO EM RELAÇÃO A DIFERENTES AMOSTRAS NA AMÉRICA.

Amostra	Sequência Similar			Polimorfismos
	País	Ano	Nome	
B/RJ/62/2006		1999	BA/3997/99	K85R/P109L/Y111H/I200T/S247P/T270I/H287Y
B/RJ/327/2010	Argentina			H128Y/I200T/I229T/P264T/L267S/L286I/F297S/P306L
B/RJ/584/2010		2004	BA/100/04	K103N/P110S/P264T/L267S/P291L/F297S
B/RJ/04/2008				H128Y/N154K/P206S/E224K/S257L/L272P/Y287H
B/RJ/21/2008				H128Y/N154K/P206S/E224K/S257L/L272P/Y287H
B/RJ/269/2007	Estados Unidos	2006/2007	B/Wi/629-15/06-07	H128Y/E224K/S257L/L272P/Y287H
B/RS/4532/2009				K103N/E224K/P291L
B/RJ/529/2010				K103N/E224K/P291L

4.3. Padronização da reação de RT-PCR do gene L

Os resultados obtidos nas reações de RT-PCR indicaram que o kit OneStep RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Alemanha) foi mais eficiente, conseguindo amplificar todos os fragmentos desejados. O kit One-Step da Invitrogen não foi capaz de amplificar dois dos três fragmentos testados, como mostrado na Figura 4-13.

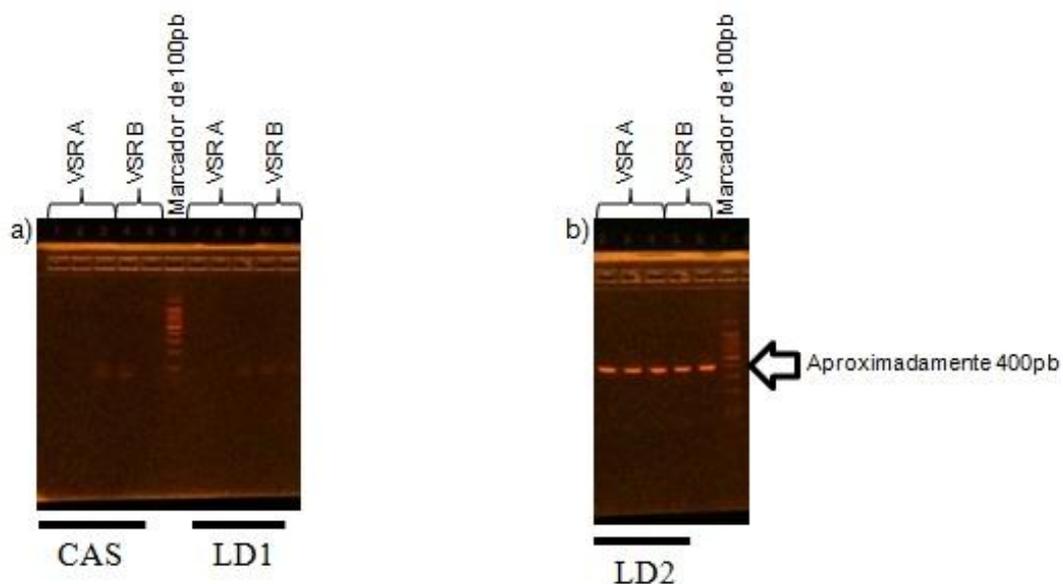


FIGURA 4-13 GEL DE AGAROSE A 2% APÓS ELETROFORESE, APRESENTANDO OS PRODUTOS OBTIDOS NA REAÇÃO DE RT-PCR DO PROTOCOLO ESTABELECIDO COM A ENZIMA SUPER-SCRIPT III DA INVITROGEN. Aplicamos 5 μ L de três amostras do grupo A, e duas do grupo B positivas na reação de RT-PCR de identificação dos grupos de Vírus Sincicial Respiratório. As mesmas amostras foram utilizadas durante a padronização da reação de RT-PCR do gene L. Em a) não houve amplificação dos fragmentos CAS e LD1. Em b) a enzima apresentou um desempenho eficiente, capaz de amplificar o fragmento LD2.

Na intenção de otimizar a padronização do ensaio com o kit escolhido, foi avaliada a possibilidade do ensaio ser realizado com apenas metade da reação descrita pelo fabricante. Na Figura 4-14, é possível observar que obtivemos melhores resultados com a reação completa, como descrita pelo fabricante.

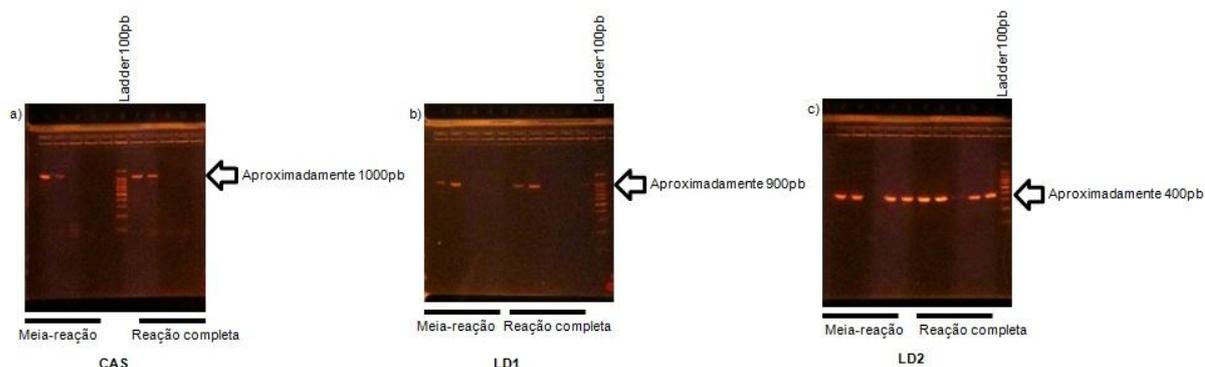


FIGURA 4-14 GEL DE AGAROSE A 2% APÓS ELETROFORESE, APRESENTANDO OS PRODUTOS OBTIDOS NA REÇÃO DE RT-PCR DOS FRAGMENTOS DO GENE L, EM DUAS CONDIÇÕES DIFERENTES.

Aplicamos 5 μ L das amostras usadas durante a padronização do ensaio. Em a) apenas duas amostras foram amplificadas igualmente nas duas condições. Para o fragmento LD1, mostrado em b), duas amostras foram amplificadas quando submetidas à meia-reação enquanto três foram amplificadas com a reação completa. Em c) ocorreu a amplificação de todos os fragmentos LD2 na reação completa enquanto apenas 4 foram amplificadas com a condição de meia-reação.

4.3.1. Análise filogenética da variabilidade na sequência de nucleotídeos e aminoácidos do gene L

Para investigar se este fragmento do gene L teria capacidade discriminatória entre os genótipos foram construídas árvores filogenéticas para os dois grupos (Figura 4-15 e Figura 4-16). Os achados obtidos sugerem que, embora com menor poder de diferenciação filogenética quando comparada à árvore da proteína G, todas as sequências puderam ser eficiente e devidamente agrupadas segundo os genótipos.

No grupo A foi possível observar que as amostras, A/RJ/692/2010 e A/RJ/956/2010, localizadas em ramos diferentes, apesar de serem do mesmo ano e cidade, permaneceram em ramos diferentes também na árvore filogenética do gene G. Foi possível observar também que, as amostras B/RJ/529/2010 e B/RJ/584/2010, na árvore filogenética do gene L do grupo B permaneceram em ramos separados sendo que, essas mesmas amostras na árvore filogenética do gene G permaneceram no mesmo ramo.

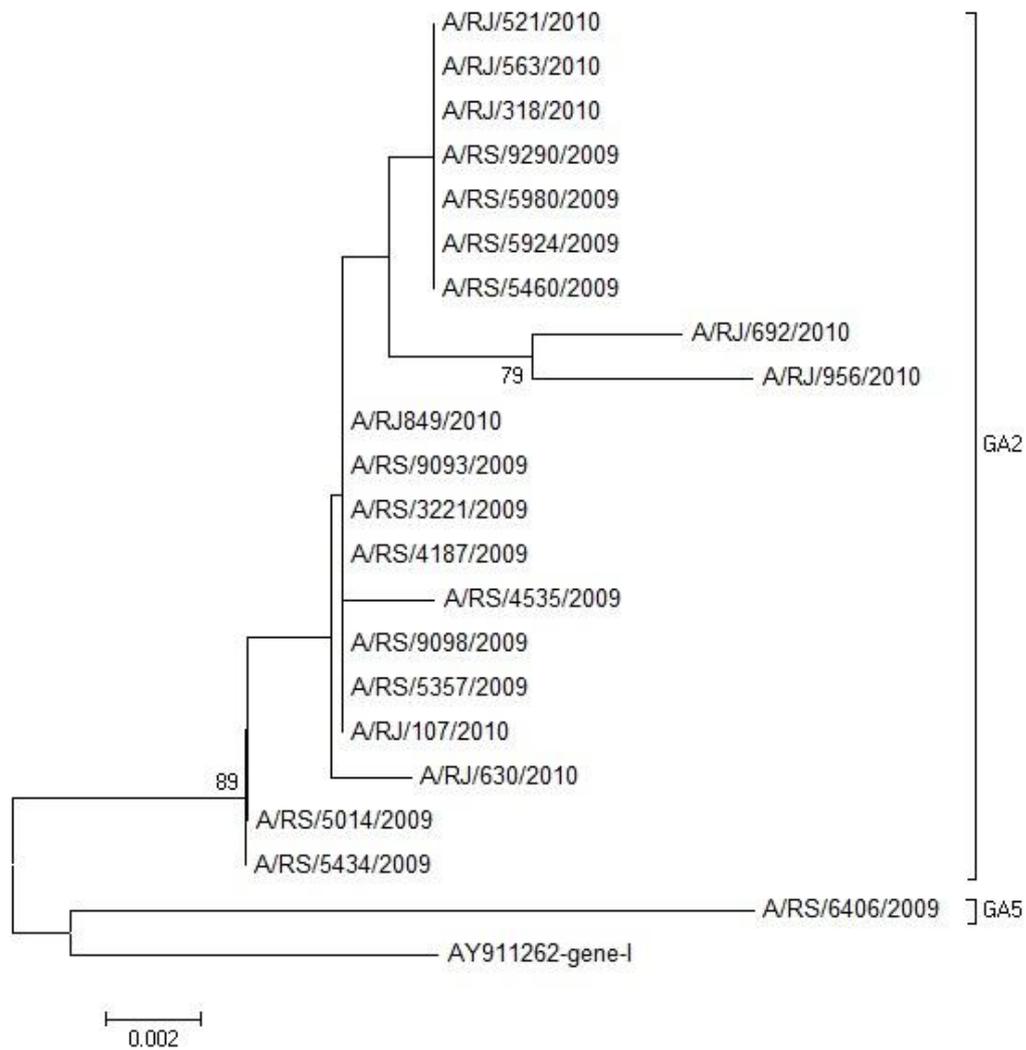


FIGURA 4-15 ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE AS 21 SEQUÊNCIAS DO GENE L DO VÍRUS SINCIAL RESPIRATÓRIO DO GRUPO A.

Árvore filogenética inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Neighbour-joining). Os valores de bootstrap acima de 60% encontram-se indicados próximo aos ramos. A distância evolucionária foi calculada pela distância p. A sequência padrão Long enraizou a árvore filogenética.

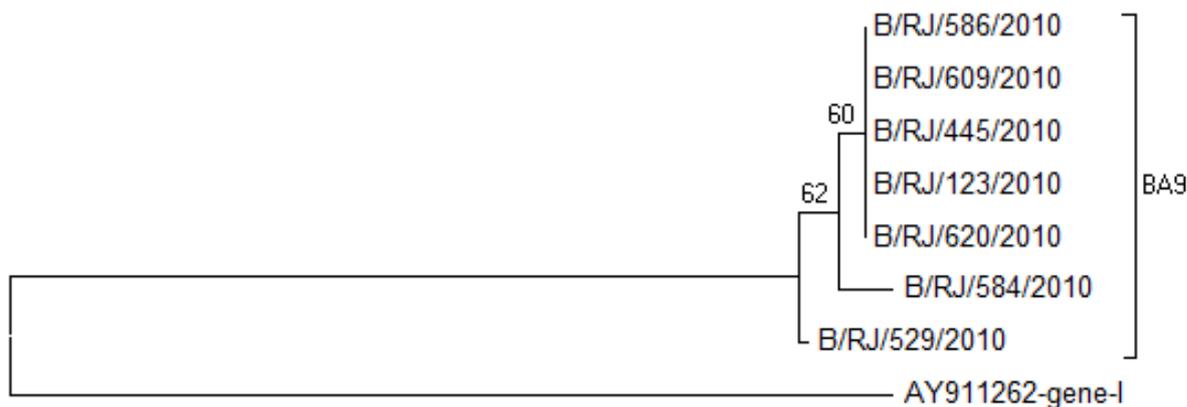


FIGURA 4-16 ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE AS 7 SEQUÊNCIAS DO GENE L DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO DO GRUPO B.

Árvore filogenética inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Neighbour-joining). Os valores de bootstrap acima de 60% encontram-se indicados próximo aos ramos. A distância evolucionária foi calculada pela distância p. A sequência padrão Long enraizou a árvore filogenética.

As sequências deduzidas de aminoácidos do gene L do grupo A e B mostraram-se conservadas, apresentando de 0 a 2 substituições de aminoácidos quando comparadas com a amostra padrão Long. Das amostras sequenciadas, todas as amostras do grupo A apresentaram 2 mutações silenciosas, enquanto as amostras do grupo B apresentaram outras duas mutações também silenciosas.

Curiosamente, ao realizar o Blast das nossas sequências, as amostras A/RJ/5014/2009 e A/RJ/5434/2009 apresentaram maior similaridade com uma amostra dos Estados Unidos classificada como GA7, sendo que no nosso estudo, na árvore filogenética do gene G ela se encontra classificada no genótipo GA2.

O alinhamento entre as nossas amostras e as amostras disponíveis no GenBank, desse gene, mostrou que as nossas amostras são mais conservadas, uma vez que já descreveram algumas substituições de aminoácidos nessa proteína.

5. DISCUSSÃO

O vírus sincicial respiratório é considerado o principal patógeno relacionado às infecções do trato respiratório inferior em lactentes, em crianças na fase pré-escolar e em idosos (149, 186-188). Essas infecções resultam em taxas significativas de morbidade e mortalidade (189), além da sobrecarga financeira sobre os sistemas de saúde (190). Portanto, estudos que abordem a identificação deste patógeno são importantes para possíveis estratégias voltadas ao controle e prevenção da infecção pelo VSR.

No Brasil, o VSR tem sido detectado nas diferentes regiões como o principal agente etiológico em crianças hospitalizadas, com infecções no trato respiratório, bronqueolite e pneumonia na região nordeste (191, 192), sudeste (153, 193-197) e sul (198-200).

A capacidade do VSR em re-infectar o mesmo indivíduo é relacionada às mudanças na propriedade antigênica do vírus, particularmente na glicoproteína G (201, 202), sugerindo que a seleção imune das novas variantes, como indicado nos estudos evolutivos (76, 203, 204), pode contribuir para a epidemiologia das infecções por VSR.

Desde que Peret et al. descreveram em 1998 pela primeira vez a existência dos diferentes genótipos baseado nas análises dessa pequena região C-terminal do gene G, a maioria dos estudos moleculares e evolutivos em VSR A e B tem sido focado nessa região (77).

No presente trabalho analisamos a epidemiologia e evolução molecular (com base no segmento gênico G) do VSR circulantes no Brasil, durante as epidemias de 2006 a 2010. Com o objetivo de buscar um melhor entendimento sobre a circulação e evolução das amostras deste vírus, sequenciamos o gene G de amostras brasileiras. Este segmento gênico codifica para a proteína de superfície do VSR. Através do sequenciamento e análise filogenética das nossas amostras, foi possível determinar a co-circulação dos genótipos do VSR nos estados e período estudados. Ainda, tornou-se possível investigar a ocorrência de polimorfismos no fragmento gênico G. Finalmente, padronizamos o ensaio de sequenciamento do gene L, para

possíveis análises, possibilitando o sequenciamento no laboratório. Tal recurso permite implementar um melhor conhecimento sobre as proteínas virais circulantes no país. Além disso, nossos dados, após a publicação, irão consolidar mais informações sobre esse gene ainda tão pouco estudado e de máxima importância para o vírus.

Informações de epidemiologia do VSR, bem como a identificação de genótipos predominantes e as diferenças de polimorfismos ajudam a entender a transmissão do VSR em hospitais, na comunidade e globalmente.

5.1. Identificação dos grupos de VSR e co-circulação dos genótipos

Ao longo dos anos estudados foi possível identificar a circulação simultânea dos grupos A e B do VSR, como já descrito anteriormente em diferentes países (74, 77, 157, 205-207).

Diferentes padrões de prevalência dos grupos A e B têm sido descritos, variando a duração do domínio de cada grupo. Na Finlândia, em um estudo por 10 anos consecutivos, foi possível observar que o grupo dominante é trocado a cada 2 anos (202). Porém alguns estudos estão descrevendo um padrão cíclico, que consiste de 1 para 2 anos consecutivos, ou seja, a cada dois anos de domínio do grupo A tem um ano de domínio do grupo B. Esse padrão foi primeira mente descrito em Nova Iorque (117) e posteriormente observados no Quênia, Uruguai, Estados Unidos e Bélgica (82, 182, 208, 209). Observando nossos resultados, podemos concluir que um perfil semelhante a esse ocorre no Brasil, uma vez que o após dois anos com maior detecção do grupo A tivemos um ano em que o grupo B foi mais frequente.

O grupo A foi mais encontrado, assim como descrito na literatura, uma vez que a detecção mais frequente de amostras do grupo A do VSR durante surtos, tem sido observada (72, 170, 210).

O VSR tem padrões de circulação complexos, com múltiplos genótipos co-circulando na mesma comunidade, no entanto alguns trabalhos descrevem a substituição do genótipo predominante por outros novos a cada ano (76, 77, 117,

211-214). Em seu estudo por nove anos na Coréia, Choi e Lee observaram que os genótipos não desaparecem completamente de um ano para outro, embora haja mais de um genótipo circulando em uma epidemia, há sempre predomínio de um e ao longo do tempo um genótipo particular desaparece (213). Altos níveis de imunidade materna ou altos níveis de anticorpos do descendente a uma determinada amostra circulante podem diminuir a severidade dos genótipos circulantes em uma epidemia particular, e/ou restringir sua circulação em epidemias subsequentes (72). Isto pode explicar o desaparecimento de determinados genótipos na mesma comunidade (215). Peret e colaboradores em 1998, mostraram em seu estudo que a ocorrência das mudanças nos genótipos do VSR é consistente e uma importante característica da epidemiologia das infecções pelo VSR (77). Fatores como imunidade e desempenho biológico (fitness) do vírus podem determinar o predomínio de determinados genótipos em um surto (216).

No nosso estudo, não identificamos essa mudança anual do genótipo predominante entre as amostras, e sim dois genótipos predominantes, sendo GA2 para o grupo A e BA9 para o grupo B.

As amostras estudadas foram identificadas pertencentes aos genótipos GA2 e GA5 do grupo A do VSR. A circulação desses dois genótipos tem sido descrita mundialmente, já sendo identificado na Bélgica (182), no Japão (217), na Índia (170), na Suécia (184), na Nova Zelândia (218), na África do Sul (78), na Argentina (210) e Montevideu/Uruguai (219).

Alguns estudos tentaram correlacionar diferença na morbidade de infecções definida por hospitalização e necessidade de ventilação mecânica com os diferentes grupos ou genótipos do VSR. Entretanto, a maioria deles não evidenciou tais diferenças (69, 72, 73, 209). Devincenzo sugeriu uma pequena correlação entre determinados grupos e uma maior carga viral (220). De acordo com o estudo de Venter, sugere-se que a mesma amostra do vírus pode causar infecção branda no trato respiratório superior, infecção no trato respiratório inferior e grave doença respiratória. Mesmo em crianças expostas a fatores de risco semelhantes, provavelmente há outros fatores assim como genética e a resposta imune individual, tendo maior influência na gravidade da doença do que as amostras infectantes

(206). No nosso estudo, as amostras de aspirado nasofaríngeo e traqueal obtidas dos mesmos pacientes não foi observado nenhuma substituição de aminoácidos, nem mutações silenciosas de nucleotídeos, sugerindo que a mesma linhagem viral esteja tanto no trato respiratório superior, quanto inferior.

Em um estudo evolutivo com amostras até 2005, Botosso e colaboradores caracterizaram as amostras brasileiras do genótipo GA2, com 5 substituições (216), porém no presente estudo, encontramos uma única coincidência.

Os dados epidemiológicos demonstram que os vírus circulantes em regiões distantes e anos diferentes podem ser filogeneticamente mais próximos do que os isolados da mesma epidemia e mesmo local (167, 169, 170)

O genótipo BA foi primeiramente isolado em amostras coletadas em Buenos Aires durante o ano de 1999 (79). Vários estudos tem demonstrado que desde a ocorrência da inserção, o genótipo BA teve uma dispersão mundial sendo detectado no Japão em 2003 (217) e, posteriormente, observado na China (221), Tailândia (222), Japão (223), África do Sul (165), e na Índia (170), tornando-se o genótipo do grupo B predominante em circulação (81). Sendo assim, era esperado que a maioria das amostras estudadas estivesse incluída nesse genótipo.

Os genótipos têm uma distribuição mundial e vírus isolados em lugares distantes e em diferentes anos podem estar mais relacionados do que vírus isolados no mesmo lugar em dias consecutivos (69, 208). Existem diversos trabalhos descrevendo agrupamentos temporais e geográficos (41, 77, 209, 213, 218, 224, 225).

A análise da epidemiologia molecular do VSR deve ser continua para monitorar a mudança progressiva dos genótipos e acompanhar caso os genótipos atuais venham a desaparecer nos próximos anos, sendo substituídos por novos genótipos. Além disso, é importante na previsão de epidemias futuras e para o desenvolvimento de uma vacina ou terapia antiviral eficaz.

5.2. Caracterização molecular dos segmentos gênicos G e L

5.2.1. Gene G

A diversidade genética do VSR é fortemente associada com as mudanças da proteína G. É possível observar que o padrão de evolução do VSR, é provavelmente determinado por muitos fatores, incluindo a disseminação de um lugar para o outro e o surgimento de novas variantes através da seleção imune. Entretanto ainda não existem estudos consistentes mostrando a diversidade epidemiológica do VSR associada às diferentes morbidades (76, 226, 227).

De acordo com alguns autores, há transferência de linhagens entre as comunidades, visto a proximidade e a facilidade de meios de transporte entre os países (41, 78). Com as nossas análises, confirmamos a distribuição mundial dos genótipos e pelos poucos polimorfismos encontrados e proximidade dos anos entre as amostras encontradas nesse estudo e no mundo podemos concluir que o VSR é dissipado rapidamente, devido a capacidade infecciosa do VSR de ambos os grupos permitir a rápida dispersão de novas variantes (167, 228).

A variabilidade em nível nucleotídeo observada nas regiões variáveis da proteína G das nossas amostras estudadas pode ser uma consequência de seleção positiva, presumivelmente mediada imunologicamente, uma vez que a proteína G é a proteína de membrana viral mais vulnerável à pressão seletiva (203, 215, 216). Diferenças no comprimento da proteína G de ambos os grupos foram observadas, sendo a variabilidade no códon de parada um importante mecanismo na geração de diversidade.

Uma possível explicação para o agrupamento filogenético entre amostras de anos distantes seria o mecanismo evolutivo baseado no modelo genético denominado flip-flop, onde as mutações em aminoácidos tendem a ser revertidas com o passar do tempo, devido à limitação do repertório de aminoácidos funcionalmente viáveis em regiões específicas do vírus (216). Além disso, ainda que limitadas, essas alterações refletem a variabilidade genética do VSR e as mutações fazem com que o mesmo indivíduo possa ser infectado diversas vezes durante a vida, ocasionando surtos anuais (41).

Tem sido sugerido que as inserções e deleções descritas para o grupo B, possam favorecer o vírus para escapar da resposta imune do hospedeiro e contribuir para a capacidade de VSR no estabelecimento de re-infecções ao longo da vida (77, 168, 221, 224)

5.2.2. Gene L

Por se tratar de uma RNA polimerase, a enzima responsável pela replicação e transcrição do genoma do VSR, não apresenta nenhum tipo de atividade revisora propiciando o surgimento de mutações durante a replicação. Presume-se, portanto, que tendem a serem fixadas, mutações que conferem maior adaptabilidade como uma replicação ou um escape do sistema imune mais eficiente. (101). Já se sabe que os aminoácidos não estão distribuídos randomicamente na proteína L, e sim fazem parte de blocos conservados separados por regiões variáveis, compatível com o conceito de domínios funcionais concatenados já vistos para proteínas L de outros vírus (57). Esse gene ainda é pouco estudado, com algumas sequências disponíveis no GenBank e poucos trabalhos publicados.

Conhecimentos sobre esse gene são de grande importância, um estudo para o desenvolvimento de vacina, através do vírus atenuado, identificou 2 mutações no gene L como um importante fator na replicação viral (229), outro estudo identificou que uma polimerase com uma mutação no gene L que era capaz de realizar a replicação genômica, mas não era capaz de terminar a transcrição do gene, gerando RNA mensageiros policistrônicos (65). Porém, não foi encontrado trabalhos na região sequenciada no nosso estudo.

Talvez, uma metodologia de sequenciamento mais sensível seja capaz de identificar linhagens virais com polimerases defectivas, uma vez que a taxa de mutação no genoma viral é alta e deve ocorrer também no gene L, porém como é um gene muito sensível à mutação (57), não conseguimos identificá-los com as metodologias tradicionais, que selecionam a população majoritária do vírus.

É possível identificar diferenças entre os grupos A e B quando analisamos a região entre os blocos II e III em nucleotídeos, mas ao analisar os aminoácidos, não

há alterações, caracterizando polimorfismos silenciosos. Nossos resultados confirmaram o alto grau de conservação desse gene.

6. CONCLUSÕES

Foi possível observar que os dois grupos do Vírus Sincicial Respiratório co-circularam ao longo dos anos estudados (2006-2010);

Os genótipos GA2 e GA5 foram encontrados para as amostras VSR do grupo A, sendo que o GA2 foi mais identificado e ocorreu durante todo o estudo;

No grupo B, a maioria das amostras mostrou a duplicação de 60nt e foi incluída no genótipo BA, porém também foi identificado o genótipo GB3.

Na análise de variabilidade do gene G, identificamos polimorfismos para ambos os grupos, co-relacionamos com o ano e com amostras distribuídas em algumas partes do mundo;

Nas análises realizadas para o gene L foi possível observar que esse fragmento foi capaz de distinguir os grupos do VSR, assim como os genótipos encontrados;

O fragmento do gene L se mostrou conservado, assim como era esperado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol.* 2008 Mar;82(5):2040-55.
2. Anderson LJ, Parker RA, Strikas RL. Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. *J Infect Dis.* 1990 Apr;161(4):640-6.
3. Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1991 Apr;163(4):693-8.
4. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med.* 2005 Apr 28;352(17):1749-59.
5. Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Jul;13(3):371-84.
6. Hall CB, Powell KR, MacDonald NE, Gala CL, Menegus ME, Suffin SC, et al. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *N Engl J Med.* 1986 Jul 10;315(2):77-81.
7. Blount RE, Jr., Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956 Jul;92(3):544-9.
8. Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg.* 1957 Nov;66(3):281-90.
9. Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.* 1957 Nov;66(3):291-300.
10. Parrott RH, Vargosko AJ, Kim HW, Cumming C, Turner H, Huebner RJ, et al. Respiratory syncytial virus. II. Serologic studies over a 34-month period of children with bronchiolitis, pneumonia, and minor respiratory diseases. *JAMA.* 1961 May 27;176:653-7.
11. Kapikian AZ, Bell JA, Mastrota FM, Johnson KM, Huebner RJ, Chanock RM. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. *Am J Hyg.* 1961 Nov;74:234-48.
12. Beem M, Wright FH, Hamre D, Egerer R, Oehme M. Association of the chimpanzee coryza agent with acute respiratory disease in children. *N Engl J Med.* 1960 Sep 15;263:523-30.
13. McClelland L, Hilleman MR, Hamparian VV, Ketler A, Reilly CM, Cornfeld D, et al. Studies of acute respiratory illnesses caused by respiratory syncytial virus. 2. Epidemiology and assessment of importance. *N Engl J Med.* 1961 Jun 8;264:1169-75.
14. Candeias JA. [Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1967 Jan-Feb;9(1):27-30.

15. Siqueira MM, do Nascimento JP. Respiratory syncytial virus: occurrence of subgroups A and B strains in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990 Oct-Dec;85(4):483-4.
16. ICTV. Human Respiratory Syncytial Virus. ICTVdb - The Universal Virus Database. 2006.
17. Norrby E, Marusyk H, Orvell C. Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero). *J Virol.* 1970 Aug;6(2):237-42.
18. Huang YT, Wertz GW. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J Virol.* 1982 Jul;43(1):150-7.
19. Collins PL, Crowe, J. E. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: Wilkins LW, editor. *Fields Virology*, 5th edition. Knipe, David M., Howley, Peter M. ed; 2007.
20. Collins PL, Wertz GW. cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jun;80(11):3208-12.
21. Collins PL, Huang YT, Wertz GW. Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes. *J Virol.* 1984 Feb;49(2):572-8.
22. Levine S. Polypeptides of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 1977 Jan;21(1):427-31.
23. Huang YT, Wertz GW. Respiratory syncytial virus mRNA coding assignments. *J Virol.* 1983 May;46(2):667-72.
24. Bernstein JM, Hruska JF. Respiratory syncytial virus proteins: identification by immunoprecipitation. *J Virol.* 1981 Apr;38(1):278-85.
25. Dubovi EJ. Analysis of proteins synthesized in respiratory syncytial virus-infected cells. *J Virol.* 1982 May;42(2):372-8.
26. Fernie BF, Gerin JL. Immunochemical identification of viral and nonviral proteins of the respiratory syncytial virus virion. *Infect Immun.* 1982 Jul;37(1):243-9.
27. Respiratory Syncytial Virus. *ViralZone*; 2011 [updated 2011; cited]; Available from: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/90.html.
28. Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1987 Sep;68 (Pt 9):2521-4.
29. Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 9;94(25):13961-6.
30. Techaarpornkul S, Barretto N, Peebles ME. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol.* 2001 Aug;75(15):6825-34.

31. Teng MN, Whitehead SS, Collins PL. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology*. 2001 Oct 25;289(2):283-96.
32. Melero JA, Garcia-Barreno B, Martinez I, Pringle CR, Cane PA. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol*. 1997 Oct;78 (Pt 10):2411-8.
33. Satake M, Coligan JE, Elango N, Norrby E, Venkatesan S. Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure. *Nucleic Acids Res*. 1985 Nov 11;13(21):7795-812.
34. Peeples M, Levine S. Respiratory syncytial virus polypeptides: their location in the virion. *Virology*. 1979 May;95(1):137-45.
35. Collins PL, Mottet G. Oligomerization and post-translational processing of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus: altered O-glycosylation in the presence of brefeldin A. *J Gen Virol*. 1992 Apr;73 (Pt 4):849-63.
36. Lambert DM. Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology*. 1988 Jun;164(2):458-66.
37. Palomo C, Garcia-Barreno B, Penas C, Melero JA. The G protein of human respiratory syncytial virus: significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. *J Gen Virol*. 1991 Mar;72 (Pt 3):669-75.
38. Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jun;82(12):4075-9.
39. Lichtenstein DL, Roberts SR, Wertz GW, Ball LA. Definition and functional analysis of the signal/anchor domain of the human respiratory syncytial virus glycoprotein G. *J Gen Virol*. 1996 Jan;77 (Pt 1):109-18.
40. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Aug;84(16):5625-9.
41. Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, et al. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis*. 2000 Jun;181(6):1891-6.
42. Rueda P, Garcia-Barreno B, Melero JA. Loss of conserved cysteine residues in the attachment (G) glycoprotein of two human respiratory syncytial virus escape mutants that contain multiple A-G substitutions (hypermutations). *Virology*. 1994 Feb;198(2):653-62.
43. Langedijk JP, Schaaper WM, Meloen RH, van Oirschot JT. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*. 1996 Jun;77 (Pt 6):1249-57.
44. Hendricks DA, McIntosh K, Patterson JL. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1988 Jul;62(7):2228-33.

45. Escribano-Romero E, Rawling J, Garcia-Barreno B, Melero JA. 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.* 2004 Apr;78(7):3524-32.
46. Graham BS, Johnson TR, Peebles RS. Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology.* 2000 Jul 25;48(3):237-47.
47. Arnold R, Konig B, Werchau H, Konig W. Respiratory syncytial virus deficient in soluble G protein induced an increased proinflammatory response in human lung epithelial cells. *Virology.* 2004 Dec 20;330(2):384-97.
48. Barik S. Transcription of human respiratory syncytial virus genome RNA in vitro: requirement of cellular factor(s). *J Virol.* 1992 Nov;66(11):6813-8.
49. Barik S. The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA. *J Gen Virol.* 1993 Mar;74 (Pt 3):485-90.
50. Mason SW, Lawetz C, Gaudette Y, Do F, Scouten E, Lagace L, et al. Polyadenylation-dependent screening assay for respiratory syncytial virus RNA transcriptase activity and identification of an inhibitor. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(16):4758-67.
51. Cevik B, Holmes DE, Vrotsos E, Feller JA, Smallwood S, Moyer SA. The phosphoprotein (P) and L binding sites reside in the N-terminus of the L subunit of the measles virus RNA polymerase. *Virology.* 2004 Oct 1;327(2):297-306.
52. Cevik B, Smallwood S, Moyer SA. The L-L oligomerization domain resides at the very N-terminus of the sendai virus L RNA polymerase protein. *Virology.* 2003 Sep 1;313(2):525-36.
53. Holmes DE, Moyer SA. The phosphoprotein (P) binding site resides in the N terminus of the L polymerase subunit of sendai virus. *J Virol.* 2002 Mar;76(6):3078-83.
54. Chattopadhyay A, Shaila MS. Rinderpest virus RNA polymerase subunits: mapping of mutual interacting domains on the large protein L and phosphoprotein p. *Virus Genes.* 2004 Mar;28(2):169-78.
55. Chandrika R, Horikami SM, Smallwood S, Moyer SA. Mutations in conserved domain I of the Sendai virus L polymerase protein uncouple transcription and replication. *Virology.* 1995 Nov 10;213(2):352-63.
56. Horikami SM, Smallwood S, Bankamp B, Moyer SA. An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. *Virology.* 1994 Dec;205(2):540-5.
57. Poch O, Blumberg BM, Bougueleret L, Tordo N. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol.* 1990 May;71 (Pt 5):1153-62.
58. Malur AG, Choudhary SK, De BP, Banerjee AK. Role of a highly conserved NH(2)-terminal domain of the human parainfluenza virus type 3 RNA polymerase. *J Virol.* 2002 Aug;76(16):8101-9.

59. Sleat DE, Banerjee AK. Transcriptional activity and mutational analysis of recombinant vesicular stomatitis virus RNA polymerase. *J Virol.* 1993 Mar;67(3):1334-9.
60. Rahmeh AA, Schenk AD, Danek EI, Kranzusch PJ, Liang B, Walz T, et al. Molecular architecture of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 16;107(46):20075-80.
61. Ferron F, Longhi S, Henrissat B, Canard B. Viral RNA-polymerases -- a predicted 2'-O-ribose methyltransferase domain shared by all Mononegavirales. *Trends Biochem Sci.* 2002 May;27(5):222-4.
62. Li J, Rahmeh A, Morelli M, Whelan SP. A conserved motif in region v of the large polymerase proteins of nonsegmented negative-sense RNA viruses that is essential for mRNA capping. *J Virol.* 2008 Jan;82(2):775-84.
63. Ogino T, Banerjee AK. Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Mol Cell.* 2007 Jan 12;25(1):85-97.
64. Dochow M, Krumm SA, Crowe JE, Jr., Moore ML, Plemper RK. Independent structural domains in the paramyxovirus polymerase protein. *J Biol Chem.* 2012 Jan 3.
65. Cartee TL, Megaw AG, Oomens AG, Wertz GW. Identification of a single amino acid change in the human respiratory syncytial virus L protein that affects transcriptional termination. *J Virol.* 2003 Jul;77(13):7352-60.
66. Coates HV, Alling DW, Chanock RM. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. *Am J Epidemiol.* 1966 Mar;83(2):299-313.
67. Gimenez HB, Cash P, Melvin WT. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. *J Gen Virol.* 1984 May;65 (Pt 5):963-71.
68. Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1985 Oct;66 (Pt 10):2111-24.
69. Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 1985 Apr;151(4):626-33.
70. Martinez I, Dopazo J, Melero JA. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol.* 1997 Oct;78 (Pt 10):2419-29.
71. Sullender WM, Sun L, Anderson LJ. Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J Clin Microbiol.* 1993 May;31(5):1224-31.
72. Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol.* 2001 Mar-Apr;11(2):103-16.
73. Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Tsutsumi H. Genetic variability and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus subgroup a strains in Japan determined by heteroduplex mobility assay. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):2048-53.

74. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol.* 1991 Sep;72 (Pt 9):2091-6.
75. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of relatedness of subgroup A respiratory syncytial viruses isolated worldwide. *Virus Res.* 1992 Sep 1;25(1-2):15-22.
76. Garcia O, Martin M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, et al. Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol.* 1994 Sep;68(9):5448-59.
77. Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol.* 1998 Sep;79 (Pt 9):2221-9.
78. Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. 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.* 2001 Sep;82(Pt 9):2117-24.
79. Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, Garcia-Barreno B, Melero JA, et al. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol.* 2003 Nov;84(Pt 11):3115-20.
80. Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, et al. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J Virol.* 2006 Jan;80(2):975-84.
81. Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, et al. New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. *J Clin Microbiol.* 2010 Sep;48(9):3423-7.
82. Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 May;100(3):221-30.
83. Arnott A, Vong S, Mardy S, Chu S, Naughtin M, Sovann L, et al. A study of the genetic variability of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Cambodia reveals the existence of a new HRSV group B genotype. *J Clin Microbiol.* 2011 Oct;49(10):3504-13.
84. Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H, Suzuki Y, Kumaki A, et al. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol.* 2009 Aug;47(8):2475-82.
85. Baek YH, Choi EH, Song MS, Pascua PN, Kwon HI, Park SJ, et al. Prevalence and genetic characterization of respiratory syncytial virus (RSV) in hospitalized children in Korea. *Arch Virol.* 2012 Jun;157(6):1039-50.
86. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One.* 2012;7(3):e32807.

87. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
88. Lentz TL. The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. *J Gen Virol*. 1990 Apr;71 (Pt 4):751-66.
89. Mettenleiter TC, Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, Kern H, Ben-Porat T. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J Virol*. 1990 Jan;64(1):278-86.
90. Hallak LK, Kwilas SA, Peeples ME. Interaction between respiratory syncytial virus and glycosaminoglycans, including heparan sulfate. *Methods Mol Biol*. 2007;379:15-34.
91. Krusat T, Streckert HJ. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. *Arch Virol*. 1997;142(6):1247-54.
92. Hallak LK, Spillmann D, Collins PL, Peeples ME. Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. *J Virol*. 2000 Nov;74(22):10508-13.
93. Martinez I, Melero JA. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol*. 2000 Nov;81(Pt 11):2715-22.
94. Sugrue RJ. Interactions between respiratory syncytial virus and the host cell: opportunities for antiviral strategies? *Expert Rev Mol Med*. 2006;8(21):1-17.
95. Crim RL, Audet SA, Feldman SA, Mostowski HS, Beeler JA. Identification of linear heparin-binding peptides derived from human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein that inhibit infectivity. *J Virol*. 2007 Jan;81(1):261-71.
96. Routledge EG, Willcocks MM, Morgan L, Samson AC, Scott R, Toms GL. Expression of the respiratory syncytial virus 22K protein on the surface of infected HeLa cells. *J Gen Virol*. 1987 Apr;68 (Pt 4):1217-22.
97. Walsh EE, Hruska J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Virol*. 1983 Jul;47(1):171-7.
98. Yeo DS, Chan R, Brown G, Ying L, Sutejo R, Aitken J, et al. Evidence that selective changes in the lipid composition of raft-membranes occur during respiratory syncytial virus infection. *Virology*. 2009 Mar 30;386(1):168-82.
99. Fearn R, Peeples ME, Collins PL. Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2002 Feb;76(4):1663-72.
100. Kingsbury DT. Genetics of response to slow virus (prion) infection. *Annu Rev Genet*. 1990;24:115-32.
101. Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol*. 2006 Jul;87(Pt 7):1805-21.
102. Hall CB, Long CE, Schnabel KC. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect Dis*. 2001 Sep 15;33(6):792-6.

103. Domachowske JB, Rosenberg HF. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Apr;12(2):298-309.
104. Hall CB, Geiman JM, Biggar R, Kotok DI, Hogan PM, Douglas GR, Jr. Respiratory syncytial virus infections within families. *N Engl J Med.* 1976 Feb 19;294(8):414-9.
105. Pitkaranta A, Jero J, Arruda E, Virolainen A, Hayden FG. Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion. *J Pediatr.* 1998 Sep;133(3):390-4.
106. Winther B, Hayden FG, Arruda E, Dutkowski R, Ward P, Hendley JO. Viral respiratory infection in schoolchildren: effects on middle ear pressure. *Pediatrics.* 2002 May;109(5):826-32.
107. Welliver TP, Garofalo RP, Hosakote Y, Hintz KH, Avendano L, Sanchez K, et al. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *J Infect Dis.* 2007 Apr 15;195(8):1126-36.
108. Johnson JE, Gonzales RA, Olson SJ, Wright PF, Graham BS. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol.* 2007 Jan;20(1):108-19.
109. Kusel MM, de Klerk NH, Keadze T, Vohma V, Holt PG, Johnston SL, et al. Early-life respiratory viral infections, atopic sensitization, and risk of subsequent development of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 May;119(5):1105-10.
110. Bowden RA. Respiratory virus infections after marrow transplant: the Fred Hutchinson Cancer Research Center experience. *Am J Med.* 1997 Mar 17;102(3A):27-30; discussion 42-3.
111. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5 Suppl A:S119-26.
112. Falsey AR, Cunningham CK, Barker WH, Kouides RW, Yuen JB, Menegus M, et al. Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J Infect Dis.* 1995 Aug;172(2):389-94.
113. Dowell SF, Anderson LJ, Gary HE, Jr., Erdman DD, Plouffe JF, File TM, Jr., et al. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. *J Infect Dis.* 1996 Sep;174(3):456-62.
114. Russi JC, Chiparelli H, Montano A, Etorena P, Hortal M. Respiratory syncytial virus subgroups and pneumonia in children. *Lancet.* 1989 Oct 28;2(8670):1039-40.
115. Brouard J, Freymuth F, Constantini S, Petitjean J, de Schrevel G, Duhamel JF. [Prevalence and clinical aspects of A and B subgroups of respiratory syncytial virus infection. Observation of 8 consecutive epidemics between 1982 and 1990]. *Arch Fr Pediatr.* 1993 Oct;50(8):639-43.
116. Taylor CE, Morrow S, Scott M, Young B, Toms GL. Comparative virulence of respiratory syncytial virus subgroups A and B. *Lancet.* 1989 Apr 8;1(8641):777-8.

117. Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, et al. 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.* 1990 Dec;162(6):1283-90.
118. Hornsleth A, Klug B, Nir M, Johansen J, Hansen KS, Christensen LS, et al. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions. *Pediatr Infect Dis J.* 1998 Dec;17(12):1114-21.
119. Perez-Yarza EG, Moreno A, Lazaro P, Mejias A, Ramilo O. The association between respiratory syncytial virus infection and the development of childhood asthma: a systematic review of the literature. *Pediatr Infect Dis J.* 2007 Aug;26(8):733-9.
120. Harris J, Werling D. Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response. *Cell Microbiol.* 2003 Oct;5(10):671-80.
121. Schaller M, Hogaboam CM, Lukacs N, Kunkel SL. Respiratory viral infections drive chemokine expression and exacerbate the asthmatic response. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Aug;118(2):295-302; quiz 3-4.
122. Bueno SM, Gonzalez PA, Pacheco R, Leiva ED, Cautivo KM, Tobar HE, et al. Host immunity during RSV pathogenesis. *Int Immunopharmacol.* 2008 Oct;8(10):1320-9.
123. Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Jr., Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med.* 1979 Mar 8;300(10):530-4.
124. Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr.* 1981 May;98(5):708-15.
125. Roca A, Quinto L, Abacassamo F, Loscertales MP, Gomez-Olive FX, Fenwick F, et al. Antibody response after RSV infection in children younger than 1 year of age living in a rural area of Mozambique. *J Med Virol.* 2003 Apr;69(4):579-87.
126. Vieira SE, Gilio AE, Durigon EL, Ejzenberg B. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus in infants: the role played by specific antibodies. *Clinics (Sao Paulo).* 2007 Dec;62(6):709-16.
127. Cox MJ, Azevedo RS, Cane PA, Massad E, Medley GF. Seroepidemiological study of respiratory syncytial virus in Sao Paulo state, Brazil. *J Med Virol.* 1998 Jul;55(3):234-9.
128. Shinoff JJ, O'Brien KL, Thumar B, Shaw JB, Reid R, Hua W, et al. Young infants can develop protective levels of neutralizing antibody after infection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 2008 Oct 1;198(7):1007-15.
129. Hambling MH. A Survey of Antibodies to Respiratory Syncytial Virus in the Population. *Br Med J.* 1964 May 9;1(5392):1223-5.
130. Doggett JE, Taylor-Robinson D. Serological studies with respiratory syncytial virus. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1965;15(5):601-8.

131. Hillis WD, Cooper MR, Bang FB, Dey AK, Shah KV. Respiratory syncytial virus infection in children in West Bengal. *Indian J Med Res.* 1971 Sep;59(9):1354-64.
132. Queiroz DA, Durigon EL, Botosso VF, Ejzemberg B, Vieira SE, Mineo JR, et al. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Oct;35(10):1183-93.
133. Tsutsumi H. [Respiratory syncytial virus infection]. *Kansenshogaku Zasshi.* 2005 Nov;79(11):857-63.
134. Olmsted RA, Elango N, Prince GA, Murphy BR, Johnson PR, Moss B, et al. Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Oct;83(19):7462-6.
135. Stott EJ, Taylor G, Ball LA, Anderson K, Young KK, King AM, et al. Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J Virol.* 1987 Dec;61(12):3855-61.
136. Walsh EE, Hall CB, Briselli M, Brandriss MW, Schlesinger JJ. Immunization with glycoprotein subunits of respiratory syncytial virus to protect cotton rats against viral infection. *J Infect Dis.* 1987 Jun;155(6):1198-204.
137. Polack FP, Irusta PM, Hoffman SJ, Schiatti MP, Melendi GA, Delgado MF, et al. The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 21;102(25):8996-9001.
138. Alwan WH, Record FM, Openshaw PJ. Phenotypic and functional characterization of T cell lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins. *J Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5211-8.
139. Graham BS, Henderson GS, Tang YW, Lu X, Neuzil KM, Colley DG. Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *J Immunol.* 1993 Aug 15;151(4):2032-40.
140. Bukreyev A, Serra ME, Laham FR, Melendi GA, Kleeberger SR, Collins PL, et al. The cysteine-rich region and secreted form of the attachment G glycoprotein of respiratory syncytial virus enhance the cytotoxic T-lymphocyte response despite lacking major histocompatibility complex class I-restricted epitopes. *J Virol.* 2006 Jun;80(12):5854-61.
141. Kellogg JA. Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. *Arch Pathol Lab Med.* 1991 May;115(5):451-8.
142. Collins PL, Murphy BR. Respiratory syncytial virus: reverse genetics and vaccine strategies. *Virology.* 2002 May 10;296(2):204-11.
143. Tantivanich S, Suphanaranonda K, Balachanda K, Anderson R. Detection of respiratory syncytial virus from clinical specimens: comparison between reverse transcription polymerase chain reaction and tissue culture. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1995 Dec;26(4):684-8.

144. van Elden LJ, van Kraaij MG, Nijhuis M, Hendriksen KA, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, et al. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2002 Jan 15;34(2):177-83.
145. Jordan WS, Jr. Growth characteristics of respiratory syncytial virus. *J Immunol*. 1962 May;88:581-90.
146. Kisch AL, Johnson KM. A plaque assay for respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1963 Mar;112:583-9.
147. Taylor-Robinson D, Doggett JE. An Assay Method for Respiratory Syncytial Virus. *Br J Exp Pathol*. 1963 Oct;44:473-80.
148. Schieble JH, Kase A, Lennette EH. Fluorescent cell counting as an assay method for respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1967 Jun;1(3):494-9.
149. Salter A, Laoi BN, Crowley B. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroups A and B identified in adults with hematological malignancy attending an Irish hospital between 2004 and 2009. *J Med Virol*. 2011 Feb;83(2):337-47.
150. Zhang ZY, Du LN, Chen X, Zhao Y, Liu EM, Yang XQ, et al. Genetic variability of respiratory syncytial viruses (RSV) prevalent in Southwestern China from 2006 to 2009: emergence of subgroup B and A RSV as dominant strains. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr;48(4):1201-7.
151. Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, et al. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. *BMC Infect Dis*. 2011;11:168.
152. Law BJ, Carbonell-Estrany X, Simoes EA. An update on respiratory syncytial virus epidemiology: a developed country perspective. *Respir Med*. 2002 Apr;96 Suppl B:S1-7.
153. Checon RE, Siqueira MM, Lugon AK, Portes S, Dietze R. Short report: seasonal pattern of respiratory syncytial virus in a region with a tropical climate in southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Nov;67(5):490-1.
154. Moura FE, Nunes IF, Silva GB, Jr., Siqueira MM. Respiratory syncytial virus infections in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Jan;74(1):165-7.
155. Stralioatto SM, Nestor SM, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Feb;96(2):155-8.
156. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Sep-Oct;83(5):422-8.
157. Nascimento JP, Siqueira MM, Sutmoller F, Krawczuk MM, de Farias V, Ferreira V, et al. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991 Jul-Aug;33(4):287-96.

158. Weber A, Weber M, Milligan P. Modeling epidemics caused by respiratory syncytial virus (RSV). *Math Biosci.* 2001 Aug;172(2):95-113.
159. Waris M, White LJ. Seasonality of respiratory syncytial virus infection. *Clin Infect Dis.* 2006 Aug 15;43(4):541.
160. Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health.* 1998 Apr;3(4):268-80.
161. Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes EA. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *Pediatr Infect Dis J.* 2003 Feb;22(2 Suppl):S21-32.
162. Moura FE, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, de Sierra MJ, Tome L, et al. Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. *J Med Virol.* 2004 Sep;74(1):156-60.
163. da Silva LH, Spilki FR, Riccetto AG, de Almeida RS, Baracat EC, Arns CW. Genetic variability in the G protein gene of human respiratory syncytial virus isolated from the Campinas metropolitan region, Brazil. *J Med Virol.* 2008 Sep;80(9):1653-60.
164. Sovero M, Garcia J, Kochel T, Laguna-Torres VA, Gomez J, Chicaiza W, et al. Circulating strains of human respiratory syncytial virus in central and South America. *PLoS One.* 2011;6(8):e22111.
165. Visser A, Delport S, Venter M. Molecular epidemiological analysis of a nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus associated pneumonia in a kangaroo mother care unit in South Africa. *J Med Virol.* 2008 Apr;80(4):724-32.
166. Ostlund MR, Lindell AT, Stenler S, Riedel HM, Wirgart BZ, Grillner L. Molecular epidemiology and genetic variability of respiratory syncytial virus (RSV) in Stockholm, 2002-2003. *J Med Virol.* 2008 Jan;80(1):159-67.
167. Montieri S, Puzelli S, Ciccozzi M, Calzoletti L, Di Martino A, Milia MG, et al. Amino acid changes in the attachment G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses (subgroup A) isolated in Italy over several epidemics (1997-2006). *J Med Virol.* 2007 Dec;79(12):1935-42.
168. Reiche J, Schweiger B. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1800-10.
169. Zhang Y, Xu W, Shen K, Xie Z, Sun L, Lu Q, et al. Genetic variability of group A and B human respiratory syncytial viruses isolated from 3 provinces in China. *Arch Virol.* 2007;152(8):1425-34.
170. Parveen S, Sullender WM, Fowler K, Lefkowitz EJ, Kapoor SK, Broor S. Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. *J Clin Microbiol.* 2006 Sep;44(9):3055-64.
171. Rebuffo-Scheer C, Bose M, He J, Khaja S, Ulatowski M, Beck ET, et al. Whole genome sequencing and evolutionary analysis of human respiratory syncytial virus A and B from Milwaukee, WI 1998-2010. *PLoS One.* 2011;6(10):e25468.

172. Hall CB. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the "Cold War" has not ended. *Clin Infect Dis*. 2000 Aug;31(2):590-6.
173. Couch RB. A new antiviral agent for influenza--is there a clinical niche? *N Engl J Med*. 1997 Sep 25;337(13):927-8.
174. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969 Apr;89(4):422-34.
175. Wright PF, Karron RA, Belshe RB, Thompson J, Crowe JE, Jr., Boyce TG, et al. Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. *J Infect Dis*. 2000 Nov;182(5):1331-42.
176. Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res*. 2011 Dec;162(1-2):80-99.
177. Ausar SF, Rexroad J, Frolov VG, Look JL, Konar N, Middaugh CR. Analysis of the thermal and pH stability of human respiratory syncytial virus. *Mol Pharm*. 2005 Nov-Dec;2(6):491-9.
178. Elango N, Prince GA, Murphy BR, Venkatesan S, Chanock RM, Moss B. Resistance to human respiratory syncytial virus (RSV) infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the RSV G glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Mar;83(6):1906-10.
179. Sidwell RW, Barnard DL. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. *Antiviral Res*. 2006 Sep;71(2-3):379-90.
180. Chidgey SM, Broadley KJ. Respiratory syncytial virus infections: characteristics and treatment. *J Pharm Pharmacol*. 2005 Nov;57(11):1371-81.
181. Ventre K, Randolph AG. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(1):CD000181.
182. Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaeker N, Naranjo C, Van Ranst M. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J Clin Microbiol*. 2007 Sep;45(9):3022-30.
183. Carromeu C, Simabuco FM, Tamura RE, Farinha Arcieri LE, Ventura AM. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. *Arch Virol*. 2007;152(12):2259-63.
184. Rafiefard F, Johansson B, Tecle T, Orvell C. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) of group A in Stockholm, Sweden, between 1965 and 2003. *Virus Res*. 2004 Oct;105(2):137-45.
185. Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol*. 1999 Aug;73(8):6610-7.

186. Forster J, Ihorst G, Rieger CH, Stephan V, Frank HD, Gurth H, et al. Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infections in children under 3 years of age (the PRI.DE study). *Eur J Pediatr*. 2004 Dec;163(12):709-16.
187. Leader S, Kohlhase K. Respiratory syncytial virus-coded pediatric hospitalizations, 1997 to 1999. *Pediatr Infect Dis J*. 2002 Jul;21(7):629-32.
188. Zhang HY, Li ZM, Zhang GL, Diao TT, Cao CX, Sun HQ. Respiratory viruses in hospitalized children with acute lower respiratory tract infections in harbin, China. *Jpn J Infect Dis*. 2009 Nov;62(6):458-60.
189. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*. 2009 Feb 5;360(6):588-98.
190. Forbes ML, Hall CB, Jackson A, Masaquel AS, Mahadevia PJ. Comparative costs of hospitalisation among infants at high risk for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection during the first year of life. *J Med Econ*. 2010 Mar;13(1):136-41.
191. Moura FE, Borges LC, Portes SA, Ramos EA, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Sep;98(6):739-43.
192. Souza LS, Ramos EA, Carvalho FM, Guedes VM, Rocha CM, Soares AB, et al. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. *Pediatr Pulmonol*. 2003 Mar;35(3):184-91.
193. De Paulis M, Gilio AE, Ferraro AA, Ferronato AE, do Sacramento PR, Botosso VF, et al. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2011 Jul-Aug;87(4):307-13.
194. Nascimento MS, Souza AV, Ferreira AV, Rodrigues JC, Abramovici S, Silva Filho LV. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(11):1133-7.
195. Riccetto AG, Silva LH, Spilki FR, Morcillo AM, Arns CW, Baracat EC. Genotypes and clinical data of respiratory syncytial virus and metapneumovirus in brazilian infants: a new perspective. *Braz J Infect Dis*. 2009 Feb;13(1):35-9.
196. Oliveira TF, Freitas GR, Ribeiro LZ, Yokosawa J, Siqueira MM, Portes SA, et al. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clinicas of Uberlandia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Aug;103(5):417-22.
197. D'Elia C, Siqueira MM, Portes SA, Sant'Anna CC. [Respiratory syncytial virus -- associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 Jan-Feb;38(1):7-10.
198. Tsuchiya LR, Costa LM, Raboni SM, Nogueira MB, Pereira LA, Rotta I, et al. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect*. 2005 Dec;51(5):401-7.

199. Raboni SM, Nogueira MB, Tsuchiya LR, Takahashi GA, Pereira LA, Pasquini R, et al. Respiratory tract viral infections in bone marrow transplant patients. *Transplantation*. 2003 Jul 15;76(1):142-6.
200. Straliozzo SM, Siqueira MM, Machado V, Maia TM. Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Dec;99(8):883-7.
201. Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrby E. Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J Clin Microbiol*. 1987 Aug;25(8):1535-9.
202. Waris M. Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: two-year cycles with alternating prevalence of groups A and B. *J Infect Dis*. 1991 Mar;163(3):464-9.
203. Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virol*. 1995 May;69(5):2918-25.
204. Yamaguchi M, Sano Y, Daput IC, Saito R, Suzuki Y, Kumaki A, et al. High frequency of repeated infections due to emerging genotypes of human respiratory syncytial viruses among children during eight successive epidemic seasons in Japan. *J Clin Microbiol*. 2011 Mar;49(3):1034-40.
205. Carballal G, Videla C, Sequeira MD, Mistchenko A, Requeijo PV, Arbiza J. Respiratory syncytial virus: changes in prevalence of subgroups A and B among Argentinian children, 1990-1996. *J Med Virol*. 2000 Jun;61(2):275-9.
206. Venter M, Collinson M, Schoub BD. Molecular epidemiological analysis of community circulating respiratory syncytial virus in rural South Africa: Comparison of viruses and genotypes responsible for different disease manifestations. *J Med Virol*. 2002 Nov;68(3):452-61.
207. Arbiza J, Berois M, Delfraro A, Frabasile S, Mitoma FD, Milk R, et al. Genetic characterization of respiratory syncytial viruses isolated from consecutive acute respiratory infections in a HIV infected child. *J Clin Virol*. 2006 Jan;35(1):41-5.
208. Coggins WB, Lefkowitz EJ, Sullender WM. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol*. 1998 Dec;36(12):3552-7.
209. Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF, et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol*. 2004 Oct;74(2):344-54.
210. Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2266-73.
211. Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, McIntosh K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*. 1991 Apr;163(4):687-92.

212. Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin Microbiol.* 1994 Jan;32(1):1-4.
213. Choi EH, Lee HJ. Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B of respiratory syncytial viruses isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. *J Infect Dis.* 2000 May;181(5):1547-56.
214. Galiano MC, Luchsinger V, Videla CM, De Souza L, Puch SS, Palomo C, et al. Intragroup antigenic diversity of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Argentina and Chile. *J Med Virol.* 2005 Oct;77(2):311-6.
215. Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment g glycoprotein. *J Virol.* 2004 May;78(9):4675-83.
216. Botosso VF, Zanotto PM, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, et al. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. *PLoS Pathog.* 2009 Jan;5(1):e1000254.
217. Sato M, Saito R, Sakai T, Sano Y, Nishikawa M, Sasaki A, et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):36-40.
218. Matheson JW, Rich FJ, Cohet C, Grimwood K, Huang QS, Penny D, et al. Distinct patterns of evolution between respiratory syncytial virus subgroups A and B from New Zealand isolates collected over thirty-seven years. *J Med Virol.* 2006 Oct;78(10):1354-64.
219. Frabasile S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, de Sierra MJ, et al. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. *J Med Virol.* 2003 Oct;71(2):305-12.
220. DeVincenzo J, Lambkin-Williams R, Wilkinson T, Cehelsky J, Nochur S, Walsh E, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 11;107(19):8800-5.
221. Zhang RF, Jin Y, Xie ZP, Liu N, Yan KL, Gao HC, et al. Human respiratory syncytial virus in children with acute respiratory tract infections in China. *J Clin Microbiol.* 2010 Nov;48(11):4193-9.
222. Boonyasuppayakorn S, Kowitdamrong E, Bhattarakosol P. Molecular and demographic analysis of respiratory syncytial virus infection in patients admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand, 2007. *Influenza Other Respi Viruses.* 2010 Sep;4(5):313-23.
223. Goto-Sugai K, Tsukagoshi H, Mizuta K, Matsuda S, Noda M, Sugai T, et al. Genotyping and phylogenetic analysis of the major genes in respiratory syncytial virus isolated from infants with bronchiolitis. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Nov;63(6):393-400.
224. Viegas M, Mistchenko AS. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004) in Argentina. *J Med Virol.* 2005 Oct;77(2):302-10.

225. Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Yui I, Kase T, Nakayama T, et al. A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses group A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002. *J Med Virol.* 2005 Jun;76(2):241-7.
226. Johnson PR, Jr., Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, et al. 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.* 1987 Oct;61(10):3163-6.
227. Cintra OA, Owa MA, Machado AA, Cervi MC, Figueiredo LT, Rocha GM, et al. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. *J Med Virol.* 2001 Oct;65(2):408-12.
228. Zlateva KT, Lemey P, Moes E, Vandamme AM, Van Ranst M. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol.* 2005 Jul;79(14):9157-67.
229. Karron RA, Wright PF, Belshe RB, Thumar B, Casey R, Newman F, et al. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis.* 2005 Apr 1;191(7):1093-104.