

CESAR AUGUSTO DO NASCIMENTO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA PROTEÍNA G DO HRSV
DE AMOSTRAS COM GENÓTIPO BA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2011

CESAR AUGUSTO DO NASCIMENTO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA PROTEÍNA G DO HRSV
DE AMOSTRAS COM GENÓTIPO BA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Nascimento, Cesar Augusto.

Variabilidade genética da proteína G do HRSV de amostras com genótipo BA / Cesar Augusto Nascimento. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Viviane Fongaro Botosso.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Virologia Clínica e Molecular.

Versão do título para o inglês: Genetic Variability of the G protein of HRSV samples with BA genotype.

Descritores: 1. Vírus respiratório 2. Variabilidade genética 3. Vírus respiratório Sincicial Humano 4. Genótipo BA 5. Proteína G I. Botosso, Viviane Fongaro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB014/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas

Candidato(a): César Augusto do Nascimento

Tese: Variabilidade genética da proteína G do HRSV de amostras com genótipo BA

Orientador(a): Viviane Fongaro Botosso

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

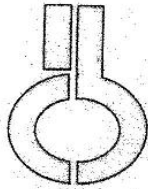
Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 01 de março de 2010.

PARECER 930 / CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 26.02.2010 **APROVOU** o projeto intitulado: "*Diversidade genética do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) com inserção de 60-nt na proteína G*" sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **Viviane Fongaro Botosso** e o aluno **Cesar Augusto do Nascimento**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.02.2011**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULÓ MARINHO ANDRADE ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

A minha querida e maravilhosa mãe, por tudo que fez para que eu chegasse até aqui, devo minha vida a você!...e aos meus queridos e maravilhosos irmãos: Olavo, Flávio, Carolina e Marco, pelo apoio que sempre tive e por estar presente na minha vida todos esses anos.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

A minha orientadora Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso, por ter me orientado de maneira tão sensata e inteligente, permitindo com que este sonho tornasse realidade e por ter sido compreensiva e flexível na minha disponibilidade de horário, por me dar todo apoio que precisei e quando precisei. Vivi, você não foi somente uma orientadora, mas um exemplo de competência, profissionalismo e de professora. Muito obrigado por tudo.

Ao Prof^o Dr. Edison Luiz Durigon pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, além de ser um dos maiores exemplos de ser humano que já vi até hoje.

A Priscila Comone (Pri) e Danila Vedovello amigas de laboratório desde o mestrado, que me fizeram companhia todos esses anos, me ajudando em tudo que precisei. Aprendi com vocês que a pesquisa pode ser feita de maneira séria, mas com um toque de bom humor. Obrigado por tudo!

As “meninas” do laboratório: Mariana, Patrícia e Priscila Perini pela ajuda constante que me deram ao longo dessa caminhada.

Aqueles do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB-USP que me socorreram sempre que precisei e ajudaram a tornar este trabalho possível: “Teca”, “Claudinha”, Hildener, “Raquel” e “Dani Bruna”.

Aos meus amigos no qual estimo muito, Dr. Luciano M. Thomazelli, pelo aprendizado que tive e pelo amigo que sempre foi e a minha grande amiga Dra. Patrícia Bosso (Paty-Joselita), por todos os momentos que passamos juntos e por ter me concedido a alegria de ter sua amizade me ouvindo e compartilhado comigo momentos importantes.

A todos os amigos e amigas do laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelos ensinamentos e pelos momentos

agradáveis que passamos juntos em especial ao César Dinóla (grande César Pai) e Lili, Alexandre (Alê da micologia), Carolzinha e Ithana

A todos os professores desde a graduação que me ensinaram algo para que eu pudesse chegar até aqui, sem os quais não teria chegado.

Aos meus amigos, principalmente ao Carlos Julio, Danilo Marcondes (Dani), Erisvaldo Gonçalves (Waldo), Adriano Leite (Dri) e Ricardo por ter-me aguentado todo esse tempo (heheh), pela amizade verdadeira que vocês me proporcionam, pelos momentos de alegria, tristeza e tantos outros que passamos juntos. Vocês são especiais na minha vida.

A Eliane, Fábria e Marcos (funcionários da secretaria da Biotec), pela ajuda constante e a bibliotecária do ICB-USP Mônica, pela correção deste trabalho.

A minha querida Dra. Maria Luisa Barbosa “Malu”, por ter me dado força quando entrei no laboratório fazendo com que eu acreditasse que esse sonho fosse possível. Valores como este não tem preço.

Aos Professores Dr. Saulo Duarte Passos, Dra. Soraia Attie Calil Jorge, Dra. Charlotte Marianna Harsi e Dra. Cláudia Trigo Pedroso de Moraes Sales pela competência e exemplar condução que tiveram na minha banca de qualificação.

As minhas companheiras de trabalho, Soninha (Profa.), Juceli (Coord.) pelo incentivo e apoio constante e Audellina (Superv.) pela ajuda despendida na hora que precisei.

A todos os funcionários da EMEF CEL PM José Hermínio Rodrigues no qual compartilhei o último ano deste trabalho, principalmente as Assistentes de Direção, Caratina e Nilcéia e a Coordenadora Kátia que me auxiliaram neste primeiro ano cargo de Diretor de Escola.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, seja incentivando, dando conselhos, alegrias, broncas e até não fazendo nada, mas simplesmente estando ao meu lado.

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.

Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;

Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.

RESUMO

NASCIMENTO, C. A. **Variabilidade genética da proteína G do HRSV de amostras com genótipo BA**. 2011. 174 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O vírus respiratório Sincicial Humano (HRSV) é classificado em dois grupos, HRSV-A e HRVSV-B de acordo com as suas características antigênicas. Ambos os grupos são classificados em diferentes genótipos que podem co-circular durante uma mesma epidemia, com um ou dois genótipos dominantes, podendo ser recorrentes em anos consecutivos. No presente estudo o HRSV foi o patógeno mais frequentemente associado a infecções do trato respiratório inferior de crianças menores de 5 anos de idade, sendo responsável por 33,5% do total de crianças atendidas no Hospital Universitário da USP ou na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (1431 de 4274), durante os anos de 2001 a 2009 na cidade de São Paulo. Isolados de HRSV-B com duplicação de 60 nt no gene codificador da proteína G, foram descritos pela primeira vez em Buenos Aires, Argentina em 1999, constituindo um novo genótipo denominado BA. Nos anos seguintes, esse genótipo foi identificado em outras regiões do mundo. Para avaliar a epidemiologia e evolução desse novo genótipo no Brasil, as 1431 amostras foram submetidas a RT-PCR seguido de sequenciamento da região G2 do gene G. A duplicação foi detectada em 104 amostras correspondendo a 72% das amostras de HRSV-B identificadas. Quando analisadas com sequências de diversos países, as sequências brasileiras agruparam-se em 7 clusters, previamente denominados como linhagens BA-II, BA-III, BA-VI e BA-IV, sendo esta última subdividida em sublinhagens: BA-IVa, BA-IVb, Brazil-I (2006-2009) e Brazil II (2005-2006). As amostras identificadas de 2001 a 2004, foram classificadas entre as linhagens BA-II, III e VI. Durante esse período, a circulação foi baixa (apenas 5 amostras). A maioria das amostras do Estado de São Paulo (cidades de São Paulo, Jundiaí, Ribeirão Preto e Itapevi) de 2005 a 2009 agruparam dentro da linhagem BA-IV. Ressalta-se que em 2005 e 2006 a prevalência foi alta, correspondendo a 100% e 95,6% das amostras de HRSV-B identificadas, respectivamente. Entre 2007 e 2008 houve declínio na circulação, seguido de um aumento significativo em 2009 (26% do total de amostras), sendo essas amostras foram agrupadas, em sua maioria, em um cluster separado (Brasil-

II), estabelecendo um *cluster* temporal e geográfico. As principais características da evolução deste genótipo foram: i. as sequências de aminoácidos apresentaram mutações pontuais de inserção e/ou substituição de aminoácidos, ii. A região duplicada apresentou alta variabilidade no decorrer do tempo, iii: algumas alterações de nucleotídeos e/ou aminoácidos ocorridas nos primeiros anos de isolamento fixaram-se no restante das amostras, levando a definição dos clados contendo amostras mais recentes.

Palavras-chave: Vírus respiratório. Variabilidade genética. Vírus respiratório Sincicial Humano. Genótipo BA. Proteína G.

ABSTRACT

NASCIMENTO, C. A. **Genetic Variability of the G protein of HRSV samples with BA genotype**. 2011. 174 p. Ph.D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The human respiratory syncytial virus (HRSV) is classified into two groups, HRSV-A and HRSV-B according to their antigenic characteristics. Both groups are classified into different genotypes that can co-circulate during the same epidemic, with one or two dominant genotypes, and may recur in consecutive years. In this study, HRSV was the pathogen most commonly associated with lower respiratory tract infections in children under 5 years of age, accounting for 33.5% of children treated at the Hospital Universitário da Universidade de São Paulo ou Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (1431 to 4274) during the years 2001 to 2009 in São Paulo. Isolated HRSV-B with duplication of 60 nt in the gene encoding the G protein, were described for the first time in Buenos Aires, Argentina in 1999, representing a new genotype called BA. In subsequent years, this genotype was identified in other regions of the world. To evaluate the epidemiology and evolution of this new genotype in Brazil, the 1431 samples were subjected to RT-PCR followed by sequencing of the G2 region of the gene G. The duplication was detected in 104 samples representing 72% of samples HRSV-B identified. When analyzed with sequences from several countries, the Brazilian sequences were grouped into seven clusters, previously known as strain BA-II, BA-III, BA-IV and BA-VI, the latter being subdivided into sublineages: BA-IVa, BA-IVb, Brazil-I (2006-2009) and Brazil II (2005-2006). Samples identified from 2001 to 2004, were placed between the lines BA-II, III and VI. During this period, circulation was low (only 5 samples). Most samples of São Paulo (São Paulo city, Jundiaí, Ribeirão Preto and Itapevi) from 2005 to 2009 grouped within the lineage BA-IV. It is noteworthy that in 2005 and 2006 the prevalence was high, corresponding to 100% and 95.6% of samples HRSV-B identified, respectively. Between 2007 and 2008 there was a decline in circulation, followed by a significant increase in 2009 (26% of total samples), and these samples were grouped mostly in a separate cluster (Brazil-II), establishing a temporal cluster and geography. The main features of the evolution of this genotype were: i. the amino acid sequences showed mutations of insertion and / or substitution of amino acids, ii. The duplicated

region showed high variability over time, iii: few changes of nucleotides and / or amino acids in the first years of isolation have become fixed in the remaining samples, with the definition of clades containing samples later.

Key words: Respiratory virus. Genetic variability. Human Respiratory Syncytial Virus. BA genotype. G Protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Classificação dos Membros da Família <i>Paramyxoviridae</i>	27
Figura 2: Modelo Representativo do Vírus Respiratório Sincicial Humano.....	28
Figura 3: Fotomicrografia do Vírus Respiratório Sincicial Humano	28
Figura 4: Esquema do Genoma do HRSV	29
Figura 5: Esquema de uma partícula de pneumovírus.....	30
Figura 6: Esquema da estrutura da proteína N.....	31
Figura 7: Estrutura do segmento transmembrana da proteína H.....	34
Figura 8: Modelo de uma camada lipídica com proteína de fusão	35
Figura 9: Representação Esquemática da Glicoproteína F	36
Figura 10: Representação Esquemática da Glicoproteína G.....	38
Figura 11: Modelo tridimensional da estrutura da proteína G.....	39
Figura 12: Mapa Genético do RNA Genômico do HRSV.....	40
Figura 13: Micrografia eletrônica do HRSV em processo de brotamento na membrana celular.....	42

Figura 14: Seqüência parcial de nucleotídeos do gene da proteína G com inserção de 60 nucleotídeos	56
Figura 15: Estrutura secundária da molécula de RNA referente ao segmento duplicado na região C-terminal do gene da proteína G	56
Figura 16: Esquema da estrutura primária da proteína G com inserção de 60 nt ...	57
Figura 17: Distribuição geográfica das seqüências do genótipo BA.....	59
Figura 18: Fluxograma de trabalho.....	64
Figura 19: Esquema do genoma viral e emparelhamento dos <i>primers</i>	71
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da <i>Nested PCR</i>	77
Figura 21: Representação do alinhamento das seqüências de aminoácidos.....	80
Figura 22: Alterações de <i>stop codons</i> e alterações no tamanho da proteína G das amostras brasileiras.....	85
Figura 23a: Topologia da árvore filogenética de 228 sequências brasileiras pertencentes ao genótipo BA	99
Figura 23b: Ampliação de parte da figura 23a mostrando o cluster BR-I 2001-2005 e a posição das amostras.....	100
Figura 23c: Ampliação de parte da figura 23a mostrando o cluster BR-II 2006-2009 e a posição das amostras.....	101

Figura 23d: Ampliação de parte da figura 23a mostrando o cluster BR-III 2006-2009 e a posição das amostras.....	102
Figura 24a: Topologia da árvore filogenética utilizando 239 sequências do genótipo BA do mundo.....	103
Figura 24b: Ampliação de parte da figura 24a mostrando os <i>clusters</i> BA-IVb, BA-IVa,, BA-III, BA-VI, BA-I e BA-II.....	104
Figura 24c: Ampliação de parte da figura 24a mostrando os clusters Índia, Brasil e Ásia.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de vírus de RNA com fita simples negativa	26
Tabela 2 – Relação dos genes e as proteínas por eles codificadas.....	29
Tabela 3 – Relação dos <i>primers</i> utilizados na PCR <i>GeneScan</i>	68
Tabela 4 – Relação dos <i>primers</i> utilizados na PCR e na <i>Nested</i>	70
Tabela 5 – Número de amostras colhidas, positivas para HRSV, seqüenciadas, pertencentes ao grupo A, B e genótipo BA.....	78
Tabela 6 – Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína G do HRSV de amostras brasileiras.....	87
Tabela 7 – Modificação de aminoácidos do gene G do HRSV genótipo BA de amostras brasileiras.....	95
Tabela 8 – Número de amostras de HRSV do genótipo BA distribuídas por ano e local de isolamento.	97

LISTA DE SÍMBOLOS

Aminoácidos

Nome	Símbolo	Abreviação
Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys, Cis	C
Aspartato ou Ácido aspártico	Asp	D
Glutamato ou Ácido glutâmico	Glu	E
Fenilalanina	Phe ou Fen	F
Glicina	Gly, Gli	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys, Lis	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr, The	T
Valina	Val	Va
Triptofano	Trp, Tri	W
Tirosina	Tyr, Tir	Y

Bases nitrogenadas dos nucleotídeos

Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Histórico	21
1.2 Aspectos clínicos	23
1.3 Características do vírus	25
1.3.1 <i>Classificação</i>	25
1.3.2 <i>Estrutura do vírus</i>	27
1.3.3 <i>Organização genômica</i>	40
1.3.4 <i>Replicação viral</i>	41
1.3.5 <i>Caracterização antigênica e molecular</i>	43
1.4 Diagnóstico laboratorial	44
1.5 Prevenção e tratamento	46
1.6 Epidemiologia	51
1.7 HRSV do grupo B com inserção de 60 nucleotídeos	55
2 OBJETIVOS	62
2.1 Objetivos gerais	62
2.2 Objetivos específicos	62
3 MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1 Casuística	63
3.2 Fluxograma de trabalho	63
3.3 Colheita das amostras	64
3.4 Processamento das amostras clínicas	65

3.5 Triagem das amostras de HRSV pertencentes ao genótipo BA	65
3.5.1 Diagnóstico por PCR GeneScan	66
3.5.1.1 <i>Extração do RNA total</i>	66
3.5.1.2 <i>Amostras virais padrão</i>	66
3.5.1.3 <i>Linhagem celular</i>	66
3.5.1.4 <i>Inoculação em cultura de células</i>	67
3.5.1.5 <i>Obtenção do cDNA</i>	67
3.5.1.6 <i>GeneScan RT-PCR</i>	68
3.5.1.6.1 <i>Primers</i>	68
3.5.1.6.2 <i>PCR GeneScan</i>	68
3.5.1.6.3 <i>Deteccção dos produtos amplificados</i>	69
3.5.2 Diagnóstico por imunoflorescência indireta	69
3.6 Amplificação parcial do gene G	70
3.6.1 Primers utilizados para a amplificação do gene G	70
3.6.2 Amplificação parcial do gene G	71
3.7 Análise dos produtos amplificados	72
3.8 Purificação dos produtos amplificados do gene G	72
3.9 Sequenciamento dos produtos amplificados do gene G	73
3.10 Alinhamento das seqüências do gene G	73
3.11 Análises filogenéticas	75
4 RESULTADOS	76

4.1 Triagem das amostras de HRSV.....	76
4.2 RT-PCR e RT <i>Nested</i> PCR.....	76
4.3 Sequências de aminoácidos.....	78
4.4 Análises filogenéticas.....	96
5 DISCUSSÃO.....	106
6 CONCLUSÃO.....	114
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO.....	147
ANEXO B - LISTA DE AMOSTRAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO.....	149
ANEXO C - LISTA DE AMOSTRAS IDÊNTICAS E ÚNICAS - BRASIL.....	159
ANEXO D - LISTA DE AMOSTRAS IDÊNTICAS E ÚNICAS - MUNDO.....	165

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O vírus respiratório sincicial (RSV) foi isolado pela primeira vez em 1955 durante uma epizotia ocorrida na *Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)* em Washington DC, nos Estados Unidos, quando um grupo de chimpanzés apresentou sintomatologia de doença respiratória semelhante a um resfriado comum: coriza, tosse, espirros e secreção nasal mucopurulenta. Morris et al. (1956) isolaram o agente que causava a doença e deram o nome de “*chimpanzee coryza agent*” (CCA). Aventou-se a hipótese que o CCA poderia ser de origem humana, sendo possível que a colônia de chimpanzés tenha se infectado após o contato com o homem (BELSHE et al., 1991).

A ocorrência de anticorpos contra CCA em humanos, principalmente em adolescentes e adultos jovens, foi verificada pelo teste de fixação de complemento, sugerindo infecção prévia com esse novo agente. Em 1956, o vírus respiratório sincicial, foi isolado pela primeira vez, de duas crianças, uma com pneumonia e outra com crupe (difteria laríngea) em Baltimore (CHANOCK et al., 1957a, 1957b).

Estudos sorológicos realizados na época mostraram que a maioria das crianças em Baltimore tinham sido infectadas com RSV antes dos quatro anos de idade. Investigações similares, em várias partes do mundo, indicaram que o RSV estava associado com doenças do trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquiolite (COLLINS et al., 2001).

A denominação ‘vírus respiratório sincicial’, deriva de sua característica de formar sincícios resultantes da fusão de células infectadas, formando uma célula multinucleada no trato respiratório (COLLINS et al., 2001).

Posteriormente, foi verificado que este vírus era o principal agente causador de doenças agudas do trato respiratório inferior durante a infância, sendo responsável por um elevado índice de hospitalizações de crianças até 5 anos de idade com alto custo para os sistemas de saúde (VIEGAS et al., 2005; GLEZEN et al., 1986). Estudos recentes, como o realizado por Canducci et al. (2008), com crianças acometidas por doenças respiratórias graves hospitalizadas no norte da Itália, demonstraram que, ao analisar 322 aspirados de nasofaringe, 150 (46,6%)

foram positivos para pelo menos um dos vírus pesquisados, sendo que 28% das amostras foram positivas para vírus respiratório sincicial humano (HRSV), seguido de 14,3% para metapneumovírus (hMPV), 8,7% para Coronavírus humano (hCoV) e 2,2% para bocavírus humano (HBoV). Esses dados confirmam, ainda hoje, a importância do HRSV nas doenças respiratórias graves em crianças.

Durante o primeiro ano de vida, cerca de 70% das crianças sofrem a infecção pelo HRSV, sendo que por volta dos 3 anos, 100% já terão contraído o vírus (OGRA, 2004; TRISTAM e WELLIVER, 1995; GIRARD et al., 2005) e o pico de incidência ocorre entre 2 e 7 meses de vida (ANDERSON et al., 1990).

Apesar das reinfecções serem comuns durante toda a vida, inclusive numa mesma epidemia (SCOTT et al., 2006), a primeira infecção por HRSV geralmente é mais grave, as re-infecções em crianças mais velhas são brandas e em adultos saudáveis a doença raramente é grave ou fatal (OGRA, 2004; HALL et al., 1991). Ren et al. (2009) relataram que dos 5808 adultos com infecções do trato respiratório analisados entre os anos de 2005 a 2009, 34,6% apresentaram ao menos um patógeno viral, sendo que casos positivos para HRSV não chegaram a 1,0% dos isolados, confirmando que a infecção por esse vírus em adultos não costuma causar infecções sérias do trato respiratório, não havendo diferenças significativas na detecção viral em amostras clínicas entre as infecções respiratórias inferiores e superiores. Entretanto, resfriados causados por HRSV em crianças mais velhas são mais prolongados e graves do que os causados por outros vírus (RUUSKANEN et al., 1993; HALL et al., 2001).

Atualmente o HRSV também é descrito como importante patógeno em idosos e pacientes imunocomprometidos, com elevado índice de mortalidade em pacientes transplantados (ISON et al., 2002; COLLINS et al., 2001).

No Brasil, o primeiro artigo relatando o isolamento do HRSV foi publicado por Candeias et al. (1967). Estudos demonstraram que as doenças respiratórias agudas (DRAs) perfazem 25-50% das consultas dos postos de saúde e cerca de 2/3 dos atendimentos de emergência em hospitais (SUTMOLLER et al., 1995). Dados mais recentes da cidade de São Paulo mostram que o HRSV foi o patógeno viral mais freqüentemente identificado em crianças (41,8%) com DRA (VIEIRA et al., 2001). Outros estudos realizados em várias regiões do país relataram que o HRSV foi responsável por 17% a 68% das infecções virais em crianças internadas (MOURA et al., 2003; CALEGARI et al., 2005; MOURA et al., 2006; D'ELIA, 2005; SERAFINO et

al., 2004; THOMAZELLI et al., 2004; PECCHINI et al., 2008), demonstrando a importância desse patógeno no país.

1.2 Aspectos clínicos

A transmissão do HRSV pode ocorrer por contato com secreções, via aerossol e, mais freqüentemente, por mãos e objetos contaminados, sendo muito infeccioso quando em contato diretamente nas mucosas do olho ou nariz. O HRSV pode permanecer viável por até 6 horas em diferentes superfícies (TRISTAM e WELLIVER, 1995).

O HRSV é um importante agente de infecções nosocomiais, podendo atingir até 47% dos neonatos em berçários e em enfermarias, sendo responsável por até 90% das hospitalizações de crianças de até 2 anos de idade (COLLINS e GRAHAM, 2008). Os funcionários de hospitais podem contribuir na disseminação do vírus, pela presença de secreções contaminadas nas mãos, roupas ou outros objetos (HALL et al., 1975). A propagação do vírus é favorecida em ambientes fechados, como creches ou escolas. Crianças lactentes infectadas pelo HRSV constituem o maior reservatório do vírus, pois excretam grande quantidade de partículas virais, facilitando a contaminação de indivíduos próximos (HALL et al., 2001).

O HRSV replica-se nas células do trato respiratório, causando um processo inflamatório que inclui destruição do epitélio, edema e aumento de produção de muco na região. O período médio de incubação do vírus é de 3 a 5 dias, quando ocorrem às primeiras manifestações clínicas típicas de um resfriado comum, com secreção nasal clara, tosse moderada, febre baixa e algumas vezes “chiado” evoluindo, geralmente, para a recuperação no período de aproximadamente uma semana. Alguns casos, entretanto, que incluem pacientes de risco, como crianças prematuras, com displasia broncopulmonar, doença cardíaca congênita, imunodeficiência congênita ou adquirida, transplantados e com fibrose cística, as manifestações clínicas podem evoluir para um quadro mais grave, com sintomas de pneumonia e bronquiolite, requerendo hospitalização (RUUSKANEN et al., 1993; HALL et al., 2001; OGRA et al., 2004).

As infecções por HRSV associadas à predisposição alérgica podem comprometer os pulmões e contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a asma (BECNEL et al., 2005). Estudos demonstraram que 75%

dos pacientes que apresentaram bronquiolite pelo HRSV no primeiro ano de vida, exibiam chiado ou problemas nas funções pulmonares nos anos posteriores à infecção e, que esses sintomas clínicos diminuem gradualmente ao longo dos 10 anos seguintes. Stein et al. (1999) examinaram 1000 crianças, desde a infância até o início da adolescência, verificando que pacientes que apresentavam doenças brandas do trato respiratório causadas pelo HRSV nos primeiros 3 anos de vida, apresentaram aumento de “chiado” até os 6 anos de idade e o risco de asma subsequente diminuiu progressivamente até os 13 anos. Por outro lado, em um grupo de crianças que apresentou infecção grave pelo HRSV no primeiro ano de vida, houve um aumento na frequência da obstrução nos brônquios e asma até os 7 anos de idade, quando comparado com crianças não afetadas por bronquiolites graves (SIGURS et al., 2000). O risco de desenvolvimento de asma alérgica e redução das funções pulmonares nestes pacientes podem persistir até os 13 anos (SIGURS et al., 2005).

O HRSV atualmente é reconhecido como um importante patógeno para a população idosa, principalmente para a parcela que vive agrupada em instituições (FALSEY, 1998; HAN et al., 1999; FALSEY e WALSH, 2000). Adultos que apresentam outras complicações, como doença obstrutiva pulmonar crônica, doença cardíaca e imunocomprometidos, estão predispostos a infecções mais graves pelo vírus (FALSEY e WALSH, 2000).

A mortalidade não é comum, sendo que as maiores taxas encontram-se entre as crianças com doenças associadas, tais como displasia broncopulmonar, hipertensão pulmonar, doença cardíaca congênita, imunocomprometidos e transplantados (McDONALD et al., 1982; GROOTHUIS et al., 1988). Os receptores de transplante de órgãos sólidos geralmente apresentam predisposição a infecções mais sérias do que os transplantados de medula óssea (HARRINGTON et al., 1992).

A presença de altas concentrações de anticorpos nas mães durante o pico sazonal pode proteger as crianças concebidas neste período. Entretanto, os bebês concebidos fora desse período poderão ser mais suscetíveis ao HRSV quando nascerem 9 a 10 meses depois, devido aos baixos níveis de anticorpos maternos (ZACHARIAH et al., 2009).

1.3 Características do vírus

O HRSV é um vírus bastante lábil e sensível a detergentes e extremos de temperatura e pH (AUSAR et al., 2005), sendo que a 55 °C é rapidamente destruído. Após um período de 24 horas a 37 °C fora da célula, pode ocorrer redução de até 90% da sua infectividade e se estocado a 4 °C por uma semana, a infectividade diminui para 1%. Os ciclos de congelamento e descongelamento destroem as partículas virais. O congelamento rápido em gelo seco com álcool preserva a infectividade, particularmente se sacarose ou glicerina são adicionadas ao meio de congelamento e se o estoque for feito a baixas temperaturas (-70 °C) (TRISTAM e WELLIVER, 1995).

1.3.1 Classificação

O HRSV é membro da ordem *Mononegavirales*, vírus de RNA (ácido ribonucléico) de fita simples e polaridade negativa (Mono, do grego *Monos* “único, simples”, Nega “de RNA polaridade negativa, Virales, do latim *Virale* “vírus”). Pertence à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovirus* (Tabela 1). Os gêneros da família *Paramyxoviridae* são diferenciados pelo diâmetro, número de genes e glicoproteínas de superfície. A partícula viral do HRSV não apresenta hemaglutinina e nem neuraminidase (van REGENMORTEL et al., 2000).

Tabela 1 - Exemplos de vírus de RNA com fita simples negativa (ssRNA) classificados segundo o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus, versão 2009.

Família	Subfamília	Gênero	Espécie	
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	<i>Sendai Virus</i>	
			<i>Human Parainfluenza Virus 1 e 3</i>	
		<i>Morbillivirus</i>	<i>Measles Virus</i>	
				<i>Rinderpest Virus</i>
				<i>Canine Distemper Virus</i>
	<i>Rubulavirus</i>			<i>Mumps Virus</i>
				<i>Human Parainfluenza Virus 2 e 4</i>
	<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>		<i>Human Respiratory Syncytial Virus</i>
				<i>Bovine Respiratory Syncytial Virus</i>
				<i>Murine pneumonia Virus</i>
<i>Metapneumovirus</i>		<i>Avian metapneumovirus</i>		
			<i>Human metapneumovirus</i>	

Fonte: Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus

Dentro do gênero *Pneumovirus* existem além do HRSV, o RSV bovino (*Bovine Respiratory Syncytial Virus* - BRSV) e o vírus da pneumonia do camundongo (*Murine pneumonia Virus*). Foram descritas também amostras de BRSV em caprinos e ovinos, não consideradas como espécies diferentes, mas, representantes, juntamente com o BRSV, de um subgrupo de amostras de ruminantes (Figura 1) (van REGENMORTEL et al., 2000).

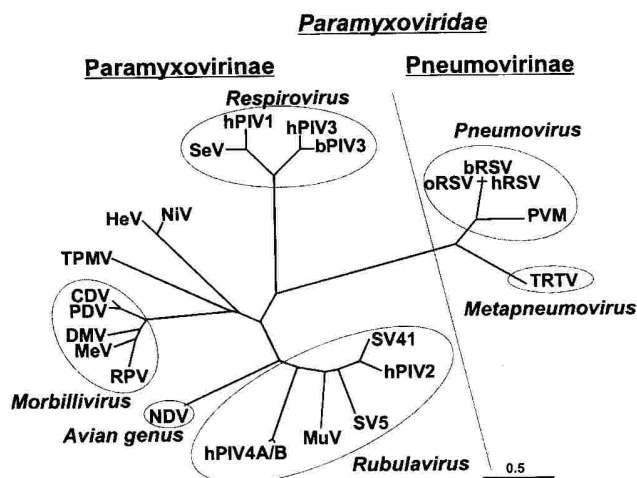


Figura 1: Classificação dos membros da família *Paramyxoviridae*.
Fonte: Collins et al. (2001).

1.3.2 Estrutura do vírus

O vírion é composto de nucleocapsídeo de simetria helicoidal envelopado. O vírus é pleomórfico com diâmetro variando de 150 a 300 nm (Figuras 2 e 3). O envelope viral tem origem na membrana citoplasmática da célula hospedeira, sendo, portanto, de constituição lipoprotéica. Sua superfície possui glicoproteínas de origem viral, que formam projeções de 11-20 nm, separadas por intervalos de 6-10 nm, que estão envolvidas no processo de aderência e penetração do vírus. O genoma viral é composto de RNA de fita simples não segmentado de polaridade negativa (-ssRNA), com peso molecular aproximado de 5×10^3 KDa (HUANG e WERTZ, 1982; COLLINS et al., 2001; WELLIVER et al., 2003), contendo 15.222 nucleotídeos (WERTZ, 2004; COLLINS et al., 2007).

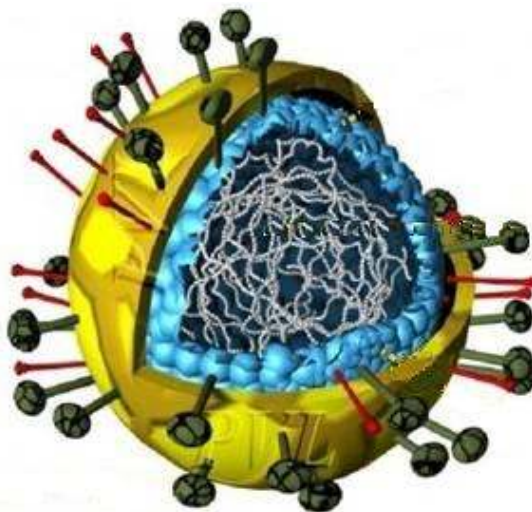


Figura 2: Modelo representativo do Vírus Respiratório Sincicial Humano.
Fonte: Warwick University.

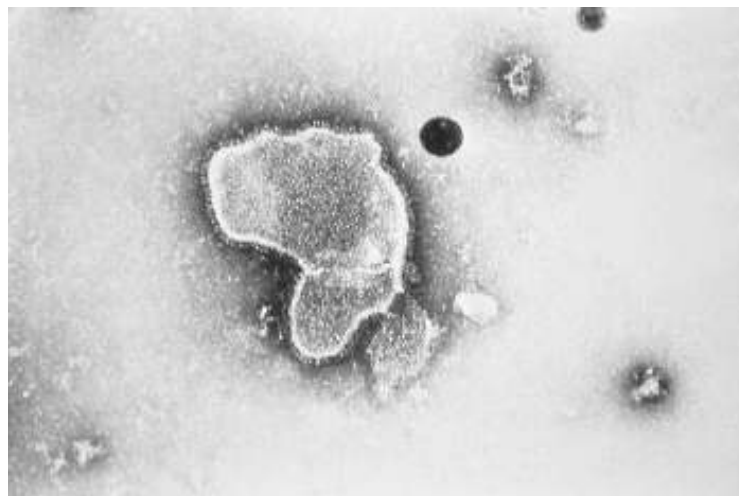


Figura 3: Fotomicrografia do Vírus Respiratório Sincicial Humano.
Fonte: University of South Carolina

Cada partícula infecciosa contém apenas uma cópia funcional do genoma (COLLINS et al., 2001). Nas células infectadas pelo HRSV foram identificados 10 genes codificando 11 proteínas – NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F, M2 (M2-1 e M2-2), L (Figura 4). As proteínas NS1 e NS2 e M2-2 são não estruturais. As demais são estruturais, sendo a M proteína de matriz, N (nucleoproteína), P (fosfoproteína), L (*Large* – polimerase) e M2-1 as proteínas do nucleocapsídeo viral e três são glicoproteínas de superfície – G (adesão), F (fusão) e SH (*small hydrophobic*) (COLLINS et al., 2001; COLLINS e GRAHAM, 2008).



Figura 4: Esquema do Genoma do HRSV.

Fonte: Virology Down Under

A relação completa de todos os genes e proteínas com seus respectivos tamanhos e pesos está descrita na tabela 2 e a disposição das proteínas no vírion está esquematizada na figura 5.

Tabela 2- Relação dos genes (quantidade de nucleotídeos) e as proteínas por eles codificadas: quantidade de aminoácidos, peso molecular da proteína não processada e processada e seus produtos.

<i>Gene</i>	<i>Tamanho do gene (nucleotídeos)</i>	<i>Tamanho da proteína (aminoácidos)</i>	<i>Peso da proteína não processada (KDa)</i>	<i>Peso da proteína processada (KDa)</i>
N	1203	391	43	45
P	914	241	27	33
L	6578	2165	250	250
M2-1	961	194	22	22
SH	410	64	8	8
G*	923	298	33	90
F	1903	574	63	70
NS1	532	139	16	14
NS2	503	124	15	15
M2-2	961	90	11	11
M	958	256	29	25

Legenda por agrupamento de cores:

Vermelho: constituintes do nucleocapsídeo

Azul: glicoproteínas de superfície

Verde: proteína não estruturais

Preto: proteínas de matriz

Tabela modificada de Carromeu, 2007.

* O tamanho da proteína G pode variar de 292 a 319 aminoácidos de acordo com a amostra viral (TRENTO et al., 2006).

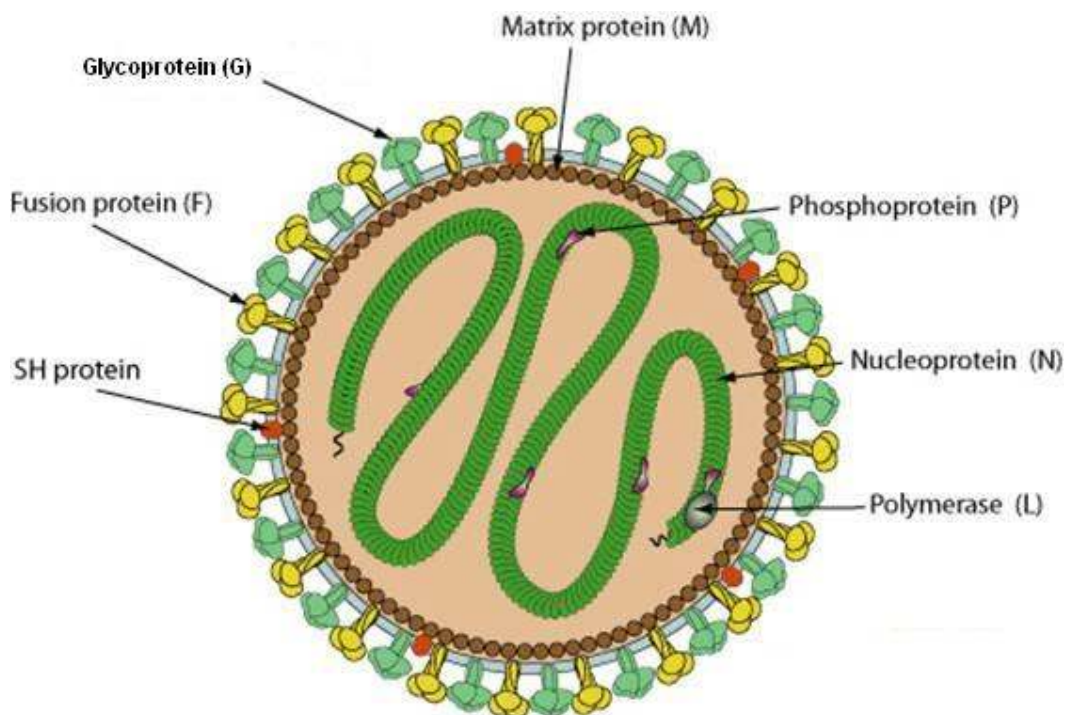


Figura 5: Esquema de uma partícula de pneumovírus.
Fonte: ViralZone

As proteínas NS1 (Peso molecular (PM) 15,5 KDa) e NS2 (PM 14,6 KDa), possuem 139 e 124 aminoácidos, respectivamente. O gene que as codifica possui 532 e 503 nucleotídeos respectivamente. Suas funções não estão totalmente esclarecidas, podendo, pelo fato de serem não estruturais, estar relacionadas à regulação da síntese do RNA, à morfogênese do vírion, interação com as células hospedeiras (COLLINS et al., 2001), indução e sinalização de interferon (INF) e inibição de apoptose (COLLINS e GRAHAM, 2008). Essas proteínas estão presentes em abundância em células infectadas e em pouca quantidade nos vírions (RUUSKANEN et al., 1993; CANE et al., 2001). Estudos “*in vitro*” demonstram que a proteína NS1 tem um forte poder inibidor da transcrição e replicação do RNA. Mas ainda não está estabelecido o quanto essa função de regulação negativa da proteína NS1 está presente na infecção natural pelo HRSV (ATREYA et al., 1998).

As proteínas P, L, N e M2-1 estão associadas ao nucleocapsídeo e ao RNA genômico, formando o complexo ribonucleoproteína, considerado como a unidade mínima para a transcrição e replicação do vírus.

A proteína P é altamente fosforilada, ácida e tem um papel chave na regulação do processo de transcrição e replicação. Possui 241 aminoácidos, peso

molecular de 35 KDa e o gene que a codifica possui 914 nucleotídeos (COLLINS et al., 2001). A fosfoproteína (P) é um co-fator da polimerase que interage com a polimerase (L) e a nucleoproteína (N) em locais específicos. Acredita-se que essa proteína auxilie na ligação da polimerase ao complexo RNA-N auxiliando na translocação do complexo da polimerase durante os processos de transcrição e replicação (TRAN et al., 2007).

A nucleoproteína (N) possui 391 aminoácidos, peso molecular de 43,4 KDa, sendo que o gene que a codifica possui 1203 nucleotídeos. É a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo, estando, estritamente associada ao RNA genômico (COLLINS et al., 2001). O RNA genômico do HRSV forma um complexo com a proteína N (N-RNA) que é utilizado como molde para a replicação e transcrição do RNA pelo complexo da polimerase. O complexo proteína N-RNA pode prevenir a formação de estruturas secundárias na molécula de RNA, protegendo a mesma de degradação por RNAses intracelulares do hospedeiro (característica vista em outros membros dos *Mononegavirales*) e reduzindo a formação de RNAs de dupla fita, o que poderia levar a uma resposta celular antiviral (COWTON et al., 2006; COLLINS et al., 2007). O gene codificador da nucleoproteína N (Figura 6) é relativamente conservado nos isolados (KAPLAN et al., 2008).

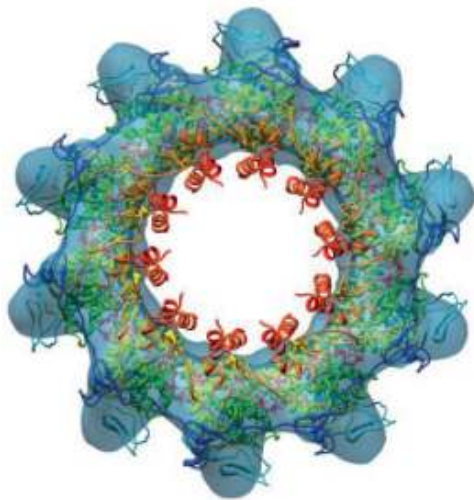


Figura 6- Esquema da estrutura de 24 Å da proteína N do HRSV complexada ao RNA obtida por microscopia eletrônica de nucleocapsídeos purificados, em vista transversal . cada volta da hélice do nucleocapsídeo é formada por 10 moléculas da proteína N, gerando o aspecto de anel.

Fonte: MacLellan et al. (2007).

A proteína L, constituída de 2165 aminoácidos e com peso molecular de 250 KDa é a maior proteína do HRSV, sendo similar em tamanho a de outros membros da família *Paramixoviridae*. O gene que a codifica possui 6578 nucleotídeos (COLLINS et al., 2007). A proteína contém seis segmentos altamente conservados e com possíveis domínios funcionais (COLLINS et al., 2007). Acredita-se que esta proteína seja necessária em todos os processos enzimáticos para produção de RNAs virais funcionais, incluindo a polimerização de nucleotídeos, metilação na porção terminal 5' com formação do *cap* e poliadenilação na porção 3' dos RNAm (HERCYK et al., 1988; GRDZELISHVILI et al., 2005; OGINO et al., 2005, LIUZZI et al., 2005).

As proteínas M (Peso molecular 27 KDa) e M2-1 (peso molecular 22 KDa) possuem 256 e 194 aminoácidos respectivamente, são internas e não glicosiladas, e o gene que as codificam possuem 958 e 961 nucleotídeos respectivamente. As funções da proteína M são mediar à associação do nucleocapsídeo com o envelope nascente (COLLINS et al., 2001), inibir a transcrição celular no início das infecções e subsequente interagir com o nucleocapsídeo para inibir a transcrição viral (GHILDYAL et al. 2002; FENG et al., 1987). A proteína M2-1 interage com a proteína P e N, atua como um fator no processo de transcrição, prevenindo o término prematuro durante esse processo (COLLINS et al., 2001; FEARNIS e COLLINS, 1999; CARTEE et al., 2001; CUESTA et al., 2000). Também favorece a passagem da polimerase viral pela região intergênica permitindo seu acesso à unidade final de transcrição (HARDY et al., 1999; HARDY et al., 1998). A função da M2-1 é essencial para a replicação do HRSV e alterações nesta seqüência diminuem a infectividade do vírus (TANG et al., 2001).

A proteína M2-2 (PM 11 KDa) possui 90 aminoácidos e o gene que a codifica 961 nucleotídeos. É uma proteína reguladora envolvida na regulação da transcrição e replicação do RNA viral durante o ciclo replicativo do vírus (ATREYA et al., 1998; SCHIMIDT et al., 2001). Quando expressa em altos níveis, inibe completamente a replicação do vírus, sugerindo que sua participação na replicação do vírus seja crítica (CHENG et al., 2005).

A proteína SH é uma molécula pequena de 64 aminoácidos para o grupo A ou 65 aminoácidos para o grupo B (CHEN et al., 2000) e o gene que a codifica possui 410 nucleotídeos. Possui uma seqüência hidrofóbica, que vai do aminoácido 14 ao 41, pela qual se insere na membrana citoplasmática da célula hospedeira. Sua

porção carboxila-terminal é externa à membrana citoplasmática. Possui sítios para adição potencial de carboidratos tanto na região amino como na carboxi-terminal. Nas células infectadas pode estar presente de quatro formas diferentes dependendo do grau de glicosilação, conhecidas como SH_o, SH_g, SH_p e SH_t, sendo que a SH_o é a mais abundante e representa a forma não glicosilada de 7,5 KDa. A SH_g, com peso molecular variando de 13 a 15 KDa, corresponde ao SH_o contendo uma cadeia lateral de oligossacarídeos unidos e ligados por ligação glicosídica do tipo N. É o precursor das formas SH_p e SH_t. A forma SH_p, com peso molecular variando de 21 a 40 KDa, é uma versão da proteína modificada por adição de polilactosaminoglicano. A SH_t, com peso molecular de 4,8 KDa, é uma forma truncada da proteína SH_o gerada pela tradução no segundo códon AUG. A função da proteína SH durante a replicação ainda não foi esclarecida, mas supõe-se estar envolvida na adsorção, penetração e desnudamento do vírus (COLLINS et al., 2001; TECHAARPORNKUL et al., 2001; FELDMAN et al., 2001; RIXON et al., 2004). Os vírus recombinantes com deleção do gene SH, apresentam replicação normal em cultura de células, inclusive com formação de sincícios (KARRON et al., 1997; BUKREYEV et al., 1997). É possível que a função da SH seja modificar alguma propriedade do Complexo de Golgi da célula hospedeira para facilitar o transporte das proteínas virais pela via de secreção, uma vez que há acúmulo dessas proteínas na membrana desta organela (RIXON et al., 2004). Como sua estrutura é em forma de um canal iônico. Kochva et al. (2003) sugerem que ela seja uma viroporina (Figura 7), que altera a permeabilidade da membrana e permite a passagem de compostos de baixo peso molecular.

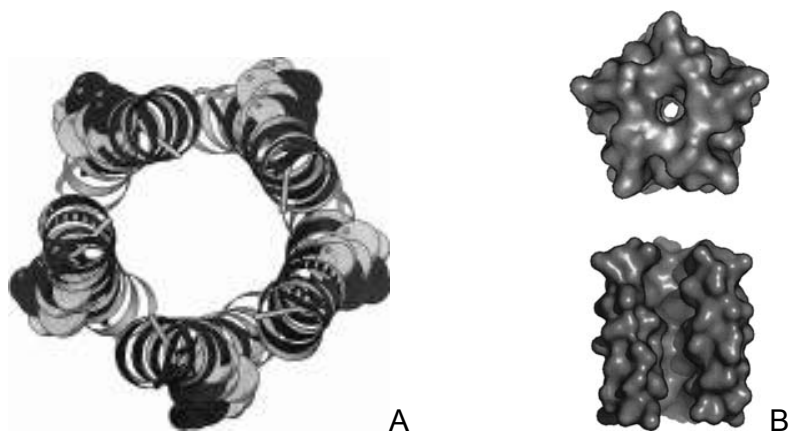


Figura 7: A - Estrutura homopentamérica do segmento transmembrana da proteína SH do HRSV obtido a partir da procura global através de simulações de dinâmica molecular de múltiplas variantes de SH. Figura gerada pelo MOLSCRIPT (Kraulis, 1991). B - (superior) modelo da estrutura da proteína de superfície SH do HRSV, olhando ao longo do suposto poro do terminal carboxila. (Inferior) Modelo de estrutura da proteína de superfície SH do HRSV, rotação de 90°. Uma das hélices foi removida para mostrar o suposto canal interior. Figura gerada pelo PYMOL (Delano).

Fonte: Kchova et al. (2003).

Fuentes et al. (2007) demonstraram que a proteína SH do HRSV possui função similar à de outras proteínas SH existentes em membros da família *Paramyxoviridae*. Esta proteína é responsável por inibir a sinalização do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que está associado entre outras funções, com a sinalização para apoptose de células infectadas por vírus, tendo, portanto, um importante papel na inibição da apoptose celular, o que pode favorecer a propagação do vírus

A glicoproteína F é uma proteína do tipo I, ou seja, está ancorada na membrana próxima à região carboxila-terminal (intracitoplasmática) e contém uma sequência sinal de clivagem próxima à região amino terminal (localizada na parte externa da membrana citoplasmática). Possui 574 aminoácidos, peso molecular de 70 KDa e o gene que a codifica possui 1903 nucleotídeos. Identificada como proteína de fusão, é a responsável pela ligação do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira, liberando o nucleocapsídeo diretamente dentro do citoplasma. Proporciona também a fusão da célula infectada com uma adjacente, favorecendo a formação de sincícios (Figura 8) (COLLINS et al., 2001; COLLINS e GRAHAM, 2008). A F é a única glicoproteína necessária para infecção em cultura de células (KARRON et al., 1997; TECHAARPORNKUL et al., 2001).

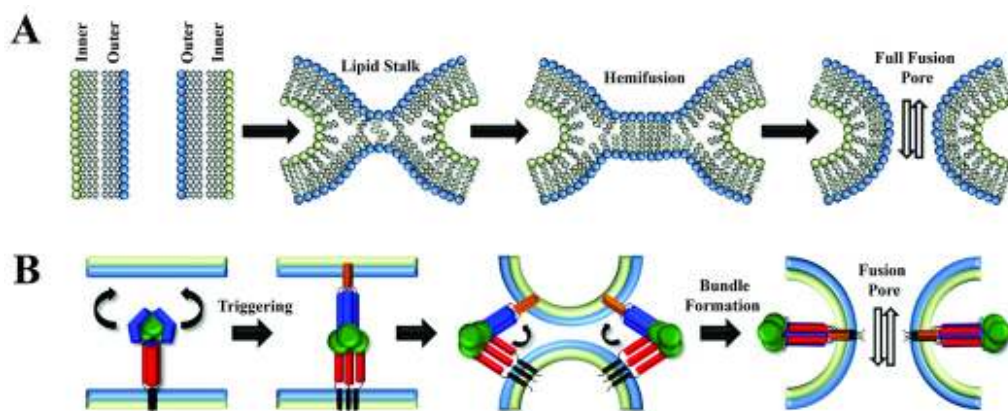


Figura 8: Modelo de uma camada lipídica com proteína de fusão. (A) Camada lipídica formando um poro de fusão. (B) Proteína F intermediando a formação da poro de fusão.

Fonte: Smith et al. (2009).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo denominado F0 que consiste em dois domínios denominados F2 (aminoácidos 1-130) e F1 (aminoácidos 137-154) e de um peptídeo clivável (aminoácidos 131-136) (BOLT et al., 2000; SUGRUE et al., 2001; RIXON et al., 2002). Após a síntese e a glicosilação, a proteína F0 é clivada proteoliticamente por uma protease celular em duas subunidades, F2 (peso molecular 20 KDa) e F1 (peso molecular 68 KDa), que permanecem ligadas por pontes dissulfeto (MATTHEWS et al., 2000). Para *Pneumovirus* e *Paramyxovirus*, em geral, os primeiros 19 a 26 aminoácidos da porção amino terminal da subunidade F1 são hidrofóbicos e estão diretamente envolvidos com a inserção na membrana (COLLINS et al., 2001; TRISTAM e WELLIVER, 1996). A subunidade F1 é relativamente bem conservada, sendo sua função comprometida mediante deleções ou substituições de aminoácidos (COLLINS et al., 2007). A representação esquemática do precursor F0 pode ser visualizada na figura 9.

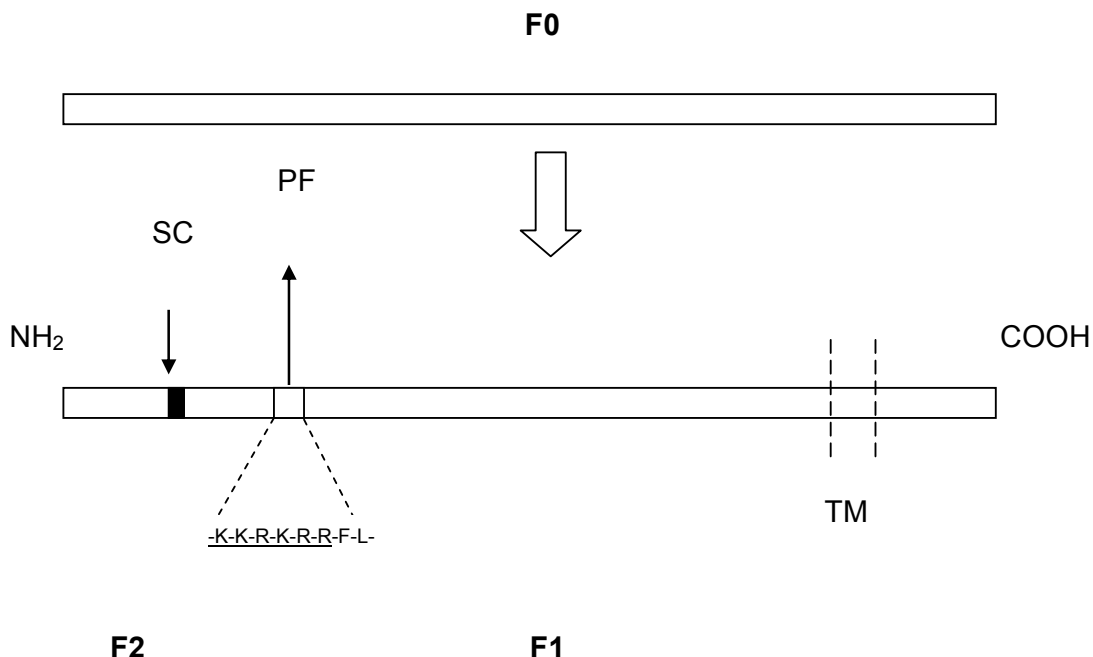


Figura 9: Representação esquemática da glicoproteína F. Os dois domínios F1 e F2 são formados após a clivagem proteolítica do precursor F0. A região transmembrana (TM), o sinal de clivagem (SC), localizado entre os aminoácidos 131-136 de F0 e o sítio de fusão (PF) hidrofóbico e rico em glicina, estão assinalados.
 Fonte: Collins et al. (2001).

A glicoproteína G é uma proteína do tipo II, ou seja, está ancorada à membrana próxima à sua porção amino-terminal por um domínio hidrofóbico, não clivável, tipo sinal âncora, que se estende do resíduo 38 ao 66 (LICHENSTEIN et al., 1996; COLLINS e GRAHAM, 2008). Possui de 289 a 319 aminoácidos, dependendo da amostra viral e o gene que a codifica possui, em geral 918 nucleotídeos (grupo A) e varia de 920 a 980 nucleotídeos para o grupo B (JOHNSON et al., 1987; MARTINEZ et al., 1999; TRENTO et al. 2003; ZLATEVA et al. 2004). A glicoproteína G é sintetizada como uma proteína de peso molecular de 33 KDa, sendo posteriormente glicosilada para a obtenção da sua forma madura de peso molecular de 90 KDa.

A proteína G possui um domínio extracelular no qual se encontram duas regiões variáveis, N-terminal e C-terminal, que contém alto teor de serina e treonina, entre os aminoácidos 69-164 e 207-298, com aproximadamente 56% de divergência entre as amostras A e B (JOHNSON et al., 1987). Intercalando essa região de alta variabilidade, existe uma região mais conservada com um pequeno segmento de 13 aminoácidos (164-176) e quatro resíduos de cisteína (C173, C176, C182, C186),

conservados em todas as amostras de HRSV (SULLENDER, 2000), sugerindo ser este segmento o responsável pela ligação do vírus a um receptor celular. A representação esquemática da glicoproteína G pode ser visualizada na figura 10.

O ectodomínio carboxila-terminal da proteína G caracteriza-se por conter um alto teor de serina e treonina (cerca de 30%) que são potenciais sítios de ligação de glicídios por ligações glicosiladas do tipo “O”, ou seja, a ligação de glicídios a átomos de oxigênio das cadeias destes aminoácidos. A glicosilação da proteína também se faz por ligação glicosídica tipo “N”, ou seja, a ligação de glicídios ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral da asparagina. O ectodomínio externo contém, portanto, de 3 a 8 sítios para ligação glicosídica tipo “N” e mais de 70 sítios potenciais para adição de oligossacarídeos por ligação glicosídica tipo “O”, embora se estime que a proteína madura possua de 24 a 25 cadeias de glicídios O-ligados (WERTZ et al., 1985; JOHNSON et al., 1987). Possui também um alto teor de resíduos de prolina (cerca de 10%) o que contribui para a redução das estruturas secundárias da proteína (COLLINS et al., 2001). Sabe-se que a glicoproteína G é uma proteína análoga a hemaglutinina de outros vírus da família *Paramyxoviridae*, porém não possui ação hemaglutinante (TRISTAM e WELLIVER, 1996). Devido a sua constituição, foi sugerido que a glicoproteína G do HRSV seria homóloga às mucinas secretadas pelas células epiteliais (JOHNSON et al., 1987).

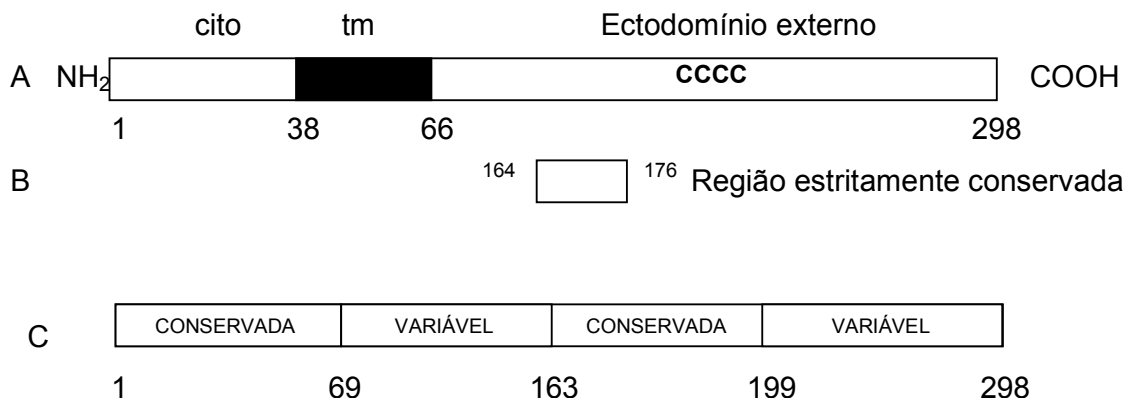


Figura 10: Representação esquemática da glicoproteína G. (A) Estrutura primária de aminoácidos da linhagem A2, sendo: Tm = domínio transmembranoso; cito = domínio interno à membrana citoplasmática; CCCC = quatro resíduos de cisteína (C¹⁷³, C¹⁷⁶, C¹⁸² e C¹⁸⁶) conservados em todas as amostras. (B) Região de 13 aminoácidos que se liga ao receptor estritamente conservada nas amostras de HRSV; (C) Representação das duas regiões variáveis da proteína G intra e intergrupos do HRSV, ricas em serina e treonina, compreendendo os aminoácidos 69-163 e 199-298 e região conservada compreendendo os aminoácidos 163-199. As regiões transmembranosa e citoplasmática compreendendo os aminoácidos 1-69, são conservadas.

Fonte: Sullender (2000).

A maturação dos carboidratos das ligações do tipo N e O presentes na proteína G ocorre no complexo de Golgi, resultando na proteína madura (FERNIE et al., 1990; LAMBERT et al., 1988; LEVINE et al., 1987; WERTZ et al., 1985). A estrutura da glicoproteína G do HRSV é diferente das proteínas anti-receptoras obrigatórias de outros membros da família *Paramyxoviridae*.

A primeira região hipervariável do ectodomínio externo da proteína G (G1), anterior ao agrupamento de cisteína, pode adotar uma estrutura de bastonete devido à adição de várias ligações de cadeias de açúcar do tipo O (JENTOFT, 1990). Essa glicosilação da região C-terminal influencia na expressão de epítomos nessa região (GARCÍA-BEATO et al., 1996). A segunda região hipervariável da proteína G (G2), pode ser localizada externamente no homotrímero, sendo mais acessível aos anticorpos e menos restrita a mudanças genéticas, como verificado em mutantes de escape que foram selecionados com *stop codons* prematuros ou mutações na fase de leitura (*frame-shift*) (MELERO et al., 1997). A figura 11 mostra um modelo da estrutura tridimensional da glicoproteína G.

Há poucas informações disponíveis sobre a variabilidade da região N-terminal do gene da proteína G, principalmente do subgrupo B, mas se sabe que

esta região contém epítomos específicos importantes. Ao analisar as amostras de HRSV isoladas na Tunísia e em outras áreas geográficas (Kenia, Bélgica, Reino Unido, Qatar, Canadá e Coréia do Sul) durante diferentes epidemias demonstrou-se estreita similaridade entre os isolados (FODHA et al., 2008).

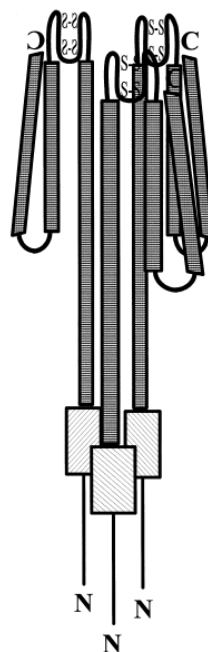


Figura 11: Modelo tridimensional da estrutura homotrímica da proteína G, do HRSV. Pontes dissulfeto (S-S) e as regiões N e C-terminal são mostradas. Os retângulos abertos indicam o domínio transmembrana e os sombreados as regiões variáveis.

Fonte: Langedijk et al. (1996) e modificada por Melero et al. (1997).

A glicoproteína G pode suportar inserções e deleções ou múltiplas substituições de aminoácidos sem a perda de sua função (BEELEER e COELING, 1989; TRENTO et al., 2003; SATO et al. 2004; SCOTT et al., 2004; ZLATEVA et al., 2004; NAGAI et al., 2004).

Levine et al. (1987) verificaram que anticorpos contra a proteína G, inibiam a ligação dos vírus às células, demonstrando sua participação no processo de adsorção do vírus à célula hospedeira. Observou-se que mesmo sofrendo mutações espontâneas (KARRON et al., 1997) ou engenheiradas, com deleções no gene G, o HRSV pode ser isolado em cultura de células (TECHAARPORNKUL et al., 2001), podendo se replicar eficientemente em certos tipos de células (ex.: Vero – rim de macaco verde africano) e ineficientemente em outros (ex.: HEp-2 - carcinoma de laringe). Por outro lado, embora a proteína G não seja necessária para infecção em

certos tipos de células *in vitro*, ela é determinante para a eficiência da infectividade do vírus *in vivo* e esta deve ser a razão de sua presença em todos os isolados virais já analisados (LOW et al., 2008).

As glicoproteínas F e G são as mais importantes proteínas envolvidas na resposta imune (CANE, 2001), sendo que anticorpos, tanto policlonais como monoclonais (MAbs) específicos contra elas, são capazes de neutralizar o vírus *in vitro* (ANDERSON et al., 1988; HENDRY et al., 1988). Estudos realizados em camundongos, pela transferência passiva de monoclonal anti-F, mostraram haver redução da replicação de vírus nos pulmões (TAYLOR et al., 1984).

1.3.3 Organização genômica

Conforme já mencionado, o genoma do HRSV é composto de 15.222 nucleotídeos (COLLINS et al., 2001). A figura 12 mostra o esquema do mapa genético do RNA genômico do HRSV, feito com base na cepa A2.

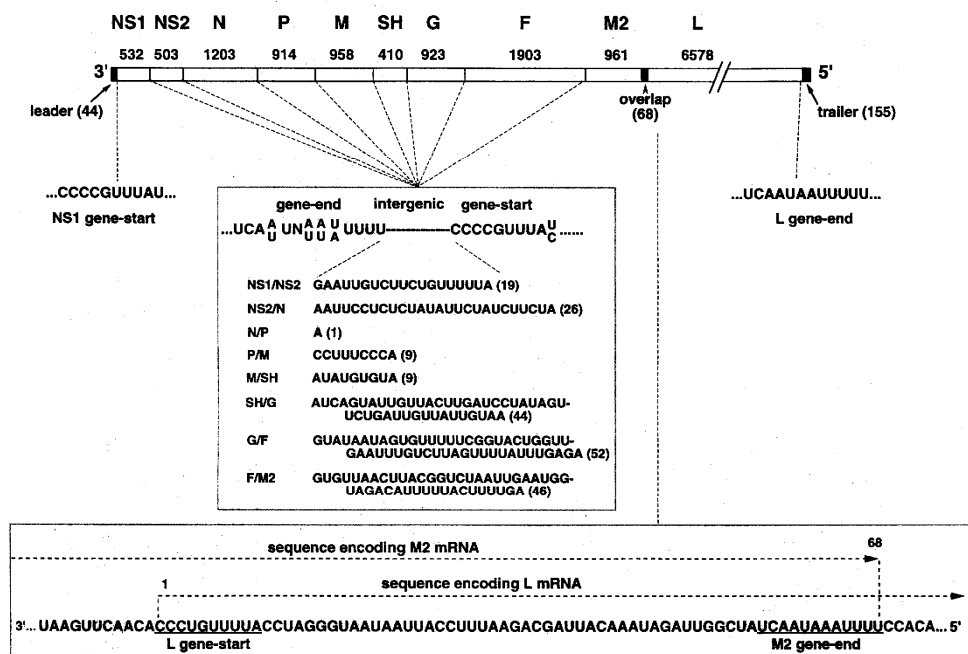


Figura 12: Mapa genético do RNA genômico do HRSV (Linhagem A2). Os genes são identificados de acordo com a proteína que codificam (listadas ao longo da parte superior do mapa). Os números abaixo dos nomes de cada proteína correspondem ao tamanho, em nucleotídeos das seqüências apontadas. As duas caixas de texto mostram, em detalhes, as regiões de junções entre os genes (regiões intergênicas) e a região de sobreposição entre os genes M2 e L (*overlap*).

Fonte: Extraído de Collins et al. (2001).

A porção 3' do RNA genômico consiste de uma região *leader* extragênica de 44 nucleotídeos. A região *leader* é seguida por dez genes virais na seguinte ordem: 3' –NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'. O gene L é seguido de uma região *trailer* extragênica de 155 nucleotídeos. Cada gene começa com um sinal conservado de início do gene (*gene-start signal*) composto por nove nucleotídeos cuja seqüência é 3' –CCCCGUUUA (exceto para o gene L que apresenta as seguintes diferenças sublinhadas: 3' –CCCUGUUUUA). Cada gene termina com um sinal semiconservado de término do gene (*gene-end signal*) composto por doze a treze nucleotídeos cuja seqüência é 3' - UCA $\begin{matrix} \text{A} \\ \text{JUN} \end{matrix}$ $\begin{matrix} \text{AAA} \\ \text{UUU} \end{matrix}$ JUU- que direciona a terminação transcripcional e a poliadenilação (COLLINS et al., 2001).

Os primeiros nove genes não apresentam sobreposições e são separados por regiões intergênicas que, para a linhagem A2, variam de 1 a 52 nucleotídeos. Os dois últimos genes, M2 e L, apresentam uma sobreposição de 68 nucleotídeos. Sendo assim, o sinal de início do gene L está localizado dentro do gene M2 bem como o sinal de término e poliadenilação do gene M2 está localizado dentro do gene L (COLLINS et al., 2001).

1.3.4 Replicação viral

A adsorção do vírus a receptores presentes na superfície da célula hospedeira é mediada pela glicoproteína G. Um glicosaminoglicano (GAG) semelhante à heparina, composto de uma seqüência alternada de ácido hexurônico e glucosamina, ou outro ainda não identificado, seriam os receptores celulares (KRUSAT e STRECKERT, 1997; HALLAK et al., 2000; KWILAS et al., 2009). Ainda é objeto de investigação se a interação é apenas um passo inicial para a posterior ligação do vírus a um receptor de alta afinidade (MARTINEZ e MELERO, 2000; HALLAK et al., 2000b).

O processo de transcrição do genoma viral inicia após a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Os genes são transcritos na direção 3' - 5' a partir de um único promotor localizado na posição 3'. De acordo com o mecanismo proposto para o HRSV, a enzima RNA polimerase RNA dependente contacta a região *leader* do genoma iniciando a transcrição do primeiro nucleotídeo. Na junção entre a região *leader* e o primeiro gene, o pequeno transcrito é liberado e a polimerase recomeça a transcrição por um mecanismo sequencial de início-fim, guiada pelos sinais de início

do gene (*start-signal-gene*) e fim do gene (*end-signal-gene*). O resultado é a síntese de uma série de mRNAs subgenômicos. Os RNAs parecem ser cópias exatas dos genes, não havendo evidências de modificações como um *splicing*, por exemplo. Os RNAs transcritos recebem um *cap* na extremidade 5' e são poliadenilados na extremidade 3' (COLLINS et al., 2001; COLLINS e GRAHAM et al., 2008)

Além da transcrição e tradução das proteínas, outro passo importante é a replicação que produz moldes adicionais do genoma para transcrição e replicação e fornece genomas em grande quantidade para serem incorporados nas novas partículas virais. A produção da fita complementar de RNA positivo (+ssRNA), que servirá de molde para gerar cópias do genoma viral (-ssRNA), requer que a maquinaria de produção de RNA entre num modo de “anti-terminação”, ignorando todos os sinais de início e fim presente entre os genes e entre a sequência *leader* e o gene NS1 (KINGSBURY, 1990).

A maturação do vírus ocorre, num primeiro passo, com a montagem do nucleocapsídeo pela combinação da proteína N com o RNA genômico seguido da adição das proteínas P e L. A montagem do envelope se dá com as glicoproteínas virais, modificadas por glicosilação durante seu transporte através do retículo endoplasmático e Complexo de Golgi, ocupando o lugar das proteínas celulares na membrana plasmática. Em seguida, as proteínas da matriz se agregam na porção interna do envelope nascente. Finalmente, o nucleocapsídeo alcança a superfície e ocorre o brotamento do mesmo, levando consigo uma porção da membrana plasmática, num processo inverso ao da penetração por fusão (KINGSBURY, 1990) (Figura 13).



Figura 13: Micrografia eletrônica do HRSV em processo de brotamento na membrana celular. O quadro menor na parte superior mostra partículas virais já liberadas pela célula.

Fonte: The C. Everett Koop Institute ([2010])

Os RNAm e as proteínas virais podem ser detectados após 4 a 6 horas no citoplasma celular depois da infecção e o pico de síntese das proteínas virais em torno de 18 a 20 horas. A liberação da progênese viral começa entre 10 e 12 horas depois, chegando ao seu máximo após 24 horas, e continua até a completa destruição celular que varia de 30 a 48 horas após infecção (ARSLNÁGIC et al., 1996; COLLINS et al., 2007).

1.3.5 Caracterização antigênica e molecular

Estudos iniciais sugeriram que havia somente um sorotipo de HRSV, porém, Coates e Chanock (1962) observaram diferenças antigênicas entre duas amostras. Entretanto, foi somente com a utilização de anticorpos monoclonais (MAbs) que essas diferenças se mostraram mais definidas, principalmente após os trabalhos de Anderson et al. (1985) e Mufson et al. (1985) que estabeleceram definitivamente a divisão das amostras em dois grupos distintos, denominados A e B.

Diversos trabalhos relatam que a maior divergência entre os grupos A e B está na glicoproteína G, no qual apresenta divergência de aproximadamente 47% na sequência de aminoácidos entre os grupos e uma divergência de aproximadamente 20% dentro do mesmo grupo antigênico (COLLINS e GRAHAM, 2008; SULLENDER et al., 1991; JOHNSON et al., 1987). A diversidade da proteína G não é homogênea, sendo maior no ectodomínio externo que possui apenas 44% dos aminoácidos idênticos entre os dois grupos comparado com 83% das regiões transmembranas e domínio citoplasmático (JOHNSON et al., 1987; REICHE et al., 2009). Estudos demonstraram haver variações antigênicas dentro de cada um dos grupos, possibilitando a divisão em subtipos característicos. Anderson et al. (1988), baseados na reatividade ou não das amostras com diferentes MAbs, estabeleceram um total de 10 subtipos que foram designados arbitrariamente de A1 a A7 e de B1 a B3. Hall et al. (1990) descreveram o subtipo B4 dentro do grupo B. Mais tarde, os principais estudos sobre variabilidade genética da glicoproteína G classificaram o grupo A nos genótipos GA1 a GA7 (PERET et al., 1998 e 2000), SAA1 (VENTER et al., 2001) e NA1 e NA2 (SHOBUGAWA et al., 2009) e o grupo B nos genótipos GB1 a GB13 e SAB1 a SAB3 (PERET et al., 1998, 2000; VENTER et al., 2001; ZLATEVA et al., 2005). Recentemente, em 1999, um novo genótipo dentro do grupo B denominado BA foi descrito pela primeira vez em Buenos Aires, na Argentina,

caracterizado pela duplicação de 60 nucleotídeos na posição 732-791 do gene G (TRENTO et al., 2003). Estudos recentes classificam este novo genótipo em BA-I a BA-VI (TRENTO et al., 2010).

1.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico rápido e preciso do HRSV faz-se necessário para evitar o uso desnecessário de antibióticos e a utilização de terapia específica com Ribavirina, além de permitir a execução das medidas necessárias para evitar infecções nosocomiais, nas quais o HRSV ocupa posição de destaque (TURNER, 1996; HITE e HUANG, 1996).

O diagnóstico laboratorial do HRSV pode ser direto, pela detecção de antígenos virais, do ácido nucléico e/ou do vírus infectante ou indireto, pela detecção de anticorpos específicos para o agente (WARIS, 1992). Em rotina, as secreções respiratórias são utilizadas como material biológico para o diagnóstico direto, sendo os melhores espécimes, os aspirados ou lavados de secreções de nasofaringe (MACKIE et al., 1991; MASTERS et al., 1987).

A cultura de células foi o método padrão ouro para o diagnóstico do HRSV até aproximadamente meados dos anos de 1990, quando a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa) tornou-se viável comercialmente em muitos países do mundo (HENRICKSON et al., 2004; NOLTE et al., 2007).

A imunofluorescência (IF) é uma técnica muito utilizada para detectar o HRSV em células epiteliais da nasofaringe ou para confirmar o isolamento do vírus após a cultura de células. Esta técnica apresenta cerca de 80-90% de sensibilidade e especificidade quando comparada a técnica de isolamento (KELLOG et al., 1991). Entretanto, esse método requer alguns cuidados essenciais para o seu sucesso, tais como a presença de um número adequado de células e de um microscopista treinado. O ensaio imunoenzimático é um método rápido que permite análise de um número grande de amostras, e é aplicado tanto para a detecção de antígenos virais no material clínico como para identificação do vírus isolado em cultura de células. Os mesmos cuidados adotados na preparação do material para a imunofluorescência devem ser adotados. Estes testes, geralmente utilizam a combinação de anticorpos monoclonais (MAbs) para a captura do antígeno em fase sólida, seguida por anticorpos anti-antígenos marcados com peroxidase (CHAO et al., 1979;

SARKKINEN et al., 1981). As vantagens destes ensaios sobre a imunofluorescência são objetividade de leitura e a possibilidade de automação.

O *Test Pack* é um ensaio imunoenzimático em membrana de nitrocelulose utilizado para a detecção de antígenos do HRSV. Disponível em forma de *Kit* comercial (Abbott, North Chicago, Illinois, EUA), o *Test Pack* é um método de diagnóstico rápido de HRSV, sendo utilizado na triagem de pacientes, porém é menos sensível do que a imunofluorescência (MILLER et al., 1993).

Outras metodologias de diagnóstico rápido, como *QuickLab RSV Test* (SLINGER et al., 2004), *Binax NOW* (SELVARANGAN et al., 2008), *BD Directigen* (SELVARANGAN et al., 2008; GRÖNDAHL et al., 2005), *BD Directigen EZ* (OHM-SMITH et al., 2004), *VIDAS* (RIBES et al., 2002), *Thermo Electron™ RSV OIA* (ALDOUS et al., 2005) foram desenvolvidas e analisadas, porém nenhum apresentou resultado satisfatório quanto à sensibilidade e especificidade, quando comparados à IFI e isolamento em cultura (OHM-SMITH et al., 2004).

O diagnóstico laboratorial também pode ser realizado pela detecção do ácido nucléico viral diretamente do material clínico pela técnica de RT-PCR, que permite, também, a caracterização molecular das cepas (GILBERT et al., 1996; VALDIVIA et al., 1997; PITKÄRANTA et al., 1998 a, b; GOTTSCHALK et al., 1996; ZHENG et al., 1996, METEYARD e YOUNG, 1994; PERET et al., 1998, 2000). A RT-PCR é considerada uma técnica de alta sensibilidade (REIS et al., 2008), especialmente útil no diagnóstico de infecções, em que tanto a quantidade quanto o período de excreção do vírus são pequenos, como é o caso de pessoas idosas ou recém nascidos (WALSH et al., 2001; FREYMUTH et al., 1997; FAN et al., 1998; KEHL et al., 2001; MULLINS et al., 2004; WILLIAMS et al., 2004; ROVIDA et al., 2005).

A RT-PCR rapidamente mostrou ser significativamente mais sensível e mais específica para detecção do HRSV, influenza (Flu) e a maioria dos outros vírus respiratórios (BECK et al., 2010). Nos últimos anos, os laboratórios tem aperfeiçoado as técnicas automatizadas de extração de ácidos nucléicos e amplificação por RT-PCR para detecção viral nas amostras clínicas (KUMAR et al., 2008; HUANG et al., 2009).

Vários *multiplex* PCR e RT-PCR foram desenvolvidos demonstrando sensibilidade igual ou, na maioria das vezes, superior à cultura de células convencional e outros métodos de detecção de antígenos (COIRAS et al., 2003; ROVIDA et al., 2005; WEINBERG et al., 2004).

Uma variação da técnica de RT-PCR utilizada atualmente na detecção de viroses respiratórias é o ensaio de RT-PCR detectado por *GeneScan*. Este método analisa fragmentos de DNA com base na detecção automática de fluorescência durante a eletroforese em capilar, bastante utilizada em procedimentos que requerem precisão no tamanho e na quantidade do DNA, incluindo seleção e validação de SNP (*single nucleic polimorfism*), análise de microsatélites, detecção de polimorfismo e outros. Essa técnica baseia-se na utilização de um *primer* marcado com fluorescência e outro não marcado utilizado para amplificar um alvo específico que gerará produtos de tamanho esperado. O produto amplificado é combinado com um peso molecular padrão e submetido a uma eletroforese em sequenciador automático, no qual o produto fluorescente é medido e quantificado (THOMAZELLI et al., 2004).

Real-time PCR é uma técnica de diagnóstico que combina a RT-PCR convencional com uma tecnologia que capta os sinais da fluorescência durante os ciclos da PCR. A *real-time* PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade quando comparada ao isolamento em cultura de células, *shell vial* e RT-PCR convencional (HU et al., 2003).

Nascimento et al. (2006) padronizaram a RT-PCR em tubo único utilizando *kit* comercial (*AccessQuickTMRT-PCR Systems – Promega*) que demonstrou ser uma técnica de diagnóstico rápida, sensível e de menor custo que a RT e PCR separadas, além de diminuir as chances de contaminação durante o processo.

Com uma sensibilidade maior que a da RT-PCR e um tempo de 90 minutos gastos com o diagnóstico, o kit de diagnóstico rápido denominado NucliSENS®EasyQ NASBA é uma excelente alternativa de método diagnóstico rápido para detecção do HRSV (TILLMANN et al., 2008).

1.5 Prevenção e tratamento

A transmissão do HRSV pode ser prevenida pela aquisição de práticas básicas de higiene, incluindo lavagens regulares das mãos, prevenção da propagação por objetos contaminados e o isolamento de pacientes durante o diagnóstico (SIMON et al., 2006; VISSER et al., 2008).

A prevenção de infecções pelo HRSV por meio de uma vacina foi muito estudada, contudo, sem sucesso até o momento. A primeira vacina produzida e

testada em crianças e lactentes era de vírus inativado com formalina. Porém, além de não proteger contra a doença, as crianças vacinadas sofreram doenças mais graves em exposição subsequente ao vírus, com cerca de 80% de hospitalizações e dois óbitos, quando comparadas com o grupo controle não vacinado (DUDAS e KARRON, 1998). O aumento da gravidade da doença foi demonstrado em modelos animais e é resultado de vários fatores: i - inadequada produção de anticorpos neutralizantes no soro; ii - baixa imunidade local; iii - deposição do complexo imune; iiii - indução da resposta exacerbada do tipo Th2, com eosinofilia pulmonar e aumento da produção de citocinas IL-4 e IL5 (DURBIN et al., 2003; POLACK et al., 2002).

O avanço nas técnicas de biologia molecular e da biotecnologia na última década possibilitou o teste de novos métodos para fabricação de vacinas como: atenuação do vírus gerada por passagens em cultura de células a baixas temperaturas juntamente com o uso de agentes mutagênicos (CROWE et al., 1994; RANDOLPH et al., 1994); vacinas contendo subunidades virais (BELSHE et al., 1993; HOMA et al., 1999; OIEN et al., 1994) e vírus recombinantes que contêm os epítomos protetores do HRSV (BRANDT et al., 1997; COLLINS et al., 1990; CROWE et al., 1994). Como exemplo cita-se as vacinas de subunidades utilizando proteína F purificada (PFP) ou proteína F em conjunto com G e M (Sanofir-Pasteur) ou ainda, o domínio central da proteína G, BBG2Na, desenvolvidas e submetidas a testes clínicos. Dentre todas as PFP, apresentou resultados mais promissores, apresentando-se segura e imunogênica em adultos, crianças acima de 12 meses com ou sem doença pulmonar, bem como em idosos e mulheres grávidas (FALSEY et al., 1997; GROOTHUIS et al., 1998; PIEDRA et al., 1996). Os recém-nascidos de mães que receberam a vacina apresentaram título quatro vezes maior em comparação aqueles cujas mães receberam o placebo (PIEDRA et al., 1998).

As vacinas atenuadas aplicadas na mucosa respiratória foram desenvolvidas por mais de uma década, sendo a mais estudada, a atenuada por termossensibilidade, e com crescimento adaptado ao frio. Porém, o uso dessas vacinas está comprometido pela possibilidade de reversão genética e da virulência, além da baixa imunogenicidade (WRIGHT et al., 2000). Outras metodologias de atenuação de vírus foram desenvolvidas envolvendo a deleções em alguns genes, como por exemplo, os genes NS1, NS2 e SH; G; NS2 e M2-2, no entanto, os resultados mostraram que a replicação viral *in vitro* foi praticamente igual ao controle

(COLLINS e MURPHY, 2002). A combinação de vacinas de vírus atenuado com as vacinas de subunidades também é uma opção considerada para proteção contra doenças causadas pelo HRSV, entretanto estudos preliminares foram inconclusivos em crianças e idosos (GIRARD et al., 2005).

Apesar de todos os esforços, nenhuma das vacinas tem previsão de licenciamento ou utilização, embora algumas estejam em estágios avançados de ensaio clínico (GRAHAM, 2011; SCHICKLI et al., 2009; RAMILO, 2009; ADAIR, 2009; ANDERSON et al., 2010; NOKES e CANE, 2008). As maiores restrições ao desenvolvimento de vacinas incluem o sistema imune imaturo do público alvo da imunização, a capacidade do RSV de escapar da imunidade inata, falha na indução da imunidade adaptativa para prevenir as reinfecções, histórico da exacerbação da doença induzida pela vacina e ausência de modelo animal permissivo à infecção pelo HRSV (GRAHAM, 2011).

Nas infecções do trato respiratório inferior, causadas pelo HRSV, o tratamento indicado consiste em remoção mecânica das secreções, posicionamento apropriado da criança, administração de oxigênio umidificado e nos casos mais graves a assistência respiratória (COLLINS et al., 2001).

O antiviral Ribavirina (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), um nucleosídeo análogo a guanosina, constitui uma terapia indicada para o tratamento do HRSV, e está licenciada desde 1986. O seu uso é indicado na forma de aerossol (COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES, 1993) para tratamento de doenças graves causadas por HRSV. O alto custo e o tratamento prolongado (12 horas ou mais de inalação) fazem com que o uso da ribavirina tenha sua validade contestada (WYDE, 1998; BROUGHTON et al., 2003; VENTRE et al., 2004; EMPEY et al., 2010).

Outro potencial candidato para o tratamento das infecções causadas pelo HRSV é o RSV604, uma benzodiazepina com atividade anti-RSV, que é ativa contra isolados clínicos de ambos os grupos do HRSV, A e B. Testes *in vitro* e outros realizados em animais, como camundongo e ratos, demonstraram que RSV604 é um potente inibidor da replicação do HRSV, além de ser tolerado por todas as espécies testadas. Este é o candidato mais promissor para o tratamento de doenças causadas em humanos pelo HRSV. A resistência viral apresentou-se por mutação no gene que codifica a proteína do nucleocapsídeo, indicando um diferente mecanismo deste componente na atividade anti-RSV. Essa droga está sendo

testada atualmente e se encontra na fase clínica II (NOKES e CANE, 2008; CHAPMAN et al., 2007).

Um diferente enfoque para a atividade antiviral contra HRSV é o uso de pequenos RNAs de interferência (siRNA) que reduzem a produção de proteína por inibir o mRNA alvo em uma seqüência específica. Esses pequenos RNAs de interferência são fitas complementares ao RNA viral alvo, contendo de 21 a 23 nucleotídeos que hibridizam na extremidade 3' da fita do RNA viral que se encontra sob a forma de fita simples (BARIK, 2004; deVINCENZO et al., 2007). A principal vantagem de se usar os siRNA é que não necessita de elucidação da proteína, sendo teoricamente possível construir siRNA para qualquer RNA viral, bastando apenas saber qual é a seqüência do vírus. Um grande número de mRNA é indispensável para o ciclo de vida viral, fazendo com que eles sejam alvos para ação do silenciamento gênico, o que diminui assim a chance de mutantes de escape e também de vírus com resistência a droga (BARIK, 2004).

Um problema com a efetividade do uso dos antivirais contra HRSV é que a maioria dos pacientes só procura os cuidados médicos quando a infecção já está bem estabelecida e, que os muitos sinais da doença deve ser uma consequência da resposta imune para o vírus, mais do que o resultado da replicação viral *per si* (NOKES e CANE, 2008).

Diante da falta de uma vacina eficaz, a imunoprofilaxia passiva é feita com o uso de imunoglobulinas (Igs). A primeira medida efetiva na prevenção da infecção do trato respiratório inferior e, conseqüentemente, a hospitalização de crianças, foi a administração mensal, via intravenosa, de imunoglobulinas confeccionadas a partir de plasma humano com altos títulos anti-HRSV, como o RSV-IGIV (Respigam[®]) (SASTRE et al., 2004). Este último consiste do fracionamento de uma IgG humana utilizada para alta neutralização da atividade do HRSV (NOKES e CANE, 2008).

Para melhorar a potência dos anticorpos e substituir a administração intravenosa por intramuscular foi desenvolvido um anticorpo monoclonal anti-HRSV denominado MEDI-493 ou Palivizumab (Synagis[™]), aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) desde 1998, que se mostrou eficaz na redução de internações por HRSV em lactentes de alto risco. O Palivizumab é uma IgG de camundongo humanizada que atua ligando-se a glicoproteína F. A profilaxia mensal com Palivizumab foi associada, em geral, a uma redução de 55% nas hospitalizações por HRSV (CARDENAS et al., 2005).

Um desestimulante para o uso do Palivizumab é o alto custo financeiro associado ao trabalhoso programa de prevenção. Cada frasco contendo 100 mg do remédio custa em torno de U\$ 900,00 sendo que a dose recomendada é de 15 mg/Kg de peso corporal, administrada uma vez por mês durante a época de epidemia do HRSV. As ampolas, uma vez abertas e reconstituídas, devem ser utilizadas no prazo máximo de 6 horas (COMMITTEE ON INFECTIONS DISEASES AND COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 1998; MEDIMMUNE Inc.; PEDIATRIC PHARMACOTHERAPY – UNIVERSITY OF VIRGINIA, 1998).

Bosso (2008) avaliou os padrões obtidos pelo sequenciamento de sítios específicos do gene da proteína F de amostras brasileiras com os sítios de epítomos do monoclonal humanizado, Palivizumab, utilizado como tratamento da doença causada pelo HRSV e verificou que não houve existência de mutantes de escape nas amostras analisadas.

Essas mutações ocorreram em dois nucleotídeos que estão diretamente associadas à resistência *in vitro* ao Palivizumab. Outros trabalhos corroboram com a hipótese da existência de mutantes de escape por conseguir produzir em *cotton rats* vírus resistentes ou parcialmente resistentes ao Palivizumab (ZHAO et al., 2004, 2005, 2006).

Estudos mais antigos realizados *in vitro* utilizando outros tipos de monoclonais e policlonais, já demonstravam a formação de mutantes de escape provenientes de cultura celular contra a proteína G e F (BEELER et al., 1989; GARCIA-BARRENO et al., 1990; LOPEZ et al., 1990; CROWE et al., 1998; WALSH et al., 1998) demonstrando pontos de mutação de grande relevância biológica (ARBIZA et al., 1992; LOPEZ et al., 1998).

Hospitalizações devido a infecções pelo RSV em indivíduos tratados profilaticamente pelo Palivizumab são raras, porém já foram descritas, principalmente durante o intervalo entre a primeira e segunda injeção, quando os níveis da droga no organismo podem ser baixos. Adams et al. (2010) descreveram que um bebê prematuro (25 semanas de gestação) tratado profilaticamente com o Palivizumab, seguindo o protocolo de 3 injeções com intervalo de aproximadamente 40 dias cada, apresentou sintomas de infecção respiratória 3 dias após a última dose. O bebê foi internado na UTI e o diagnóstico laboratorial foi HRSV. O seqüenciamento do gene F do vírus isolado revelou a presença de duas mutações na região da ligação da proteína com a droga. As mutações ocorreram nas posições

272 e 276 (asparagina para serina na posição 276 e Lisina para serina na posição 272, tanto na amostra viral como no vírus isolado em cultura, e Lisina por ácido glutâmico na posição 272, após a passagem do vírus em cultura de célula com presença do palivizumab). As duas posições foram descritas em outros estudos, tanto *in vivo* como *in vitro*, como relacionadas ao aparecimento de resistência à droga (ZHAO e SULLENDER, 2005; ZHAO et al., 2006).

O mais recente medicamento que está sendo testado em fase clínica III para a prevenção de infecções pelo HRSV no trato respiratório inferior é um anticorpo monoclonal humanizado, o Motavizumab, anteriormente conhecido como Numax[®] (CARBONELL-ESTRANY et al., 2010). O Motavizumab é um anticorpo monoclonal anti-RSV ultrapotente derivado do palivizumab. Apresenta melhores taxas de associação e dissociação o que resulta em até 44 vezes melhora na capacidade de neutralizar o vírus *in vitro*, mas apresentou apenas ligeiro aumento na potência *in vivo* quando testados em *cotton rats*.

Um estudo comparativo entre o Palivizumab e o Motavizumab mostrou que o perfil de segurança de ambos são similares para bebês. Além disso, o índice de hospitalizações com esse novo medicamento foi reduzido em 26% e a incidência de infecções do trato respiratório inferior causada por HRSV, que exigiam tratamento médico ambulatorial, reduziu em 50% (deVINCENZO et al., 2008).

1.6 Epidemiologia

O HRSV ocupa um papel de destaque dentre as doenças agudas do trato respiratório, principalmente em crianças, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento (SCOTT et al., 2006), com maior prevalência em países em desenvolvimento (BRYCE et al., 2005) Pode ocorrer em todas as faixas etárias, entretanto, crianças de 6 semanas a 9 meses são as que desenvolvem problemas mais sérios, tais como: pneumonia e bronquiolite (COLLINS et al., 2001).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que o HRSV cause 64 milhões de infecções e que 160 mil pessoas vão a óbito anualmente (COLLINS e GRAHAM, 2008; WHO, 2009).

O índice de hospitalizações de crianças, geralmente fica em torno de 13 a 27,4 para cada 1000 nascimentos (McLAURIN et al., 2005; SANGARE et al., 2006; LEADER et al., 2002, 2003; IWANE et al., 2004), com maior prevalência em crianças

de até 6 meses de idade (SHAY et al., 1999; BOYCE et al., 2000; IWANE et al., 2004; HOLMAN et al., 2004). Entretanto, cerca de 10 a 20% são crianças de 1 a 2 anos de idade (McLAURIN et al., 2005; IWANE et al., 2004).

A epidemia do HRSV apresenta uma sazonalidade bem definida, ocorrendo anualmente no final do outono, inverno ou início da primavera, mas não durante o verão. Cada epidemia dura cerca de 5 meses, com 40% dos casos ocorrendo durante os meses de pico, geralmente no meio do surto (COLLINS et al., 2001). Países com clima temperado, como Argentina e Paquistão, tem uma sazonalidade similar aos países norte americanos e europeus, já em países de clima tropical é relatado o aumento da incidência do HRSV nas épocas de chuva. Diferenças marcantes na sazonalidade do HRSV têm sido relatadas em regiões geograficamente próximas, como Moçambique e África do Sul, ou Bangladesh e Índia (GIRARD et al., 2005).

Fatores geográficos e climáticos são claramente associados com o caráter sazonal do HRSV (STENSBALLE et al., 2003), mas fatores comportamentais como por exemplo aglomeração em locais fechados que causa intensa exposição (GIRARD et al., 2005; BULKOW et al., 2002; SIMOES et al., 2003) e mudanças cíclicas na suscetibilidade da população (STENSBALLE et al., 2009) também tem sido associado. Índices de superlotação e densidade populacional bem como a população urbana ou rural podem ser usados para estratificar a duração das epidemias de HRSV. A probabilidade da epidemia do HRSV se estender por mais de 20 semanas é diretamente proporcional ao número de crianças abaixo de 5 anos de idade por domicílio e ao número de crianças por Km² (ZACHARIAH et al., 2009). Em alguns países os fatores climáticos parecem ser mais importantes do que o contato social (WEBER et al., 2001).

No Brasil os surtos ocorrem, geralmente, nos meses de outono/inverno estendendo-se em algumas ocasiões ao início da primavera (CINTRA et al., 2001; MIYAO et al., 1999; NASCIMENTO et al., 1991; VIEIRA et al., 2001; BOTOSSO, 2002). Estudos mostram que a incidência do HRSV em diferentes localidades do Brasil, como em Fortaleza, Salvador e Uberlândia apresentam a mesma sazonalidade, com os surtos iniciando em janeiro ou fevereiro e terminando em julho ou agosto (MOURA et al., 2006; CALEGARI et al., 2005; SERAFINO et al., 2004).

Em São Paulo, o pico do surto do HRSV, ocorre no outono e não está associado com estações chuvosas, sendo, entretanto, coincidente com a época em

que são observados altos níveis de poluição na cidade. Entretanto, a associação entre a poluição ambiental e a incidência do HRSV não foi suficientemente estudada (HEIN, 1997).

Embora muitos estudos tem procurado explicar o padrão da atividade do HRSV relacionados a fatores climáticos e ao comportamento humano, nenhuma explicação definitiva ainda foi encontrada (MLINARIC et al., 2009).

As diferenças de patogenicidade entre os grupos A e B ainda não estão totalmente esclarecidas. Alguns autores concluíram que as infecções pelo grupo A resultam em doenças mais graves (TAYLOR et al., 1989; McCONNOCHIE et al., 1990; HALL et al., 1990; IMAZ et al., 2000; GILCA et al., 2006). Por outro lado, Zelaya et al. (1994) e Hornsleth et al. (1998) constataram maior gravidade em crianças infectadas pelo grupo B. Há ainda autores que não observaram em seus estudos diferenças significativas de patogenicidade entre os dois grupos (OLIVEIRA et al., 2008; KAPLAN et al., 2008; RUSSI et al., 1989 a, b; BROUARD et al., 1993; MCINTOSH et al., 1993; STRALIOTTO et al., 1994). Estudos revelaram haver maior incidência de doenças graves no trato respiratório inferior e maior prevalência do HRSV em crianças do sexo masculino (QUEIROZ et al., 2002, MLINARIC et al., 2009; ÖSTLUND et al., 2008; SILVA et al., 2008; KAPLAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008).

O padrão de circulação dos grupos A e B divergem de local para local e de ano para ano. Dados da literatura revelam que os dois tipos têm circulado conjuntamente em muitas epidemias em várias regiões do mundo, com prevalência do grupo A (ANDERSON et al., 1991; COLLINS et al., 2002; VIEGAS et al., 2005, FRABASILE et al., 2003; SCOTT et al., 2004 e ZLATEVA et al., 2004; GILCA et al., 2006; BOTOSSO, 2002; KAPLAN et al., 2008), embora tenham sido descritos surtos com predominância do grupo B (HENDRY et al., 1986; LUKIC-GRLIC et al., 1998; MLINARIC et al., 2009; TRENTO et al., 2010).

A gravidade da doença geralmente é mais alta quando há coinfeções virais do que em infecção causada por apenas um único vírus (CILLA et al., 2008).

As reinfecções são comuns durante toda a vida. Em uma comunidade no Kenia, foi demonstrado que as reinfecções com HRSV foram identificadas em 11 (3,3%) das 338 crianças analisadas no período de 1 ano (NOKES et al., 2004). Estudo realizado em Houston, Texas, demonstrou que 83% de crianças infectadas durante o primeiro ano de vida foram re-infectadas no segundo ano e 46% foram re-

infectadas durante o terceiro ano (GLEZEN et al., 1986). Pacientes infectados com HRSV A ou B podem ser reinfetados com um vírus do mesmo grupo e do mesmo genótipo durante infecções consecutivas (SATO et al., 2005).

A alta variabilidade genética do HRSV pode ser uma das causas das re-infecções. White et al. (2005) sugeriram que a infecção por um determinado grupo ou genótipo influencia a dinâmica de transmissão de variantes homólogas ou heterólogas.

Há mais de dez anos, a variabilidade da proteína G do HRSV é investigada (MELERO et al., 1997; CHOI e LEE, 2000; SCOTT et al., 2004; ZLATEVA et al., 2004; VIEGAS et al., 2005; GALIANO et al., 2005), demonstrando a existência de vários genótipos co-circulando em um mesmo surto, com predominância de um ou dois genótipos, os quais podem continuar circulando por vários anos consecutivos, ou diminuir nos surtos subseqüentes, até o seu desaparecimento (CANE et al., 1994, 1991; JOHANSEN et al., 1997; COGGINS et al., 1998; LUKIC-GRLIC et al., 1998; PERET et al., 1998, 2000; CHRISTENSEN et al., 1999; CHOI e LEE 2000; ZLATEVA et al., 2004, 2005; BOTOSSO et al., 2009).

Os genótipos que surgem no final de um surto tendem a predominar no próximo (SATO et al., 2004; ZLATEVA et al., 2005). As mudanças decorrentes das alterações genéticas podem alterar a estrutura antigênica do vírus, conferindo uma vantagem evolutiva, permitindo a reinfecção de indivíduos expostos ao HRSV anteriormente.

Nos estudos realizados por Botosso (2002), sobre a diversidade genética da glicoproteína G do HRSV entre os anos de 1995-1998, confirmam a alternância na circulação de cepas de HRSV em São Paulo no decorrer dos anos, mas ainda não se sabe se esse fenômeno é decorrente da imunidade desenvolvida pela população ou se está relacionado a características de um genótipo em particular ou, ainda, se é necessária à predominância de um determinado genótipo para a ocorrência de um novo surto.

Estudos tem mostrado que o padrão de evolução do HRSV assemelha-se com o do vírus influenza B. As principais característica da circulação do HRSV são: 1) epidemias são comumente provocadas por vírus classificados em mais do que um genótipo, sendo que num determinado local o genótipo predominante em uma epidemia é freqüentemente substituído por outros genótipos nos anos consecutivos; 2) a maioria dos genótipos do HRSV são distribuídos em todo o mundo, além disso,

amostras isoladas em locais distantes e em anos diferentes podem ser mais semelhantes do que amostras isoladas no mesmo local durante uma mesma epidemia; 3) dentro de cada linhagem ocorre o acúmulo progressivo de mudanças na seqüência do gene codificador da proteína G; 4) mudanças sinônimas nos nucleotídeos são distribuídas uniformemente por todo o gene da proteína G, enquanto que mudanças não sinônimas estão acumuladas nas duas regiões hipervariáveis (G1 e G2) da proteína G, podendo sugerir a idéia de seleção positiva para muitas dessas mudanças (MELERO et al., 1997; WOELK et al., 2001; ZLATEVA et al., 2004, 2005).

A epidemiologia molecular do gene G do HRSV na Nova Zelândia foi realizada pela análise de 106 amostras do grupo A (entre os anos de 1967 a 2003) e 38 do grupo B (entre os anos de 1984 a 2004). O agrupamento temporal demonstrou que os isolados do grupo B agruparam mais fortemente do que os isolados do grupo A. Os isolados do grupo B mostraram maior variabilidade genética, em termos de uso de *stop codon* e conseqüentemente, mudanças no tamanho da proteína por inserções e deleções que o HRSV-A. A taxa de mutação para o HRSV A foi de $2,6 \times 10^{-3}$ mudanças por nucleotídeo/ano, enquanto que para o HRSV B foi de $3,5 \times 10^{-3}$ mudanças de nucleotídeo/ano. Levando em consideração ambas as observações, verificou-se que ambos os grupos evoluem diferentemente, com os isolados do grupo B evoluindo mais rápido do que os isolados do grupo A (MATHESON et al., 2006).

1.7 HRSV do grupo B com inserção de 60 nucleotídeos

Trento et al. (2003) em 2003 descreveram três isolados clínicos de HRSV (BA3833/99B, BA3859/99B e BA4128/99B), classificados antigenicamente no grupo B que continham uma duplicação de 60 nucleotídeos entre as posições 792 e 851 da região C-terminal do gene codificador da proteína G e os denominou de BA, em função do seu isolamento ter ocorrido em Buenos Aires, na Argentina (Figura 14). Essas amostras foram isoladas de três centros hospitalares e em diferentes datas no ano de 1999.

Desse ano em diante foi relatada, em diversos locais do mundo, a circulação desse novo genótipo dentro do grupo B, que se caracterizava por possuir essa inserção de 60 nucleotídeos na região C-terminal do gene G (SCOTT et al., 2004;

NAGAI et al., 2004; SATO et al. 2004; ZLATEVA et al., 2004).

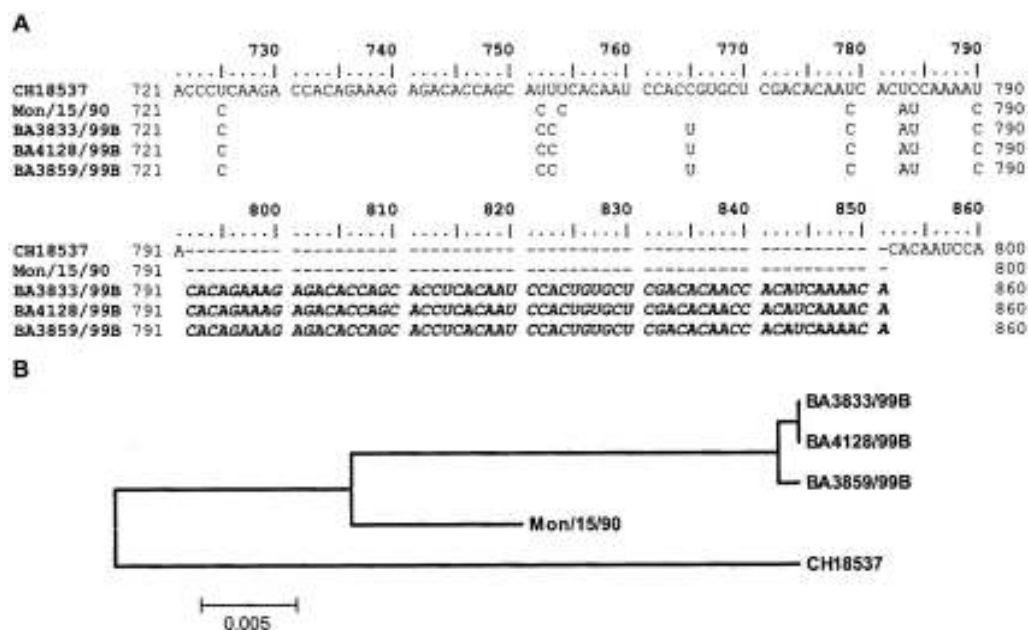


Figura 14: (A) Seqüência parcial de nucleotídeos do gene da proteína G do HRSV mostrando a inserção de 60 nucleotídeos na região C-terminal do gene da proteína G de três isolados. (B) Análise filogenética dos três isolados citados em (A).

Fonte: Trento et al. (2003).

A estrutura secundária, relativamente estável, formada pelo RNA viral nos isolados do genótipo BA (Figura 15), sugere que a inserção tenha se formado durante a replicação do RNA viral pela polimerase, que copiou duas vezes o mesmo fragmento antes de continuar a síntese do RNA complementar, sugerindo um possível mecanismo de geração do segmento duplicado. Em um determinado momento do processo de duplicação da molécula de RNA, a polimerase que estava ligada ao RNA viral, copiou novamente os 60 nucleotídeos já copiados antes de continuar a síntese do RNA complementar (TRENTO et al., 2003).

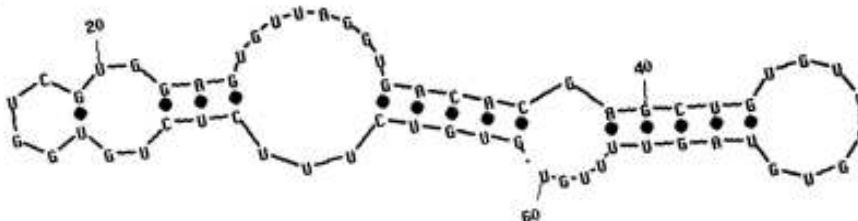


Figura 15: Estrutura secundária da molécula de RNA referente ao segmento duplicado na região C-terminal do gene da proteína G em isolados de HRSV com inserção de 60 nucleotídeos.

Fonte: Trento et al. (2003).

A seqüência de nucleotídeos do gene G dos isolados BA foi traduzida em um polipeptídeo de 315 aminoácidos, o maior encontrado entre os isolados de HRSV até aquela data. No ectodomínio da proteína G do HRSV há sítios potenciais para a O-glicosilação e N-glicosilação. A duplicação dos 60 nucleotídeos ocorreu em uma região que possui inúmeros sítios potenciais para a O-glicosilação, resultando na inserção de 20 aminoácidos na estrutura polipeptídica da proteína G e, conseqüentemente, na inclusão de muitos sítios potenciais de O-glicosilação, conforme ilustrado na figura 16. A região C-terminal da proteína G tem se mostrado imunologicamente relevante. Assim, é possível que a duplicação de parte dos aminoácidos nessa região como ocorre nesses isolados, mudem a estrutura antigênica da proteína G, conferindo a ela uma vantagem evolucionária que permita reinfetar indivíduos expostos previamente ao vírus ancestral sem inserção (TRENTO et al., 2003).

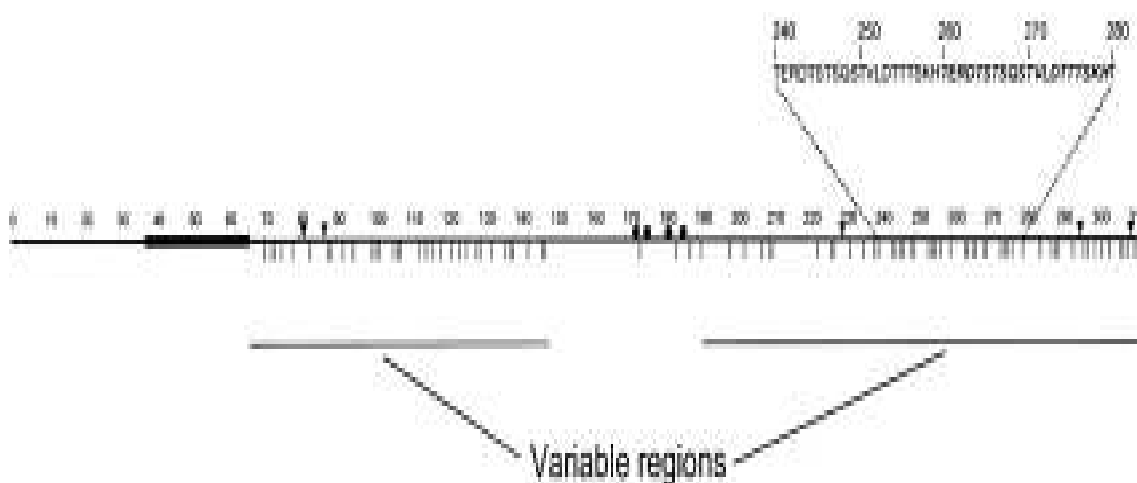


Figura 16: Esquema da estrutura primária da proteína G do HRSV com inserção de 60 nucleotídeos (BA3833/99G). Legenda: (—) indica a região transmembrana; (▼) indica potencial de N-glicosilação; (|) indica potencial de O-glicosilação; (●) indica resíduos de cisteína. As regiões variáveis da proteína G são indicadas. A seqüência de aminoácidos entre os resíduos 240 e 280 é mostrada o segmento de 20 aminoácidos que foi duplicado.
Fonte: Trento et al. (2003).

Os isolados do genótipo BA ilustraram a introdução de uma nova e drástica mudança na proteína G durante a propagação natural do HRSV. O fato desses 3 isolados argentinos possuírem seqüências muito similares (duas delas idênticas) sugere que eles se originaram de um único e curto evento que ocorreu antes de serem isolados (TRENTO et al., 2003). Em trabalho recente, Trento et al. (2010)

mostraram que o primeiro isolado do HRSV do grupo B com a duplicação de 60 nucleotídeos ocorreu na cidade de Madri, Espanha, no mês de dezembro de 1998 (epidemia de 1998-1999). Esta amostra foi coletada poucos meses antes do primeiro isolado ser descrito, com a referida duplicação de 60 nucleotídeos, em Buenos Aires (junho de 1999). No entanto, a amostra espanhola apresentou mudanças em dois nucleotídeos na região duplicada o que sugere que os ancestrais continuariam sendo dois dos três isolados de Buenos Aires que continham cópias idênticas do segmento duplicado (TRENTO et al., 2010).

A figura 17 reflete a disseminação global do HRSV com a inserção de 60 nucleotídeos, denominado BA, desde o seu surgimento, ocorrido, provavelmente, em 1998 em Madri e a partir daí sua circulação em diversos países. Análises filogenéticas realizadas com as sequências representantes destes genótipos provenientes de diversas localidades dividiram as amostras em 6 *clusters* diferentes, BA-I a BA-VI. As amostras do grupo BA-I circularam extensivamente em Buenos Aires de junho a agosto de 1999. Em dezembro do mesmo ano, a primeira amostra não-Argentina de BA-I com cópia idêntica do segmento duplicado foi encontrada na Bélgica (ZLATEVA et al., 2005), podendo pressupor que o HRSV BA-I atravessou o Oceano Atlântico naquela direção, onde o vírus disseminou-se em um período de poucos meses. Nos anos subseqüentes, essas amostras tiveram um número limitado de acúmulo de mudanças no segmento duplicado tendo circulado em lugares muito distantes, evidenciando a rápida disseminação do HRSV em todo o mundo e a sua variabilidade genética (TRENTO et al., 2006). Esse genótipo, BA-I, circulou até 2002, desaparecendo a seguir.

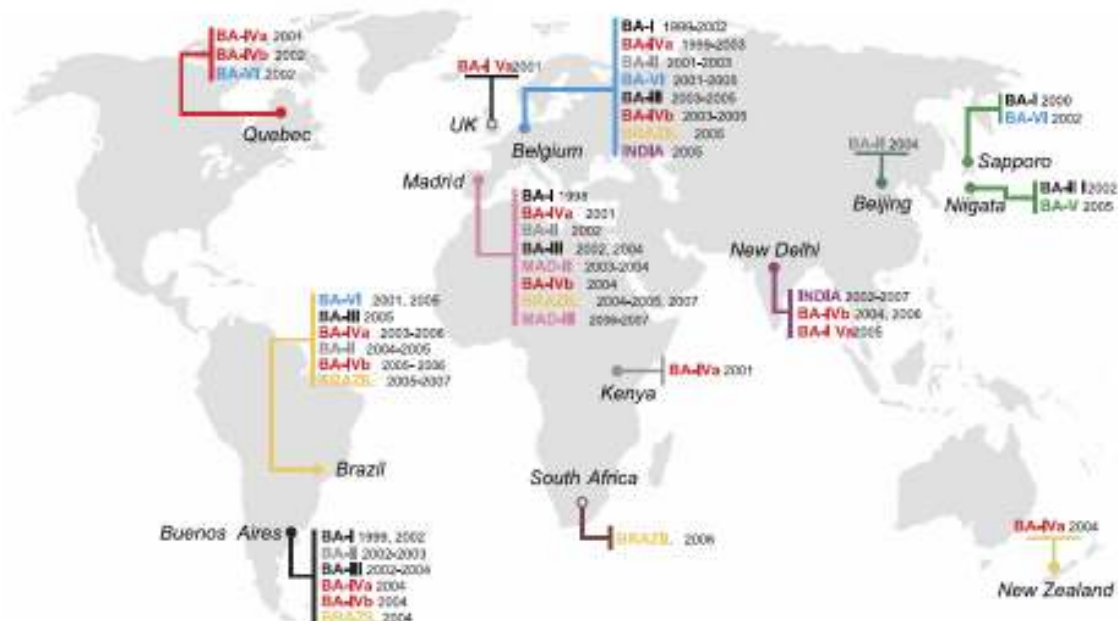


Figura 17: Distribuição geográfica das seqüências do genótipo BA. O mapa mostra a localização que o HRSV com a duplicação de 60 nucleotídeos (BA) foi isolado e publicado indicando os grupos correspondentes e os anos de isolamento desde 2008 como mostrado no mapa.

Fonte: Trento et al. (2010).

Um único isolado (Beijing/B/04/11) de HRSV B com inserção de 60 nucleotídeos foi relatado na China no ano de 2004 e pertence ao genótipo BA-VI (ZHANG et al., 2007)

O BA II surgiu na Bélgica em 2001, depois na Argentina em 2002-2003 e então no Brasil e em Beijing em 2004. O genótipo BA-III foi encontrado primeiramente em Buenos Aires e Madri em 2002 e o BA-IV na Bélgica (1999-2003). Este último não foi encontrado em Buenos Aires e no Brasil antes de 2004, o que mostra que provavelmente ele foi importado. O genótipo BA-IV corresponde a 70% das seqüências isoladas atualmente, e está dividido em 4 clusters diferentes – BA-IVa, BA-IVb, Brazil e India (TRENTO et al., 2010).

O rápido acúmulo de mudanças no gene da proteína G é um indicativo da ação de forças de pressão seletiva para acelerar a fluidez genética. Notavelmente, a evolução das seqüências dos isolados BA ($2,5-3,0 \times 10^{-3}$ substituição de nucleotídeos/regiões/anos) é significativamente mais alta do que as demonstradas pelos outros grupos antigênicos de HRSV A ($1,83-2,6 \times 10^{-3}$ substituição de nucleotídeos/regiões/anos) e B ($1,95-3,5 \times 10^{-3}$ substituição de

nucleotídeos/ regiões /anos) (JENKINS et al., 2002; ZLATEVA et al., 2004, 2005; MATHENSON et al., 2006).

A pressão seletiva imunológica em algumas regiões do ectodomínio da proteína G do HRSV é importante para a evolução do HRSV (MELERO et al., 1997; WOELK et al., 2001; ZLATEVA et al., 2004, 2005; BOTOSSO et al., 2009). Algumas regiões selecionadas positivamente para isolados do grupo B estão localizadas na região duplicada ou próximas a ela (ZLATEVA et al., 2005; BOTOSSO et al., 2009). Isso deve contribuir para acelerar o acúmulo de mutações na região duplicada comparada a outros segmentos do gene da proteína G (TRENTO et al., 2006).

A vantagem seletiva dos isolados BA em relação a outros genótipos é desconhecida, mas a condição imunológica nativa da população humana a respeito desse novo genótipo deve ter contribuído para a sua rápida disseminação em todo o mundo (TRENTO et al., 2010).

A proporção de isolados BA em todo o mundo aumentou gradualmente até 2004 e 2005, período no qual prevaleceu sobre os demais genótipos do grupo B, independentemente da prevalência do grupo B sobre o grupo A, por exemplo, na Bélgica, na qual o genótipo BA correspondeu a 100% dos isolados do grupo B em três epidemias consecutivas (2003 a 2006) (ZLATEVA et al., 2007). Dados muito similares foram encontrados também em Nova Deli, na Índia (PARVEEN et al., 2006) e na África do Sul (VISSER et al., 2008). Dados epidemiológicos publicados em Niigata (Japão) mostraram uma alta prevalência do genótipo BA entre os isolados do grupo B, que chegou a 91,1% em 2002-2003 e 100% em 2003-2004 (SATO et al., 2005). Em Madri a mesma tendência é observada com a prevalência do genótipo BA variando de 80% a 100% nas últimas estações (2005-2006, 2006-2007, 2007-2008) (TRENTO et al., 2010).

Os dados apresentados indicam que a prevalência do genótipo BA tem aumentado em diversos países, correspondendo a 100% das amostras do grupo B identificadas após 2005-2006 (TRENTO et al., 2010).

No Brasil, a primeira vez que o genótipo foi detectado foi em 2001, a partir de amostras clínicas de duas crianças internadas no Hospital Universitário da USP, na cidade de São Paulo. A seguir foram identificadas duas amostras em 2003, uma em 2004 e, em 2005, o genótipo tornou-se o mais prevalente na cidade (BOTOSSO et al., 2009).

Visando caracterizar a evolução do HRSV genótipo BA no Brasil, foram analisadas sequências dos genes G (correspondendo à porção G2 C-terminal) de amostras isoladas entre os anos de 2001 a 2009, no Estado de São Paulo (cidades de São Paulo, Ribeirão Preto, Jundiaí e Itapevi) e entre os anos de 2004 e 2009 no Estado do Ceará (cidade de Fortaleza). Essas sequências foram comparadas com sequências disponíveis no *GeneBank* de diversas partes do mundo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Estudar a variabilidade genética de amostras de HRSV pertencentes ao genótipo BA, que contém duplicação de 60 nucleotídeos no gene G, identificadas no Brasil;

2.2 Objetivos específicos

- Sequenciar o gene G das amostras de HRSV pertencentes ao genótipo BA, circulantes em São Paulo;
- Identificar todas as alterações de nucleotídeos e aminoácidos das amostras brasileiras na segunda região hipervariável da proteína G do HRSV de amostras BA do ano 2001 a 2009;
- Analisar o padrão de circulação do genótipo BA no Brasil utilizando amostras colhidas em cidades do Estado de São Paulo e na cidade de Fortaleza no Ceará;
- Analisar o padrão de circulação do genótipo BA em todo o mundo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

As amostras foram colhidas de crianças menores de 5 anos de idade atendidas na clínica pediátrica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) nos setores de Enfermaria, Pronto Atendimento, Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e Berçário entre o mês de janeiro de 2001 e dezembro de 2008 que apresentaram quadro clínico de doença no trato respiratório. Também no ano de 2008 foram colhidas amostras do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (HSC-SP) e em 2009 somente deste último, totalizando 4274 amostras. Os espécimes foram colhidos com consentimento pós-informado dos pais ou responsáveis que assinaram um Termo de Consentimento com aprovação da Comissão de Ética Médica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) (Anexo A).

3.2 Fluxograma de trabalho

As amostras colhidas durante os anos de 2001 a 2005 foram previamente triadas para identificação do HRSV, seguido da genotipagem para identificação do genótipo BA por Botosso et al. (2009).

As amostras provenientes do HU-USP colhidas nos anos de 2006 e 2007 foram submetidas ao diagnóstico por RT-PCR *GeneScan* para identificação de 8 vírus respiratórios, dentre eles o HRSV, conforme Thomazelli et al. (2007).

As amostras provenientes do HU-USP colhidas em 2008 e do HSC-SP colhidas em 2008 e 2009 foram submetidas à reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) para diagnóstico de 7 vírus respiratórios pelos Laboratórios de Análises Clínicas dos respectivos Hospitais.

Todas as amostras HRSV positivas foram submetidas à PCR para amplificação parcial do gene G seguido de seqüenciamento de nucleotídeos, alinhamento das sequências, identificação do genótipo BA e análises filogenéticas (seções 3.6 a 3.9). O fluxograma de trabalho envolvendo desde a colheita das amostras até as análises filogenéticas está demonstrado na figura 18.

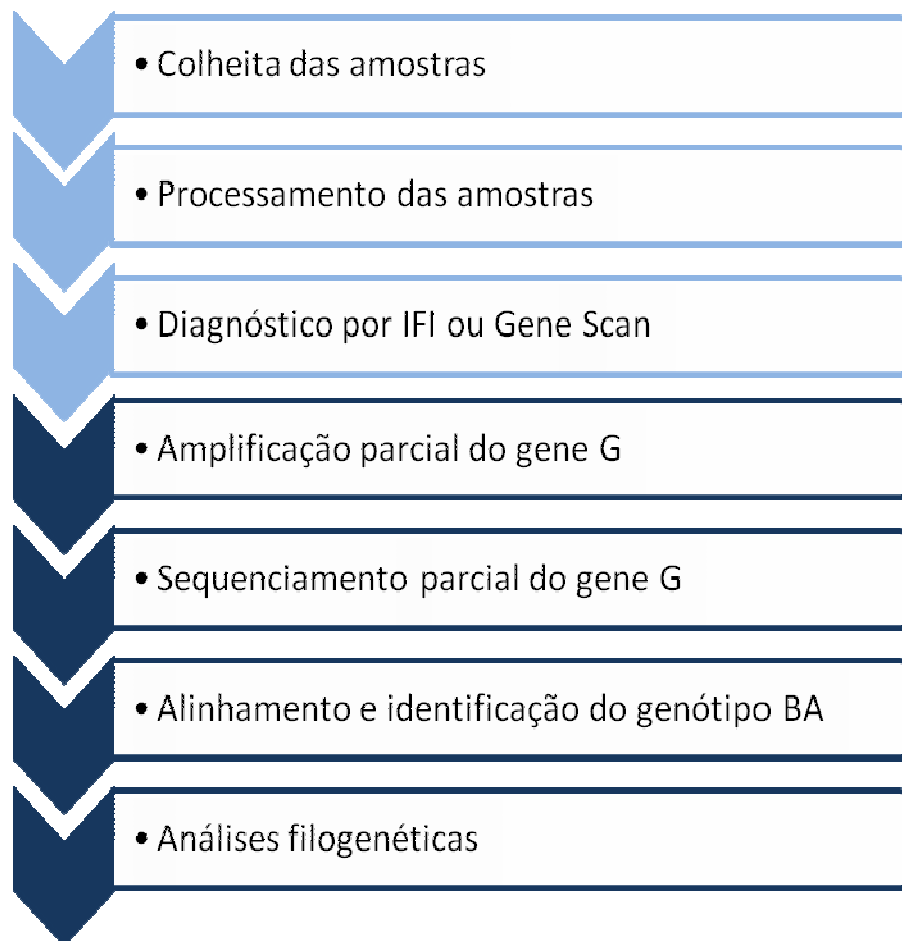


Figura 18: Fluxograma de trabalho dividido em 7 etapas no qual as 3 primeiras foram realizadas pela rotina do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB-USP, e dos laboratórios do HU-USP e HSC-SP com as amostras colhidas entre os anos de 2006 e 2009.

3.3 Colheita das amostras

Amostras de secreções de nasofaringe e *swab* nasal de crianças foram colhidas no máximo 48 horas após a admissão no HU-USP ou HSC-SP. Foram utilizados dois frascos contendo 4 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M pH 7.2, esterilizada. De uma das narinas da criança, foram colhidos espécimes clínicos em um *swab* umedecido em PBS e transferido imediatamente para o mesmo frasco, contendo a solução. A outra narina foi fluidificada com 1 mL de PBS estéril proveniente do 2º frasco. Após a umidificação, foi introduzida uma sonda esterilizada (sonda uretral nº 6) que a vácuo, aspirou à secreção de nasofaringe, depositando-a num equipo de solução parenteral, também esterilizado.

3.4 Processamento das amostras clínicas

O processamento foi realizado em um período de aproximadamente 4h após a colheita. O aspirado nasofaríngeo e o meio contendo o *swab* foram misturados, homogeneizados, tratados com 1000 U/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 50 U/mL de Nystatina (*Gibco BRL*[®]). As amostras foram separadas em 4 alíquotas: duas de 250 µL para a RT-PCR adicionando-se 750 µL de *TRIzol*[®] *Reagent* (*Invitrogen*[™]) em cada uma e estocando-as em freezer -70 °C, e duas partes para estoque em freezer -70 °C (500 µL) adicionando-se à amostra meio de congelamento volume a volume (40% de Meio Mínimo Essencial de Eagle – MEM/*Sigma* Chemical Co., acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 50% de Soro Fetal Bovino – SFB/*Cultilab* e 10% de glicerina esterilizada – *Sigma Chemical Co.*), utilizando-se o método do congelamento rápido em nitrogênio líquido. No presente estudo foram utilizadas amostras mantidas em *TRIzol*[®] *Reagent*.

3.5 Triagem das amostras de HRSV pertencentes ao genótipo BA

Foram utilizadas neste estudo 25 amostras dos anos de 2001 a 2005 pertencentes ao genótipo BA previamente identificadas por Botosso et al. (2009) e disponíveis no *GeneBank* (n. de acesso EU582432 a EU582433, EU582447 a EU582449, EU582467 a EU582483 e EU582458 a EU582460 e FJ427350).

Foram utilizadas também 27 amostras do ano de 2005 pertencentes ao genótipo BA gentilmente cedidas pela Dra. Danielle Bruna Leal de Oliveira, do ICB-USP.

Entre os anos de 2006 e 2007 as amostras clínicas foram submetidas a triagem pela técnica de *GeneScan* para identificação do RSV (THOMAZELLI et al., 2007) (seção 3.5.1). Já entre os anos de 2008 e 2009 as amostras clínicas foram submetidas à triagem pela técnica de IFI para identificação do RSV (seção 3.5.2).

Após a identificação, as amostras positivas para RSV tiveram o gene G amplificado parcialmente pela técnica de RT-PCR conforme Botosso et al. (2009), com algumas modificações, seguido do sequenciamento do gene (seções 3.6 até 3.9).

3.5.1 Diagnóstico por PCR GeneScan

3.5.1.1 Extração do RNA Total

O RNA foi extraído das amostras clínicas estocadas em *TRIzol*[®] *Reagent* (*Invitrogen*[™]). Todo processo de extração foi realizado em banho de gelo, utilizando centrífuga refrigerada (*Eppendorf* 5804R – rotor F-45-30) e reagentes gelados. A 1 mL do lisado foram adicionados 200 µL de clorofórmio (*Merck*), seguido de homogeneização por 15 segundos em agitador tipo *vórtex*, incubação em banho de gelo por 5 minutos e centrifugação a 7200 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante, fase aquosa, contendo o RNA (aproximadamente 400 µL), foi transferido para outro microtubo. O RNA foi precipitado adicionando-se 400 µL de isopropanol (*Merck*), seguido de homogeneização em *vórtex*, incubação por 15 minutos em gelo e centrifugação 7200 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 800 µL de etanol 75% (*Merck*) diluído em água *UltraPURE*[™] (*Invitrogen*[™]) seguido de centrifugação a 4000 x g por 8 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 50 µL de água *UltraPURE*[™] (*Invitrogen*[™]) contendo 40 U de Inibidor de Ribonuclease (*RNAse OUT* – *Invitrogen*[™]). O RNA extraído foi armazenado a -70 °C. Em cada extração foram utilizadas, como controles positivos, amostras viral padrão de HRSV, do grupo A e B e água como controle negativo.

3.5.1.2 Amostras virais padrão

Foram utilizadas, como padrão positivo, as amostras de HRVS A2 (Grupo A) e CH18537 (Grupo B), gentilmente cedidas pela Dra. Marilda Siqueira (Departamento de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil) cultivadas em células HEp-2.

3.5.1.3 Linhagem celular

Foram utilizadas as linhagens de células HEp-2. As células foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial de Eagle – Cultilab (MEM) acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, além de 10% de SFB (ou 2% no caso de

meio de manutenção). O crescimento foi feito em garrafas plásticas de 25 cm² ou 75 cm² (NUNCLON™ – Denmark ou Corning – USA) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C sendo repicadas com auxílio de solução de Tripsina-EDTA (0,25% de Tripsina 1/250 Sigma Chemical Co. e 0,02% de EDTA - Merck).

3.5.1.4 Inoculação em cultura de células

As células foram cultivadas em garrafas plásticas de 25 cm² (NUNCLON™ – Denmark) até 70-80% de confluência. O meio de crescimento foi retirado e inoculou-se 500 µL de amostra viral padrão. As células foram incubadas a 37 °C por 30 minutos para adsorção e, em seguida foi acrescentado o meio de manutenção. A incubação das células foi realizada nas mesmas condições da seção 3.5.1.3, sendo diariamente observadas para o aparecimento de sincícios, efeito citopático (ECP) característico, até de cerca de duas cruzes (aproximadamente 50% das células infectadas). A seguir o sobrenadante das culturas foi descartado e o tapete celular lavado 2 vezes com PBS. Foi adicionado, a seguir, 2 mL de Trizol LS[®], sendo este lisado utilizado no processo de extração.

3.5.1.5 Obtenção do cDNA

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial *High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Inc.), na qual 25 µL de RNA extraído foram diluídos em tampão contendo 50 pMoles de *Random primers*, tampão da RT 10x concentrado (50 mM de Tris-HCl [pH 8,3 a 25 °C], 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), 10 mM de Dithiothreitol, 250 U de *MultiScribe RT enzyme*, 1,5 mM de dNTP *mix* e água UltraPURE™ (Invitrogen™) para completar o volume de 50 µL. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e 37 °C por 120 minutos no termociclador *Eppendorf ThermoStart Plus* ou termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Inc.) ou *Eppendorf Mastercycler Personal*. O cDNA obtido foi armazenado a -70 °C.

3.5.1.6 GeneScan RT-PCR

3.5.1.6.1 Primers

Primers complementares à região correspondente a subunidade F1 do gene da glicoproteína de fusão, F, (MAZZULLI et al., 1999; ERDMAN et al., 2003) foram utilizados para amplificação parcial do gene F, sendo que o *primer sense* possuía um marcador fluorescente (FAM – Gibco BRL®). A seqüência dos *primers*, com a polaridade, localização no genoma e seqüências 5' – 3' estão descritas na tabela 3.

Tabela 3- Relação dos *primers* utilizados na PCR *GeneScan* para diagnóstico do HRSV, polaridade, posição no genoma, seqüência 5'- 3' e referências:

Primer e Polaridade	Localização no gene F	Seqüência (5'-3')	Referência
RSVAB F1 FAM (+)	1111-1134	AACAGTTTAACATTACCAAGTGA	Erdman et al. (2003)
RSVAB R1 (-)	1468-1490	TCATTGACTTGAGATATTGATCG	Erdman et al. (2003)

3.5.1.6.2 PCR *GeneScan*

As amostras foram submetidas ao diagnóstico diferencial para oito vírus, sendo HRSV, Influenza A e B (IA e IB), Parainfluenza 1, 2 e 3 (P1, P2 e P3), Adenovirus e Metapneumovírus, utilizando o método de *GeneScan* RT-PCR proposto por Erdman et al. (2003) e adaptado ao diagnóstico da rotina laboratorial por Thomazelli et al. (2007). A PCR por *GeneScan* foi realizada a partir de 10 µL do cDNA (seção 3.5.1.5) diluído em tampão Tris-HCl 20 mM [pH 8,4] / 50 mM de KCl / 1,5 mM de MgCl₂ (*Applied Biosystems*®), 4 µL de dNTP [1,25 mM] e água UltraPURE™ (*Invitrogen*™) para completar 50 µL. As amostras foram amplificadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*®), inicialmente

à 94 °C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma etapa final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos foram estocados a 4 °C até a detecção do produto amplificado.

3.5.1.6.3 Detecção dos produtos amplificados

Os produtos de PCR foram analisados utilizando o Analisador Automático de DNA *ABI PRISM* modelo 310 (*Applied Biosystems*®) com detecção para marcadores fluorescentes, utilizando o programa *GeneScan* para quantificação e análise de fragmentos de DNA. Um microlitro do produto de PCR foi misturado com 11 µL de formamida deionizada e 0,75 µL de *sizestandard* (*GeneScan TAMRA*™500). A inclusão do padrão de peso molecular em cada amostra permitiu a compensação de eventuais variações que pudessem ocorrer entre as corridas de eletroforese. Essa mistura foi colocada no termociclador para denaturação a uma temperatura de 95 °C por 3 minutos e imediatamente colocada em gelo até a análise. Os produtos foram submetidos à corrida de eletroforese de DNA no aparelho *ABI PRISM* modelo 310 (*Applied Biosystems*®) utilizando um capilar medindo 47 cm de comprimento preenchido por um polímero POP-4 (*Applied Biosystems*®). A injeção da amostra no capilar durou 5 segundos e a eletroforese foi realizada durante 40 minutos a uma corrente elétrica de 15.000 volts a 60 °C. Os fragmentos marcados foram detectados por um feixe a laser e por uma câmara CCD utilizando-se um filtro virtual “A” e em seguida foram analisados pelo programa *ABI PRISM* modelo 310 *GeneScan* (*Applied Biosystems*®) produzindo eletroferogramas com dados quanto ao tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) e quanto à intensidade de fluorescência em Unidades Relativas de Fluorescência (URF).

3.5.2 Diagnóstico por imunofluorescência indireta

O diagnóstico por IFI foi realizado pelos Laboratórios de Imunologia do HU-USP e do HSC-SP utilizando o *kit* comercial “*Painel de Vírus respiratório (RSV) IFA – Biotrin International, Dublin, Ireland* para identificação de 7 vírus respiratórios: Influenza vírus tipo A e Influenza vírus tipo B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Adenovírus e Vírus Respiratório Sincicial, seguindo as instruções do fabricante.

3.6 Amplificação parcial do gene G

As amostras positivas para HRSV, por ambas metodologias, foram submetidas à amplificação parcial do gene G.

3.6.1 Primers utilizados para a amplificação do gene G

Primers complementares aos RNA mensageiros (mRNAs) dos genes das glicoproteínas G (de adesão) e F (de fusão), descritos na literatura, foram utilizados para amplificar as amostras de HRSV (ZHENG *et al.*, 1996; PERET *et al.*, 1998 e 2000). A localização de cada *primer* no genoma viral, a polaridade, a seqüência 5'- 3' e a utilização estão representados na tabela 4 e esquematizados na figura 19.

O cDNA obtido, conforme descrito na seção 3.5.1.5, foi amplificado utilizando-se os *primers* FV e Gr5. O produto de PCR foi submetido, a seguir, a uma segunda amplificação tipo *Nested*, utilizando os *primers* GAB e F1AB.

O produto da *Nested* obtido foi utilizado como fita alvo para a reação de seqüenciamento utilizando os *primers* F1AB e GAB.

Tabela 4- Relação dos *primers* utilizados na PCR e na *Nested* para amplificação parcial do gene G, sua polaridade, localização no genoma, seqüência 5' – 3' e referência:

<i>Primer</i>	<i>Utilização</i>	<i>Localização no genoma</i>	<i>Seqüência (5'-3')</i>	<i>Referências</i>
F1AB (-)	<i>Nested PCR</i> Seqüenciamento	3-22 gene F	CAACTCCATTGTTATTTGCC	Peret <i>et al.</i> (1998)
FV (-)	PCR	163-186 gene F	GTTATGACACTGGTATACCAACC	Zheng <i>et al.</i> (1996)
Gr5(+)	PCR	151- 173 gene G	CTGGCAATGATAATCTCAACTTC	Sanz <i>et al.</i> (1994)
GAB (+)	<i>Nested PCR</i> Seqüenciamento	504-524 gene G	YCAITTTGAAGTGTTCAACTT	Peret <i>et al.</i> (2000)

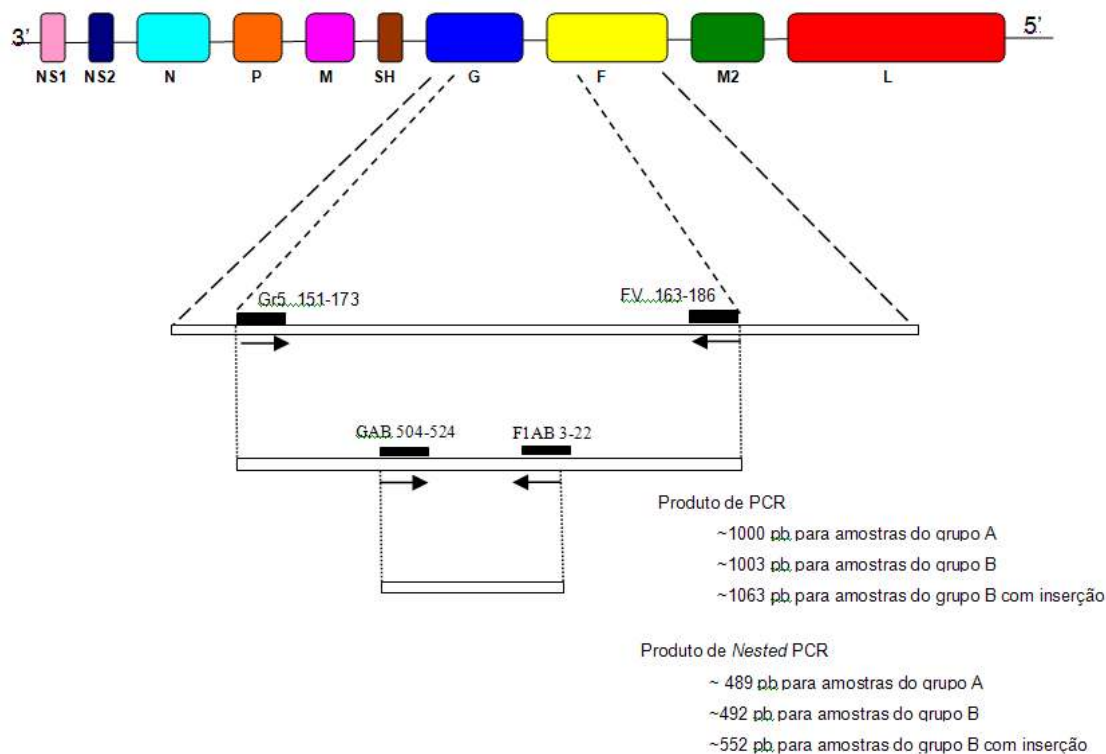


Figura 19: Esquema do genoma viral e emparelhamento dos *primers* utilizados na amplificação parcial do gene G. Os genes estão identificados de acordo com a proteína que codificam e estão listados no próprio esquema do genoma viral. Os retângulos pretos indicam a localização dos *primers* e seu emparelhamento com as fitas alvo. Os tamanhos esperados dos produtos amplificados para cada uma das reações estão indicados à direita do esquema.

3.6.2 Amplificação parcial do gene G

As amostras positivas para HRSV por *GeneScan* RT-PCR ou IFI foram submetidas a PCR para amplificação parcial do gene G. A PCR foi realizada partindo-se de 5 μ L do cDNA diluídos no tampão de reação – 10 mM tris - HCl [pH 9,0], 2,5 mM $MgCl_2$; 50 mM de KCl (PCR *buffer* 10X - *Amersham Pharmacia Biotech*), 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (*Amersham Pharmacia Biotech*), 50 pmol de cada *primer* (FV e Gr5) e água UltraPURE™ (*Invitrogen*™) para completar 50 μ L. A amplificação foi feita no termociclador *GeneAmp* PCR System 2400, com pré aquecimento a 95 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um deles composto de 1 minuto a 94 °C para denaturação do DNA molde, 1 minuto a 57 °C para o emparelhamento dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para a extensão das novas cadeias. Findos os ciclos seguiu-se um

aquecimento a 72 °C por 7 minutos de extensão final. A *Nested* PCR foi realizada utilizando 1 µL do produto da primeira amplificação da seqüência parcial do gene codificador da proteína G nas mesmas condições descritas acima, substituindo os *primer* FV pelo F1AB e Gr5 pelo GAB (Tabela 4, Figura 19).

3.7 Análise dos produtos amplificados

A detecção dos produtos amplificados pela PCR/*Nested* PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose (*Gibco BRL*®) a 1,5% em tampão TBE 0,5x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de EDTA [pH 8.0]) e 0,5 µg/mL brometo de etídeo. Uma mistura de 10 µL da amostra e 2 µL azul de bromofenol (*loading buffer*) foi submetida à eletroforese, em cuba horizontal (*Gibco BRL*®), em tampão TBE durante 40 minutos a 100 V. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta (UV) (*BioDoc-It*™ *Imaging System*), sendo fotografado, a seguir, para uma análise mais detalhada.

3.8 Purificação dos produtos amplificados do gene G

O produto da *Nested* PCR foi purificado para remoção de dNTPs e *primers* residuais por precipitação do etanol 100% (*Merck*) e acetato de sódio a 3 mM, pH 5,29 (*Merck*), seguido de lavagens com Isopropanol a 100%. Para cada 40 µL do produto de PCR, acrescentou-se 10 µL de água UltraPURE™ (*Invitrogen*™), completando um volume de 50 µL. A essa mistura foi acrescentado 10% (5 µL) do volume total de acetato de sódio e 110 µL de etanol 100% (*Merck*), sendo então homogeneizada em *vórtex*. As amostras foram incubadas e permaneceram em freezer -20 °C por 3 horas, para uma precipitação eficiente. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 4 °C durante 30 minutos a 20.817 x g. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionado 150 µL de etanol a 75%. Os tubos foram centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 20.817 x g. Novamente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi submetido à secagem em *speed-vacuum* a 60 °C por 20 minutos. O *pellet* foi ressuscendido em 50 µL de água UltraPURE™ (*Invitrogen*™). Em seguida o produto purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e seu tamanho e quantificação foram estabelecidos com o auxílio de marcador de peso molecular (1Kb *DNA Mass Ladder* - *Gibco BRL*®).

3.9 Sequenciamento dos produtos amplificados do gene G

Após a purificação dos produtos amplificados, as fitas de DNA foram seqüenciadas utilizando-se o kit “ABI PRISM Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit” (“Big Dye” - Applied Biosystems®), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados os *primers* FV e Gr5 para os produtos da PCR ou F1AB e GAB para os produtos da *Nested PCR* (tabela 4). Cerca de 3 µL, correspondendo a 10 - 30 ng, do produto purificado foram adicionados a um microtubo acrescido de 2 µL do tampão de seqüenciamento (*save money* - Tris HCl 200mM [pH 9,0] e 5mM MgCl₂), 3,2 pmol do *primer*, 2 µL do *Big Dye v3.1*, Applied Biosystems®) e água UltraPURE™ (*Invitrogen*™) para completar um volume final de 10 µL. Este procedimento foi realizado separadamente para cada um dos *primers*.

A extensão enzimática foi realizada em termociclador *GeneAmp PCR System* 2400 durante 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos para a denaturação do DNA, 50 °C por 10 segundos para o emparelhamento dos *primers* e 60°C por 4 minutos para a extensão. O produto obtido foi purificado visando à remoção de excesso de dideoxynucleotídeos "terminadores" presentes na reação, por precipitação com isopropanol a 75%, seguido de lavagem com etanol a 75%. As amostras purificadas e precipitadas foram ressuspensas em 10 µL de formamida ultrapura (Formamida Hi-Di™ Applied Biosystems®), denaturada a 95 °C por 3 minutos, seguido de um resfriamento em banho de gelo por 2 minutos, e então, submetidas à eletroforese em Polímero 3100 POP-6™ (Applied Biosystems®), utilizando seqüenciador automático ABI PRISM modelo 3100 (Applied Biosystems®).

3.10 Alinhamento das seqüências do gene G

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas com o programa *Sequence Navigator* versão 1.0 (Applied Biosystems®) obtendo-se um *contig* de 270 ou 330 nucleotídeos correspondente à segunda região variável do gene codificador da glicoproteína G, designada como G2, que compreende os nucleotídeos 649-918 para o grupo A e 652-921 para o grupo B.

As sequências obtidas foram identificadas como pertencentes ao grupo A ou B. As seqüências do grupo B foram alinhadas com o protótipo BA4128_99,

pertencente ao genótipo BA, (TRENTO et al., 2003) utilizando o programa SeAl, *Sequence Alignment Editor* (RAMBAUT e CHARLESTON, 2001). As seqüências que apresentavam a duplicação de 60 nt, característica deste genótipo, eram selecionadas para as análises subsequentes.

As seqüências selecionadas foram alinhadas com seqüências obtidas de banco de dados, *GeneBank*, obtendo-se 2 *data sets*, um deles somente com amostras brasileiras, denominado Brasil, e outro contendo as amostras de todo o mundo, denominado global.

Para construção do *data set* Brasil foram utilizadas 104 amostras genotipadas como BA, colhidas na Cidade de São Paulo entre os anos de 2001 a 2009 referentes a este estudo, 108 seqüências do Estado de São Paulo obtidas do *GeneBank*, e 16 seqüências oriundas do Ceará, referente aos anos de 2004 (3 seqüências), 2005 (1 seqüência), 2006 (2 seqüências), 2007 (6 seqüências) e 2008 (4 seqüências), gentilmente cedidas pela Dra. Fernanda Moura (Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará), totalizando um *data set* com 228 seqüências (lista das seqüências e n. de acesso no *GeneBank* estão representados no Anexo B).

Para a avaliação da evolução e circulação do genótipo BA no mundo, foi preparado um *data set* global contendo 188 seqüências obtidas do *GeneBank* de diversas regiões do mundo, 5 seqüências oriundas do Chile, colhidas no ano de 2003, gentilmente cedidas pela Dra. Vivian Luchsinger (Instituto de Ciências Biomédicas da Faculdade de Medicina da Universidade do Chile) além das 228 seqüências brasileiras contidas no *data set* Brasil, acima descrito, totalizando 421 seqüências (lista das seqüências e n. de acesso no *GeneBank* estão representados no Anexo B).

Cada um dos *data sets* foi analisado pelo programa *Meg Align*TM 4.05 - *Expert Analysis Software* - DNASTAR, Inc., EUA para Windows, tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as seqüências, calculadas par a par, o que possibilitou a identificação das seqüências de nucleotídeos idênticas. Com o intuito de otimizar as análises subsequentes, tomou-se, aleatoriamente, apenas uma amostra de cada grupo de seqüências idênticas (Anexo C e D).

Os alinhamentos finais foram convertidos no formato *Nexus* e submetidos às análises filogenéticas posteriores.

3.11 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas empregando o critério de Máxima Verossimilhança, utilizando o programa *PAUP**4.0 versão Beta - *Sinauer Associates, Inc*, (SWOFFORD, 1998). Inicialmente realizou-se, com cada um dos *data sets*, o teste de razão de verossimilhança para a escolha do modelo evolutivo a ser utilizado, com auxílio do programa *Modeltest* versão 3.06 (David Posada, Department of Zoology, Brigham Young University, USA). Depois de escolhido o modelo, foi realizada uma busca heurística com o algoritmo de *neighbor joining*. Foram calculados os valores de *bootstrap* com 500 réplicas para verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas (FELSENSTEIN et al., 1985).

4 RESULTADOS

4.1 Triagem das amostras de HRSV

As 2805 amostras colhidas entre os anos de 2006 e 2009 de pacientes atendidos no Hospital Universitário da USP (2006 a 2008) e na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (2008 a 2009) foram submetidas às técnicas de RT-PCR *GeneScan* ou IFI, seguindo as metodologias descritas nas seções 3.5.1 e 3.5.2, respectivamente. Do total de 1365 amostras colhidas entre os anos de 2006 a 2007 e analisadas por *GeneScan*, 424 (31,1%) foram positivas para o HRSV e do total de 1440 amostras colhidas em 2008 e 2009 e analisadas por IFI, 419 (29,1%) foram positivas para o HRSV. As 1469 amostras colhidas entre os anos de 2001 a 2005 foram previamente triadas e caracterizadas por Botosso et al. (2009), sendo 588 (40%) positivas para o HRSV.

Portanto, das 4274 amostras colhidas durante 9 anos consecutivos, 2001 a 2009, 1431 (33,5%) foram positivas para o HRSV, distribuídas, ano a ano, conforme descrito na tabela 5.

4.2 RT-PCR e RT *Nested* PCR

A amplificação das amostras pela RT-PCR foi realizada conforme metodologia descrita na seção 3.6 e gerou um produto de PCR com aproximadamente 920 *pb* para o grupo A e 923 *pb* para o grupo B. A amplificação das amostras pela *Nested* PCR gerou um produto com tamanho de aproximadamente 489 bp para amostras do grupo A e de 492 pb para amostras do grupo B. Os produtos de PCR e *Nested* PCR das amostras do genótipo BA apresentaram tamanho de 973 *pb* e 552 *pb* respectivamente (Figura 20).

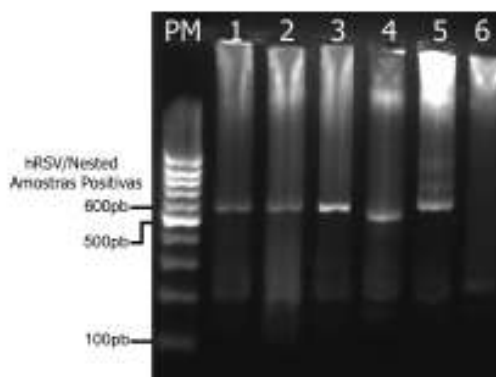


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos da *Nested* PCR do gene G do HRSV. Colunas: PM - Marcador de peso molecular de 100 pb; 1, 2, 3 e 5: amostras de HRSV do genótipo BA; 4: amostra de HRSV do grupo B sem inserção de 60 nucleotídeos no gene G; 6: Controle Negativo (Água).

As 843 amostras positivas para HRSV entre os anos de 2006 a 2009 foram submetidas à amplificação, seguido de sequenciamento do gene G. As sequências obtidas foram alinhadas, utilizando o programa *SeAl*, com a sequência protótipo do genótipo BA (BA4128_99B - *GeneBank* n. acesso AY333364) e aquelas pertencentes ao grupo B, nas quais foram verificadas a presença da duplicação de 60 nt, coincidente à amostra protótipo, foram selecionadas para as análises subsequentes.

Do total de 154 amostras sequenciadas durante os anos de 2006 a 2009, 60 pertenciam ao grupo B (39%) e destas 52 foram classificadas como BA, o que representa 34% do total de amostras sequenciadas e 87% das amostras do grupo B, distribuídas no decorrer dos anos (tabela 5).

Entre 2001 e 2005 as amostras foram genotipadas conforme Botosso et al. (2009) e sua distribuição no decorrer dos anos está demonstrada na tabela 5.

Verificamos a co-circulação dos dois grupos no decorrer dos anos, com prevalência do grupo B nos anos de 2001, 2005, 2006 e 2009. O genótipo BA foi detectado em todos os anos desde a sua primeira descrição na cidade de São Paulo em 2001 (BOTOSSO et al., 2009), à exceção de 2002 e 2007. Verificamos que o genótipo BA teve maior prevalência nos anos de 2005, 2006, 2008 e 2009, quando correspondeu a 100, 95,6, 100 e 89,2%, respectivamente, dentre as amostras do grupo B circulantes.

Tabela 5- Número de amostras colhidas, positivas para HRSV, seqüenciadas, pertencentes ao grupo A, B e genótipo BA do HRSV (ano a ano) referente ao período de janeiro de 2001 a dezembro de 2009 na Cidade de São Paulo.

Ano	Nº Amostras colhidas	Nº Amostras HRSV Positivas	N. amostras seqüenciadas (%)	Grupo A (%)*	Grupo B (%)**	Genótipo BA (%)&
#2001	115	30 (26)	17 (56)	4 (30,7)	13 (76,3)	2 (15,3)
#2002	172	53 (30.8)	45 (85)	33 (73,3)	12 (26,6)	0 (0)
#2003	336	81 (24)	43 (53)	38 (88)	5 (12)	2 (40)
#2004	438	187 (42.6)	53 (28)	45 (85)	8 (15)	1 (12,5)
§2005	408	237 (58)	55 (23.2)	8 (12,5)	20+27 (85.4)	47 (100)
2006	522	184 (35)	38 (20,6)	15 (39,5)	23 (60,5)	22 (95.6)
2007	843	240 (28.4)	28 (11,6)	24 (85,7)	4 (14,3)	0 (0)
2008	1001	323 (32.3)	55 (17)	50 (90)	5 (10)	5 (100)
2009	439	96 (21.9)	33 (34,3)	5 (15)	28 (84.8)	25 (89.2)
TOTAL	4274	1431	367	222	145	104

- Dados retirados de Botosso et al. (2004, 2006, 2009).

§ - Do total de 47 amostras BA, 25 foram retirados de Botosso et al. (2009).

* porcentagem de amostras HRSV-A dentre as amostras seqüenciadas

** porcentagem de amostras HRSV-B dentre as amostras seqüenciadas

& porcentagem de amostras HRSV-B pertencentes ao genótipo BA dentre as amostras do grupo B.

4.3 Sequências de aminoácidos

Pela análise do grau de similaridade entre as sequências, calculadas par a par, foi possível identificar dentre as 228 sequências do *data set* Brasil (Anexo C), 24 grupos de sequências idênticas, das quais uma foi selecionada aleatoriamente para as análises subseqüentes. Dessa forma, apenas 123 sequências que apresentaram pelo menos uma alteração de estado de caráter foram submetidas às análises filogenéticas.

As sequências de nucleotídeos foram traduzidas e o alinhamento das seqüências de aminoácidos (aa) correspondente a região G2 do gene G do HRSV está representado na figura 21.

Posição do aa	213	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
BA4128_99B	KRDPKTLAKT	IKKE--TTINPT	-KK-PTPKTTE	RDHSTPQSTV	LDTTTSKHTI	RDSTSQSIV	LDTTTSKHTI	QQQLYSTTP	ENTPNSTQTP	TASEPSTNS	T*KL*SYA*
BR42_2001P.....P.....T.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR105_2003IP.....P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR140_2003P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR93_2004P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR CE 168_04P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR CE 316_04P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR40_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR41_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR56_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR100_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR102_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR115_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR149_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR188_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR216_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR221_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR236_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR249_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR259_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR293_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR307_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR319_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
BR326_2005P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
ITA IAL_183_05PT.....T.....N.....T.....N.....T.....N.....K.....K.....K.....Q.....
ITA IAL_186_05P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
ITA IAL_190_05P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
ITA IAL_217_05P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
ITA IAL_298_05P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
ITA IAL_300_05T.....P.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....
JU IAL_248_05P.....T.....P.....P.....P.....P.....P.....H.....H.....H.....Q.....

Figura 21: Representação do alinhamento das seqüências de aminoácidos das 121 amostras representativas do *data set* Brasil, descrito na seção 3.10.1, pertencentes ao genótipo B com inserção de 60 nucleotídeos contendo as amostras dos Estados de São Paulo e Ceará. A primeira linha da tabela mostra a posição dos aminoácidos na proteína. A primeira seqüência da tabela, em negrito, refere-se ao protótipo do HRSV com inserção de 20 aminoácidos na região G2 da proteína G. Os quadros vermelhos referem-se à seqüência duplicada de aminoácidos (posição 240-279). Somente os aminoácidos distintos do protótipo são demonstrados nas linhas subsequentes.

Posição do aa	213	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
BA4128 99B	KRDPKTLIAKT	LKKE--TTINPT	-KK-PTPKITE	RDSTPQSTV	LDTTTSKHT	RDTSTQSIV	LDTTTSKHT	QQSLYSTTP	ENTPNSTQTP	TASEPSTNS	T*KL*SYA*
JU IAL 311 05				.G.							.Q.
JU IAL 317 05		P.				L.	A.		F.		.Q.
JU IAL 335 05		R.									.Q.
RP103 05		P.				A.					F.Q.
RP108 05		P.		S.		A.					.Q.
RP161 05				.G.		P.					.Q.
RP193 05		P.	KE.			A.					.Q.
SP IAL 074 05		PT.				T.	N.		D.		.Q.
SP IAL 089 05		P.				TA		H.			.Q.
SP IAL 113 05				K.		P.	T.		FH.		.Q.
SP IAL 118 05		PT.	P.	E.		PT.	N.		D.		.Q.
SP IAL 181 05		PT.				T.	N.		D.		.Q.
SP IAL 223 05		P.				A.					A.Q.
SP IAL 230 05		P.				TA		H.			.Q.
SP IAL 275 05		S.			L.			H.			NQ.
SP IAL 341 05											.Q.
SP IAL 368 05		P.				A.					.Q.
SP IAL 417 05		P.				P.	A.		H.		.Q.
SP IAL 423 05		P.				A.					.Q.
SP IAL 426 05		P.				A.					.Q.
BR564 2006		P.								K.	.Q.
BR609 2006		P.			L.						.Q.
BR611 2006		P.				A.			I.	ND.	F.
BR618 2006		P.				A.					IQ.
BR636 2006		P.				A.					.Q.
BR655 2006		P.				A.					.Q.
BR667 2006		P.				A.					V.
BR676 2006		P.				A.					.Q.
BR691 2006		P.				P.	TA	P.			C.
BR1040 2006		P.			L.						P.
BR1077 2006		P.				A.					.Q.
BR1257 2006		P.				P.	TA	P.			.Q.

Figura 21: Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos das 121 amostras representativas do *data set* Brasil, descrito na seção 3.10.1, pertencentes ao genótipo B com inserção de 60 nucleotídeos contendo as amostras dos Estados de São Paulo e Ceará. A primeira linha da tabela mostra a posição dos aminoácidos na proteína. A primeira sequência da tabela, em negrito, refere-se ao protótipo do HRSV com inserção de 20 aminoácidos na região G2 da proteína G. Os quadros vermelhos referem-se à sequência duplicada de aminoácidos (posição 240-279). Somente os aminoácidos distintos do protótipo são demonstrados nas linhas subsequentes.

Posição do aa	213	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313	
BA4128_99B	KRDPKTLAKT	LKKE--TTINPT	-KK-PTPKT	TE	RDTSTPQSTV	LDTTTSKHTE	RDTSTSQSIV	LDTTTSKHFI	QQQSLYSTTP	ENTPNSTQTP	TASEPSTSNS	T*KL*SYA*
BR1265_2006	P	P	P	L	P	A	P	A	P	P	P	Q
BR1281_2006	T	P	P	P	P	A	P	A	P	P	P	Q
BR1372II_06	P	P	N	P	P	A	P	A	P	P	P	Q
BR1380_2006	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Q
BR CE 337_06	P	P	P	A	P	A	P	A	P	P	P	Q
BR CE 358_06	P	P	P	P	P	A	P	A	P	L	P	Q
JU IAL 667_06	P	P	P	P	P	A	P	A	P	P	P	Q
JU IAL 1042_06	P	P	P	P	P	TA	P	H	P	P	P	Q
JU IAL 1185_06	P	P	P	P	P	A	P	A	P	P	P	Q
RP103_05	P	P	P	P	P	A	P	A	P	P	P	F.Q
RP108_05	P	P	P	S	P	A	P	A	P	P	P	Q
RP161_05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Q
RP193_05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Q
SP IAL 074_05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Q
SP IAL 089_05	P	P	P	P	P	PT	T	N	P	D	K	Q
SP IAL 113_05	P	P	P	P	P	P	TA	P	H	P	P	Q
SP IAL 118_05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	S	Q
SP IAL 181_05	P	P	P	P	P	PT	T	N	P	D	K	Q
SP IAL 223_05	P	P	P	P	P	PT	T	N	P	D	K	Q
SP IAL 230_05	P	P	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A
SP IAL 275_05	P	P	P	P	P	P	TA	P	H	P	P	Q
SP IAL 341_05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	NQ
SP IAL 368_05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Q
SP IAL 417_05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Q
SP IAL 423_05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Q
SP IAL 426_05	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	Q
BR564_2006	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	K	Q
BR609_2006	P	P	P	P	P	P	L	P	P	P	P	Q
BR611_2006	P	P	P	P	P	P	P	P	P	I	ND...F	Q
BR618_2006	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	IQ

Figura 21: Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos das 121 amostras representativas do *data set* Brasil, descrito na seção 3.10.1, pertencentes ao genótipo B com inserção de 60 nucleotídeos contendo as amostras dos Estados de São Paulo e Ceará. A primeira linha da tabela mostra a posição dos aminoácidos na proteína. A primeira sequência da tabela, em negrito, refere-se ao protótipo do HRSV com inserção de 20 aminoácidos na região G2 da proteína G. Os quadros vermelhos referem-se à sequência duplicada de aminoácidos (posição 240-279). Somente os aminoácidos distintos do protótipo são demonstrados nas linhas subsequentes.

Posição do aa	213	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
BA4128_99B	KRDPKTIAKT	LKKE--TTINPT	-KK-PFPKTI	TE	LDTTTSKHHTE	RDTSIQSIV	LDTTTSKHHTE	QQSLYSHTP	ENTPNSTQTP	TASEPSTNS	T*KL*SYA*
BR636_2006PPPGAAAQQQQ
BR655_2006	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....Q	.K.....Q	.K.....V	.K.....Q
BR667_2006	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.K.....Q	.K.....Q	.K.....V	.K.....Q
BR676_2006PPPPPPPQQVQ
BR691_2006PPPPPPPQQCQ
BR1040_2006PPPLLLLQQFQ
BR1077_2006PPPPPPPQQFQ
BR1257_2006PPPLLLLQQFQ
BR1265_2006PPPLLLLQQFQ
BR1281_2006TPPPPPPQQFQ
BR1372II_06PPNPPPPQQFQ
BR1380_2006PPPPPPPQQFQ
BR CE 337_06PPPAAAAQQLQ
BR CE 358_06PPPPPPPQQLQ
JU IAL 667_06PPPPPPPQQLQ
JU IAL 1042_06PPPPPPPQQLQ
JU IAL 1185_06PPPPPPPQQLQ
SP IAL 1218_06PPEPPPPPQQLQ
BR CE 205_2007PPPLLLLQQFQ
BR CE 210_2007PPPPPPPQQFQ
BR CE 214_07PPPAAAAQQFQ
BR CE 239_07VPPLLLLQQFQ
BR CE 291_07	.K.....P	.K.....P	.K.....P	.Y.....P	.Y.....P	.Y.....P	.Y.....PQQFQ
SP IAL 1763_07PPPPPPPQQFQ
SP IAL 1787_07PPPPPPPQQFQ
BR2878_2008PPPIIIIQQFQ
BR2928_2008PPPIIIIQQFQ
BR3133_2008PPPPPPPQQFQ
BR3296_2008	.K.....P	.K.....P	.K.....PRRRRQQSQ
BR CE 228_08PPDPPPPQQHQ
BR CE 237_08PPPPPPPQQHQ
BR CE 305_08PPPPPPPQQHQ

Figura 21: Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos das 121 amostras representativas do *data set* Brasil, descrito na seção 3.10.1, pertencentes ao genótipo B com inserção de 60 nucleotídeos contendo as amostras dos Estados de São Paulo e Ceará. A primeira linha da tabela mostra a posição dos aminoácidos na proteína. A primeira sequência da tabela, em negrito, refere-se ao protótipo do HRSV com inserção de 20 aminoácidos na região G2 da proteína G. Os quadros vermelhos referem-se à sequência duplicada de aminoácidos (posição 240-279). Somente os aminoácidos distintos do protótipo são demonstrados nas linhas subsequentes.

Posição do aa	213	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
BA4128 99B	KRDPKTLAKT LKKE--TTINPT -KK-PTPKTTE	RDTSTPQSTV LDTTTSKHTI	RDTSTQSI V LDTTTSKHTI	QQQLSYSTTP	ENTPNSTQTP	TASEPSTNS	T*KL*SYA*				
BR3836 2009	.G.....H.....R.....P.....GPL...A.....F.....Q.....					
BR3892 2009	P.....A.....L.S.....Q.....					
BR3909 2009	P.....A.....Q.Q.....					
BR3921 2009	P.....A.....Q.Q.....					
BR3924 2009	P.....I.....Q.Q.....					
BR3929 2009	P.....P.A.P.....H.....Q.....					
BR3936 2009	P.....L.A.....F.....Q.....					
BR3937 2009	P.....C.....A.....P.....Q.....					
BR3942 2009	P.....A.....L.....Q.....				
BR3945 2009	P.....Q.....					
BR3950 2009	P.....M.....A.....L.....Q.....					
BR3952 2009	P.....S.....Q.....					
BR3974 2009	P.....R.....P.T.....G.....Q.....					
BR3979 2009	P.....A.....L.....Q.....					
BR3995 2009	P.....A.....L.....Q.....					
BR4025 2009	P.....A.....L.....Q.....					
BR4058 2009	P.....T.....A.....L.....FQ.....					
BR4101 2009	P.....G.....P.A.P.....H.....Q.....					
BR4463 2009	.G.....P.A.....H.L.....Q.....					
BR4466 2009	P.R.....I.....S.....D.....Q.....				
BR4670 2009	P.....L.A.....F.....Q.....					

Figura 21: Representação do alinhamento das seqüências de aminoácidos das 121 amostras representantes do *data set* Brasil, descrito na seção 3.10.1, pertencentes ao genótipo B com inserção de 60 nucleotídeos contendo as amostras dos Estados de São Paulo e Ceará. A primeira seqüência da tabela mostra a posição dos aminoácidos na proteína. A primeira seqüência da tabela, em negrito, refere-se ao protótipo do HRSV com inserção de 20 aminoácidos na região G2 da proteína G. Os quadros vermelhos referem-se à seqüência duplicada de aminoácidos (posição 240-279). Somente os aminoácidos distintos do protótipo são demonstrados nas linhas subsequentes.

Verificamos no alinhamento que algumas substituições que ocorreram em relação ao protótipo, fixaram-se no decorrer do tempo. Como por exemplo, a substituição Leu223Pro (leucina para prolina) ocorrida, inicialmente em 2003 que se manteve fixa em praticamente todos os isolados a partir de 2005, assim como a substituição Val271Ala (valina para alanina), ocorrida em 2004, presente na maioria das amostras de 2005 e fixando-se a partir de 2006. Interessante ressaltar que algumas dessas substituições reverteram ao aminoácido inicial nos anos de 2008 e 2009.

Algumas amostras apresentaram outras inserções além da inserção de 60 nucleotídeos. A amostra BR93_2004 isolada na cidade de São Paulo em 2004 apresentou a inserção de uma treonina na posição 232, a amostra SP_IAL_691_06, também isolada na cidade de São Paulo, apresentou uma inserção de Isoleucina na posição 232 e a amostra de RP193_05 isolada na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, apresentou duas inserções de nucleotídeos seguidos - Lisina e Glutamato na posição 226 da sequência protótipo (Figura 21).

Em algumas seqüências foram observadas alterações no *stop codon*, sendo verificadas proteínas com tamanho variando entre 312 a 319 aminoácidos. No geral, as amostras mais antigas (2001 a 2005) apresentaram proteínas de 315 aminoácidos (2003/2004 e 2005) ou 319 aminoácidos (ano de 2001) e as mais recentes 312 aminoácidos (Figuras 21 e 22).

Posição do aa	293	303	313	
BA4128_99B	ENTPNSTQTP	TASEPSTSNS	T*KL*SYA*	312 aa
BR42_2001Q..Q....	319 aa
BR105_2003	...T.....Q.....	315 aa
BR140_2003Q..Q....	319 aa
BR93_2004Q.....V.	315 aa
BR40_2005Q....	312 aa

Figura 22: Alterações de *stop codons* com consequentes alterações no tamanho da proteína G das amostras brasileiras. A primeira linha da tabela mostra a posição dos aminoácidos na proteína. A primeira seqüência da tabela, em negrito, refere-se ao protótipo do HRSV com inserção de 20 aminoácidos na região G2 da proteína G. Somente os aminoácidos distintos do protótipo são demonstrados nas linhas subsequentes.

Duas amostras isoladas no Ceará (BR_CE_168_2004 e BR_CE_225_2004) foram idênticas ao protótipo BA, isolado na Argentina em 1999, e a um isolado em 2003, no Quebec, Canadá (QUE_82_02_03), ou seja, não apresentaram nenhuma alteração de aminoácidos e nucleotídeos na região duplicata.

A análise de aminoácidos do fragmento anterior à duplicação (aminoácidos 240 a 259) (tabela 6), ou seja, no segmento que originou a duplicação, mostrou que 20% das amostras (n = 25) apresentaram substituições de aminoácidos, sendo que 22 apresentaram uma única alteração de aminoácido cada e as 3 restantes apresentaram duas substituições de aminoácidos cada.

Analisando o fragmento duplicado (aminoácidos 261 a 279) (tabela 6), observamos que das 123 sequências brasileiras, 83,6% (n=102) apresentaram substituições de aminoácidos, sendo que 65 amostras apresentaram uma única substituição de aminoácidos, 22 apresentaram 2 substituições, 10 apresentaram 3 substituições e 5 apresentaram quatro substituições.

Na tabela 6 também estão representadas (em cores) as alterações de aminoácidos conservativas e não conservativas em relação ao protótipo, ou seja, substituição de um aminoácido por outro que pertença a um grupamento químico diferente. A relação de aa, siglas e grupos químicos a qual pertencem estão no apêndice deste trabalho.

Tabela 6- Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína G do HRSV do data set Brasil (Estados de São Paulo e Ceará) com o protótipo BA4128_99B (1ª seqüência da tabela). As cores indicam a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade dos radicais R: Verde = apolar; Vermelho = neutro, Azul = básico; Lilás = ácidos. (continua)

NOME / POSIÇÃO	213 a 225	226 a 239	240 a 259	260 a 279	281 a 305	306 a 315	316 a 320
BA4128_99B							
BR42_2001				S267→P, I270→T	Y297→H	*313→Q	*316→Q
BR105_2003		I229→T			P295→T	*313→Q	
BR140_2003	T218→I, L219→P, L223→P			S267→P, I270→T, T276→P	Y287→P	*313→Q	*316→Q
BR93_2004	L219→P	-232→T		S267→P, I270→T, S277→P	Y287→H	*313→Q	
BR_CE_168_2004							
BR_CE_316_2004	L219→P, L223→P			S267→P, I270→T, V271→A, L272→P	Y287→H	*313→Q	*316→Q
BR40_2005	L223→P						
BR41_2005	L219→P			S269→P, I270→T		*313→Q, K97→Q	*316→Q, S317→P
BR56_2005			R242→K	S267→P, I270→T, T280→A	L286→F, Y287→H, P301→S	*313→Q	*316→Q
BR100_2005	L223→P			V271→A	Y287→H		
BR102_2005			D253→G			P306→S, *313→Q	
BR115_2005	L223→P		P247→S	V271→A			
BR149_2005	L223→P			V271→A	Y287→H		
BR188_2005	T218→A, L223→P			V271→A			
BR216_2005	L223→P			S267→L, V271→A	S297→F		

Tabela 6- Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína G do HRSV do *data set* Brasil (Estados de São Paulo e Ceará) com o protótipo BA4128_99B (1ª seqüência da tabela). As cores indicam a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade dos radicais R: Verde = apolar; Vermelho = neutro, Azul = básico; Lilás = ácidos. (continuação)

NOME / POSIÇÃO	213 a 225	226 a 239	240 a 259	260 a 279	281 a 305	306 a 315	316 a 320
BR221_2005	L223→P		V251→A	V271→A			
BR259_2005	L223→P			V271→A			
BR236_2005	L223→P			V271→T			
BR249_2005	L223→P		T255→I	V271→A			
BR293_2005	L223→P			V271→A			
BR307_2005	L223→P			V271→A		S309→P	
BR319_2005	L223→P			V271→A	Y287→H	*313→Q	*316→Q
BR326_2005						*313→Q	
ITA_IAL_183_05	L219→P, A220→T			I270→T, D273→N	E292→N E305→K	*313→Q	
ITA_IAL_186_05	L223→P						
ITA_IAL_190_05	L223→P					*313→Q, L→215I	*316→L
ITA_IAL_217_05	L223→P			V271→A	L286→P		
ITA_IAL_298_05	L223→P			V271→A			
ITA_IAL_300_05	A220→T, L223→P			V271→A			
JU_IAL_248_05	L223→P			V271→A,		S307→F	
JU_IAL_311_05			D253→G			*313→Q	
JU_IAL_317_05	L223→P			S267→L, V271→A	S297→F		
JU_IAL_335_05	K225→R					*313→Q	
RP103_05	L223→P			V271→A			
RP108_05	L223→P		P247→S	V271→A			
RP161_05			D253→G	S267→P		*313→Q	*316→Q

Tabela 6- Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína G do HRSV do *data set* Brasil (Estados de São Paulo e Ceará) com o protótipo BA4128_99B (1ª seqüência da tabela). As cores indicam a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade dos radicais R: Verde = apolar; Vermelho = neutro, Azul = básico; Lilás = ácidos. (continuação)

NOME / POSIÇÃO	213 a 225	226 a 239	240 a 259	260 a 279	281 a 305	306 a 315	316 a 320
RP193_05	L223→P		-226→KE	V271→A			
SP_IAL_074_05	L219→P, A220→T			I270→T	E292→D, E305→K	*313→Q	
SP_IAL_089_05	L223→P			I270→T, V271→A	Y287→H		
SP_IAL_113_05		R242→K			L286→F, Y287→H, P301→S	*313→Q	*316→Q
SP_IAL_118_05	L219→P, A220→T, L223→P	K234→E		I270→T, D273→N	E292→D, E305→K	*313→Q	*316→Q; *320→Q
SP_IAL_181_05	L219→P, A220→T		D253→N	I270→T, D273→N	E292→D, E305→K	*313→Q	
SP_IAL_223_05	L223→P			V271→A		T312→A	
SP_IAL_230_05	L223→P			I270→T, V271→A	Y287→H	*313→Q	*316→Q
SP_IAL_275_05	P216→S		P247→L		Y287→H	T312→N, *313→Q	
SP_IAL_341_05						*313→Q	
SP_IAL_368_05	L223→P			V271→A			
SP_IAL_417_05	L223→P			S267→P, V271→A	Y287→H		
SP_IAL_423_05	L223→P			V271→A			
SP_IAL_426_05	L223→P			V271→A		*313→Q	
BR564_2006	L223→P				E305→K		
BR609_2006	L223→P		Q248→L				
BR611_2006	L223→P			V271→A			T→290I E292→N, N293→D, S297→F

Tabela 6- Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína G do HRSV do *data set* Brasil (Estados de São Paulo e Ceará) com o protótipo BA4128_99B (1ª seqüência da tabela). As cores indicam a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade dos radicais R: Verde = apolar; Vermelho = neutro, Azul = básico, Amarelo = ácido.

NOME / POSIÇÃO	213 a 225	226 a 239	240 a 259	260 a 279	281 a 305	306 a 315	316 a 320
BR618_2006	L223→P			V271→A			
BR636_2006	L223→P			E261→G, V271→A			
BR655_2006	R214→K, L223→P			V271→A			
BR667_2006	R214→K, L223→P			V271→A		S307→V	
BR676_2006	L223→P			V271→A			
BR691_2006	L219→P, L223→P			S267→P, I270→T, V271→A, L272→P	Y287→H	S307→C	
BR1040_2006	L223→P		Q248→L			S311→P	
BR1077_2006	L223→P			V271→A			
BR1257_2006	L219→P, L223→P			S267→P, I270→T, V271→A, L272→P	Y287→H		
BR1265_2006	L223→P		P247→L	V271→A			
BR1281_2006	A220→T, L220→P	T227→P		V271→A			
BR1372II_2006	L223→P	T228→N		V271→A			
BR1380_2006	L223→P						
BR_CE_337_2006	L223→P		V251→A	V271→A			
BR_CE_358_2006	L223→P			V271→A		S309→L,	
JU_JAL_667_06	L223→P						

Tabela 6- Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína G do HRSV do *data set* Brasil (Estados de São Paulo e Ceará) com o protótipo BA4128_99B (1ª seqüência da tabela). As cores indicam a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade dos radicais R: Verde = apolar; Vermelho = neutro, Azul = básico; Lilás = ácidos.

NOME / POSIÇÃO	213 a 225	226 a 239	240 a 259	260 a 279	281 a 305	306 a 315	316 a 320
JU_IAL_1042_06	L223→P			I270→T, V271→A	Y287→H	*313→Q	*316→Q
JU_IAL_1185_06	L223→P			T266→A, V271→A			
RP023_06	L223→P			V271→A, D273→E			
RP043_06	L223→P			V271→A			
RP045_06	L223→P			V271→A			
RP049_06	K221→N, L223→P			V271→A			
RP062_06	L223→P			V271→A			
RP189_06	L223→P	E226→G, T239→I					
SP_IAL_691_06	L223→P	-232→I		V271→A			
SP_IAL_779_06	L223→P		T246→A	V271→A			
SP_IAL_876_06	L219→P, L223→P			V271→A			
SP_IAL_900_06	K221→R, L223→P			V271→A			
SP_IAL_956_06	L223→P, T228→A, I229→F			V271→A			
SP_IAL_974_06	L223→P			T266→A, V271→A, T274→K			

Tabela 6- Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína G do HRSV do *data set* Brasil (Estados de São Paulo e Ceará) com o protótipo BA4128_99B (1ª seqüência da tabela). As cores indicam a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade dos radicais R: Verde = apolar; Vermelho = neutro, Azul = básico; Lilás = ácidos.
(continuação)

NOME / POSIÇÃO	213 a 225	226 a 239	240 a 259	260 a 279	281 a 305	306 a 315	316 a 320
SP_IAL_1018_06	L223→P		D253→N	V271→A	E305→K		
SP_IAL_1066_06	L223→P			V271→A	*313→Q	*316→Q	
SP_IAL_1189_06	K213→E, L223→P			V271→A	*313→Q	*316→Q	
SP_IAL_1196_06	L223→P			V271→A	*313→Q	*316→Q	
SP_IAL_1218_06	L219→P, L223→P, K224→E			S267→P, I270→T V271→A, L272→P	Y287→H		
BR_CE_205_2007	L223→P		P247→L	S267→L, V271→A	S288→T, S297→F		
BR_CE_210_2007	L223→P			V271→A			
BR_CE_214_2007	L223→P		T255→A	V271→A	*313→Q	*316→Q	
BR_CE_239_2007	A220→V, L223→P			S267→L, V271→A	S297→F		
BR_CE_291_2007	R214→K, L223→P	D243→Y		D263→Y, V271→A			
SP_IAL_1763_07	L223→P, L223→P			V271→A			
SP_IAL_1787_07	L219→P			V271→A			
BR2878_2008	L223→P	T244→I	T246→A	V271→A			

Tabela 6- Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína G do HRSV do *data set* Brasil (Estados de São Paulo e Ceará) com o protótipo BA4128_99B (1ª seqüência da tabela). As cores indicam a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade dos radicais R: Verde = apolar; Vermelho = neutro, Azul = básico; Lilás = ácidos.

(continuação)

NOME / POSIÇÃO	213 a 225	226 a 239	240 a 259	260 a 279	281 a 305	306 a 315	316 a 320
BR2928_2008	L223→P	T244→I	T246→A, V251→A	S267→P, I270→T, V271→A	Y287→H		
BR3133_2008	L223→P			T264→P, S267→L, V271→A	S297→F		
BR3296_2008	R19→K, L223→P		K258→R	T264→P, S267→L, V271→A		P306→S	
BR_CE_228_2008	L223→P	E226→D			E292→G		
BR_CE_237_2008	L223→P			V271→A			
BR_CE_305_2008	L223→P			V271→A			
BR3836_2009	R214→G	N230→H, K238→R	T256→P, T246→P	S265→G, T266→P, S267→L, V271→A	S297→F		
BR3892_2009	L223→P			V271→A	N293→S		
BR3909_2009	L223→P			V271→A		*313→Q	*316→Q
BR3921_2009	L223→P			V271→A			
BR3924_2009	L223→P	T236→I				*313→Q	*316→Q
BR3929_2009	L223→P			S267→P, V271→A, L272→P	Y287→H,		
BR3936_2009	L223→P			S267→L V271→A	S297→F		
BR3937_2009	L223→P		S249→C	S257→A, V271→A, T275→A	S288→P		

Tabela 6- Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína G do HRSV do *data set* Brasil (Estados de São Paulo e Ceará) com o protótipo BA4128_99B (1ª seqüência da tabela). As cores indicam a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade dos radicais R: Verde = apolar; Vermelho = neutro, Azul = básico; Lilás = ácidos.

NOME / POSIÇÃO	213 a 225	226 a 239	240 a 259	260 a 279	281 a 305	306 a 315	316 a 320
BR3942_2009	L223→P			V271→A		P306→L	
BR3945_2009	L223→P						
BR3950_2009	L223→P	K238→M		V271→A	P291→L		
BR3952_2009	L223→P				T288→S		
BR3974_2009	L223→P	K234→R	L251→P	S267→P, I271→T	E292→G		
BR3979_2009	L223→P			V271→A		P306→L	
BR3995_2009	L223→P			V271→A		P306→L	
BR4025_2009	L223→P			V271→A	P291→L		
BR4058_2009	L223→P	I229→T		V271→A		P306→L	
BR4101_2009	K213→Q, L223→P	S245→G		S267→P, V271→A, L272→P	Y287→H	*313→Q	*316→Q
BR4463_2009	R214→G, L223→P			S267→P, V271→A	Y287H, P291→L		
BR4466_2009	L223→P	E226→R		T260→I	T288→S, E305→D		
BR4670_2009	L223→P			S267→L, V271→A	S297→F		

Nas seqüências analisadas ocorreram 74 mudanças não conservativas em relação ao protótipo utilizado na comparação (BA4128_99B).

Analisando o número de mudanças não conservativas nas seqüências estudadas, obtivemos as seguintes modificações descritas na tabela 7.

Tabela 7- Modificação de aminoácidos correspondente a região G2 do gene G do HRSV genótipo BA de amostras brasileiras colhidas entre 2001 e 2009, localização e tipos de mudanças quanto ao grupo químico. As cores indicam a classificação dos aminoácidos segundo a polaridade dos radicais R: Verde = apolar; Vermelho = neutro; Azul = básico; Lilás = ácido.

Posição das mudanças não conservativas de aminoácidos	Nº de mudanças
K213→Q, K221→N	2 básico → neutro
R214→G, K238→M	2 básico → apolar
K234→E, K213→E, K224→E	3 básico → ácido
Y287→H, N230→H, Y297→H, T274→K	4 neutro → básico
N293→D	1 neutro → ácido
T218→A, T218→I, T227→P, T228→A, T236→I, T239→I, T244→I, S245→G, T246→P, T246→A, Q248→L, T255→A, T255→I, T256→P, S257→A, T260→I, T264→P, S265→G, T266→P, T266→A, S267→L, S267→P, T275→A, T276→P, S277→P, T280→A, Y287→P, S288→P, S297→F, S307→F, S307→V, S309→L, S309→P, S311→P, T312→A, S317→P, S397→F	37 neutro → apolar
D263→N, D263→Y, E292→N, D273→N, D243→Y	5 ácido → neutro
E226→R, E305→K	2 ácido → básico
D253→G, E261→G, E292→G, E305→K, E226→G	5 ácido → apolar
P216→S, A220→T, I229→T, P237→S, P247→S, P247→L, I270→T, I271→T, I273→T, P291→L, P295→T, P301→S, P306→S	13 apolar → neutro

4.4 Análises Filogenéticas

As 123 sequências representativas do genótipo BA envolvendo 330 nucleotídeos da região carboxila-terminal do gene G foram analisadas pelo critério de Máxima Verossimilhança. O modelo de substituição de nucleotídeos selecionado pelo teste de razão de verossimilhança foi Tamura Nei (TN 93) com distribuição gama. Foi realizada uma busca heurística utilizando o algoritmo TBR (*tree bisection reconnection*). A topologia da árvore está representada na figura 23a. Os valores de *bootstrap* foram satisfatórios refletindo a boa sustentação dos ramos, verificando-se a separação das amostras em subgrupos específicos.

A análise do *data set* Brasil revelou a presença de 3 *clusters* denominados aleatoriamente de BR-I (Figura 23b), BR-II (Figura 23c) e BR-III (Figura 23d). O *cluster* BR-I englobou, no geral, as sequências mais antigas, identificadas em 2001 (BR19_2001 e BR 42_2001), 2003 (BR140_2003 e BR105_2003), 2004 (BR93_2004) e 2005 (15 sequências) da cidade de São Paulo e outras cidades da região metropolitana, como Jundiaí e Itapevi. Neste *cluster* também foram agrupados o protótipo BA 4128_99B, e algumas amostras identificadas mais recentemente: uma do Ceará (2008), duas de Ribeirão Preto (2005 e 2006) e uma de São Paulo (2009).

Por outro lado no *cluster* BR-II percebe-se que a grande maioria das amostras datam de 2005 e 2006, totalizando 48 amostras da região metropolitana de São Paulo e 9 de Ribeirão Preto. Neste mesmo *cluster* tivemos 5 amostras do Ceará de 2007 e 2008 e uma amostra (BR_CE_316_2004) de 2004, além de 3 amostras de 2007 e 8 de 2009 colhidas na cidade de São Paulo.

O *cluster* BR-III agrupou, predominantemente, amostras isoladas na cidade de São Paulo no ano de 2009 (15 amostras), mas também 4 amostras do Ceará, sendo duas de cada ano (2006 e 2007) e 4 amostras da cidade de São Paulo, duas de cada ano também (2005 e 2006).

Para a avaliação da evolução e circulação do genótipo BA no mundo, foi preparado o *data set* global contendo 421 sequências contendo 330 nt da região C-terminal do gene codificador da proteína G, sendo, 188 sequências obtidas do *GeneBank* de diversas regiões do mundo, 5 sequências do Chile colhidas em 2003, mais 228 do *data set* Brasil (2001 a 2009) objeto de análise deste estudo. A origem das sequências e ano de isolamento estão descritos na tabela 8.

Tabela 8- Número de amostras de HRSV do genótipo BA distribuídas por ano e local de isolamento.

Localidade / Ano			99	01	02	03	04	05	06	07	08	09	TOTAL/ LOCAL	
A M D O S U L	B R A S I L	S P	<i>São Paulo*</i>		2		2	1	47	22		5	25	104
			<i>São Paulo IAL*</i>						40	28	2			70
			<i>Ribeirão Preto*</i>						7	7				14
			<i>Itapevi*</i>						9					9
			<i>Jundiaí*</i>						8	7				15
	C E		<i>Fortaleza*</i>					3	0	2	6	4		16
			Chile	<i>Santiago</i>				5						5
		Argentina	<i>Buenos Aires</i>	8		23	10	6						47
	Europa		<i>Bélgica</i>	2	19	10	14	10	10					66
	Am. do Norte		<i>Quebec</i>			1	1							2
Oceania		<i>Nova Zelândia</i>			1								1	
África		<i>África do Sul</i>							3				3	
Ásia		<i>Índia</i>						17	19	1			36	
		<i>Japão</i>				5		1	1		1		8	
		<i>China</i>					1	3				21	25	
Total / ANO			10	21	35	37	21	143	89	9	10	46	421	

* Sequências referente ao *data set* Brasil.

Foram identificados 53 grupos de sequências idênticas, das quais uma foi selecionada aleatoriamente para as análises subsequentes, que somados a 185 amostras únicas gerou um *data set* de 238 sequências, denominado global.

A análise filogenética destas sequências revelou, pelo critério de Máxima Verossimilhança, a presença de 7 *clusters*, representadas nas figuras 24a, 24b e 24c.

Desde o aparecimento do genótipo BA, descrito pela primeira vez em 1999, por Trento et al. (2003), verificamos sua disseminação e expansão por diversas localidades no mundo. A sublinhagem BA-I agrupou as amostras circulantes entre os anos de 1999 e 2003, principalmente na América do Sul, englobando Argentina e Chile. Este foi o único *cluster* que não teve nenhuma amostra brasileira. Ressaltamos que, embora Trento et al. (2010) tenham descrito o desaparecimento dessa sublinhagem em 2002, verificamos que as amostras do Chile, circulantes em 2003, foram classificadas dentro dessa sublinhagem, indicando que talvez que ela tenha sido importada dos países vizinhos. Já na sublinhagem BA-II verificamos amostras de diversas localidades, como Bélgica (2001 e 2002), Argentina (2003), e Brasil (2005). A sublinhagem BA-III agrupou, em sua maioria, as amostras circulantes em Buenos Aires, entre os anos de 2003 e 2004, embora fossem também encontradas sequências da Índia (2005) e Brasil (2005). Na sublinhagem BA-VI encontramos em sua maioria amostras Belgas circulantes em 2003, além da presença de duas amostras brasileiras, ambas isoladas em 2001 e que não apresentam mais circulação atualmente. As sequências mais recentes estão agrupadas, em sua maioria, em um mesmo *cluster*, dividido em várias sublinhagens, muitas vezes representando um *cluster* geográfico, conforme verificado na figura 24c, na qual verificamos as amostras Indianas e de origem asiática (China, Japão e Índia) formando *clusters* separados, assim como as amostras brasileiras, que estão divididas em dois clusters, um englobando amostras de 2005 a 2006 (e uma amostra belga e duas indianas) e o outro somente com amostras brasileiras de 2006 a 2009.

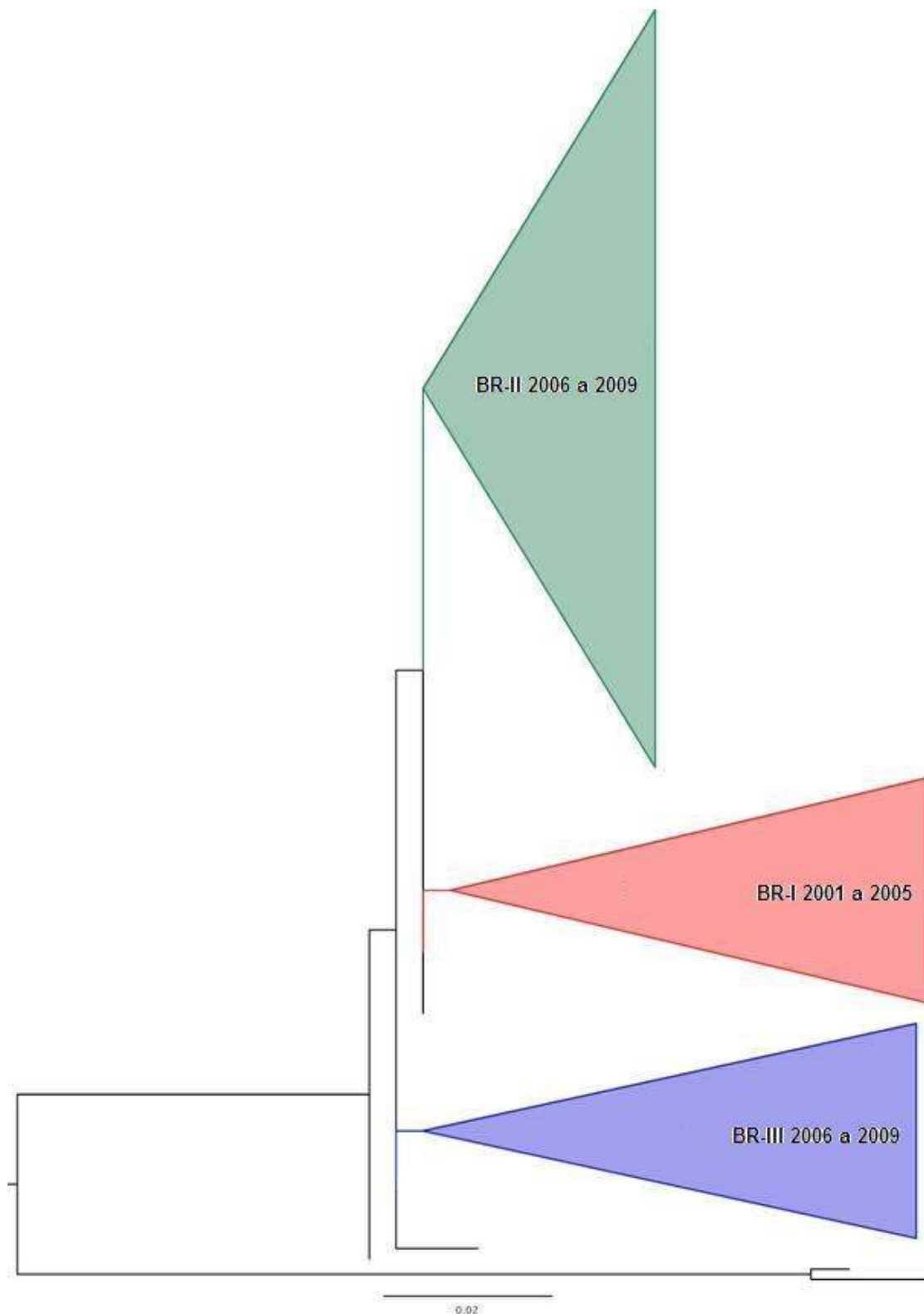


Figura 23a: Topologia da árvore filogenética obtida pelo critério de máxima verossimilhança utilizando 228 sequências do genótipo BA (nucleotídeos 652 a 982) constituintes do *data set* Brasil, mostrando a posição exata de cada uma das amostras na árvore. As amostras estão agrupadas em 3 grandes *clusters* representados pelas cores vermelhas, verde e azul.

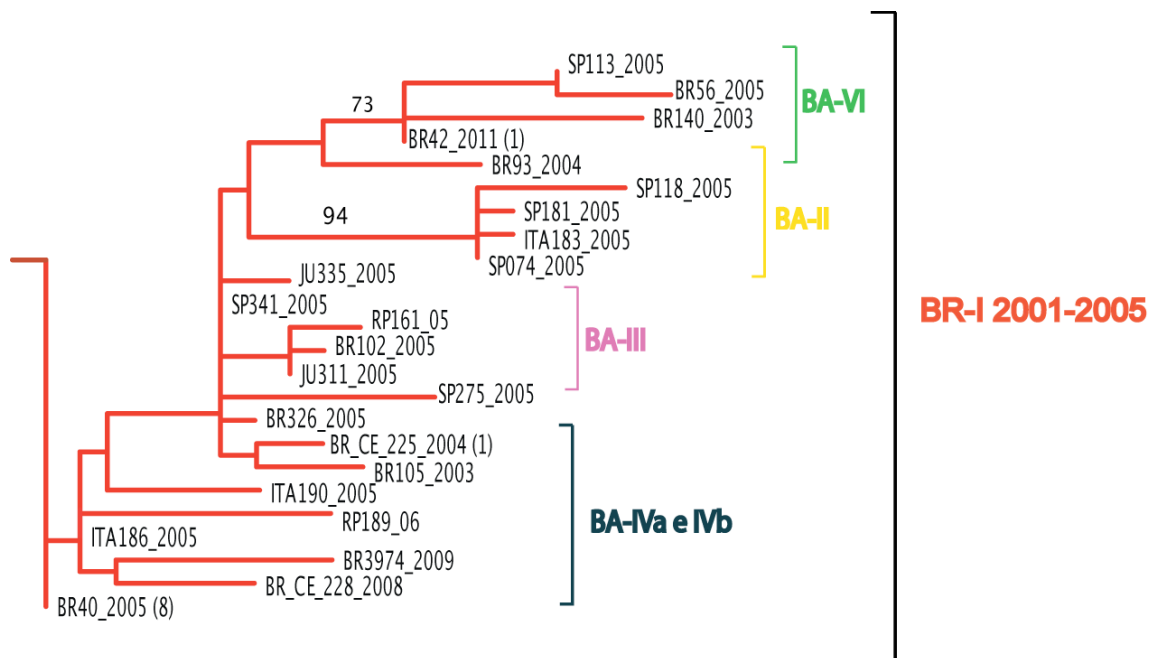


Figura 23b: Ampliação de parte da figura 23a mostrando o *cluster* BR-I 2001-2005 e a posição das amostras que constituem esse grupo. Os números marcados nos ramos representam valores de *bootstrap* (500 réplicas).

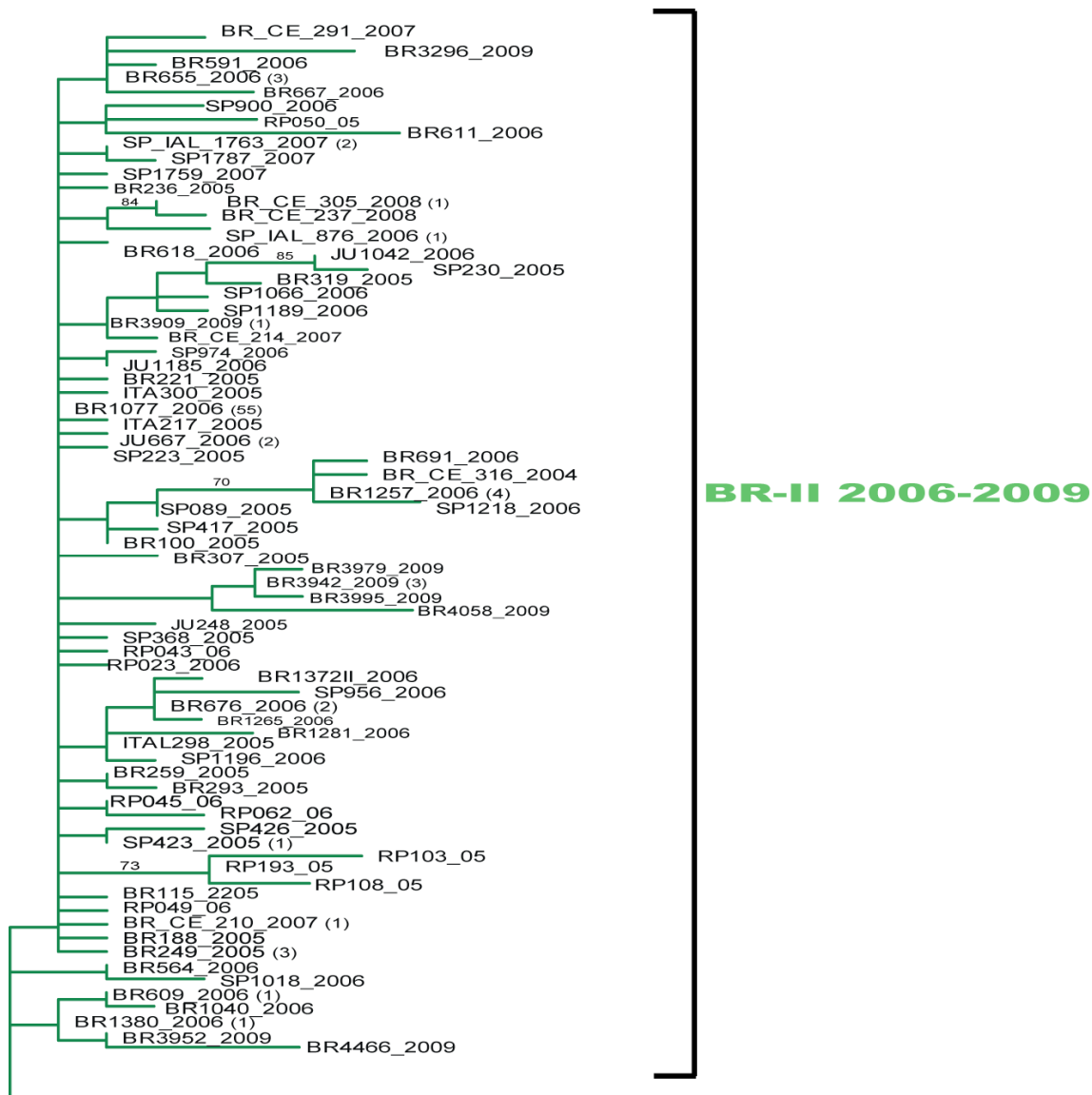


Figura 23c: Ampliação de parte da figura 23a mostrando o *cluster* BR-II 2006-2009 e a posição das amostras que constituem esse grupo. Os números marcados nos ramos representam valores de *bootstrap* (500 réplicas).

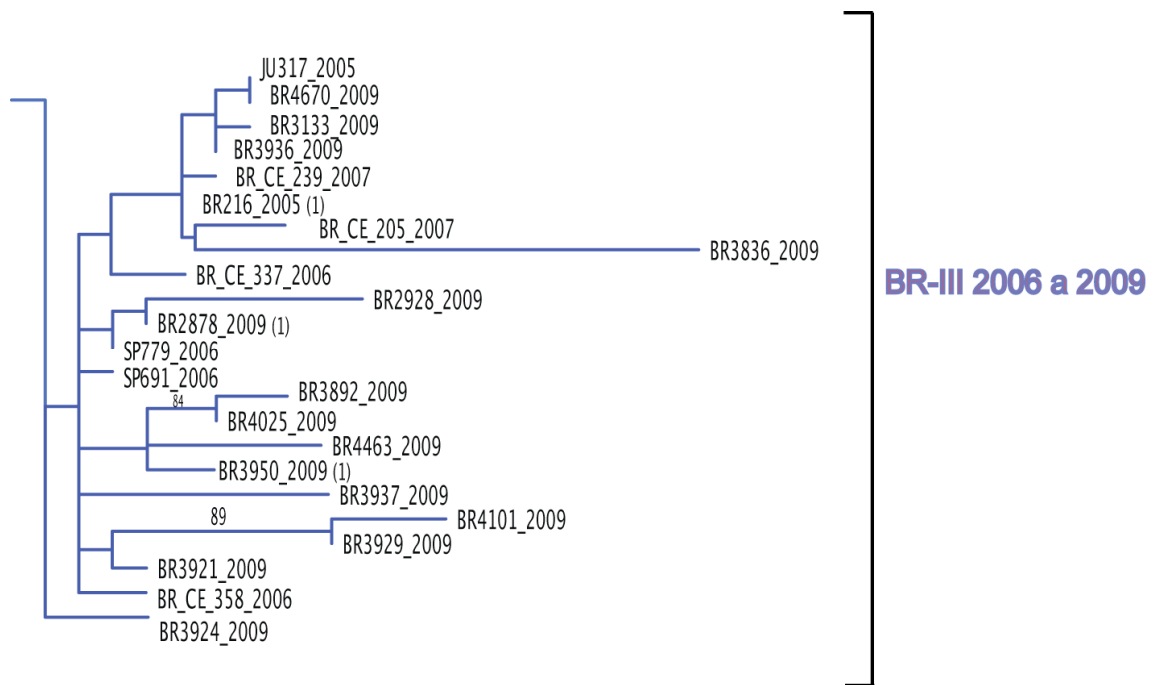


Figura 23d: Ampliação de parte da figura 23a mostrando o *cluster* BR-III 2006-2009 e a posição das amostras que constituem esse grupo. Os números marcados nos ramos representam valores de *bootstrap* (500 réplicas).

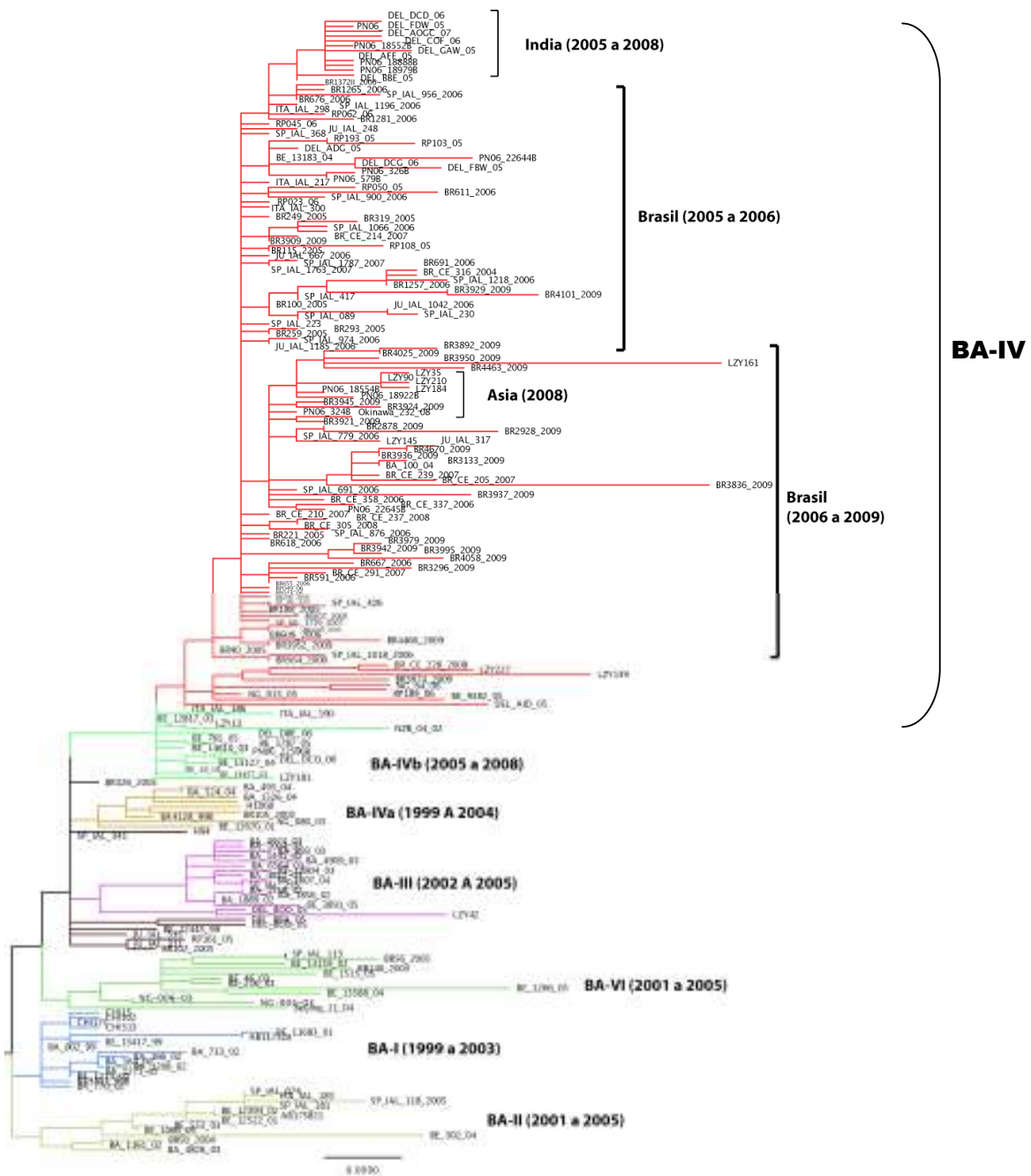


Figura 24a: Topologia da árvore filogenética obtida pelo critério de máxima verossimilhança utilizando 239 sequências do genótipo BA (nucleotídeos 652 a 982). As amostras brasileiras estão representadas por BR = São Paulo (analisada neste estudo); JU = Jundiá (São Paulo); IAL = São Paulo (São Paulo); ITA = Itapevi (São Paulo); RP = Ribeirão Preto (São Paulo) e BR_CE = Ceará. As sequências internacionais estão representadas por CHI = Chile; SA = África do Sul; QUE = Canadá; BE = Bélgica; DEL e PN = Índia; BA = Argentina; H, LZY e Beijing = China; S00-4, NG e Rsvi_Okinawa_JPN = Japão; NZB = Nova Zelândia.

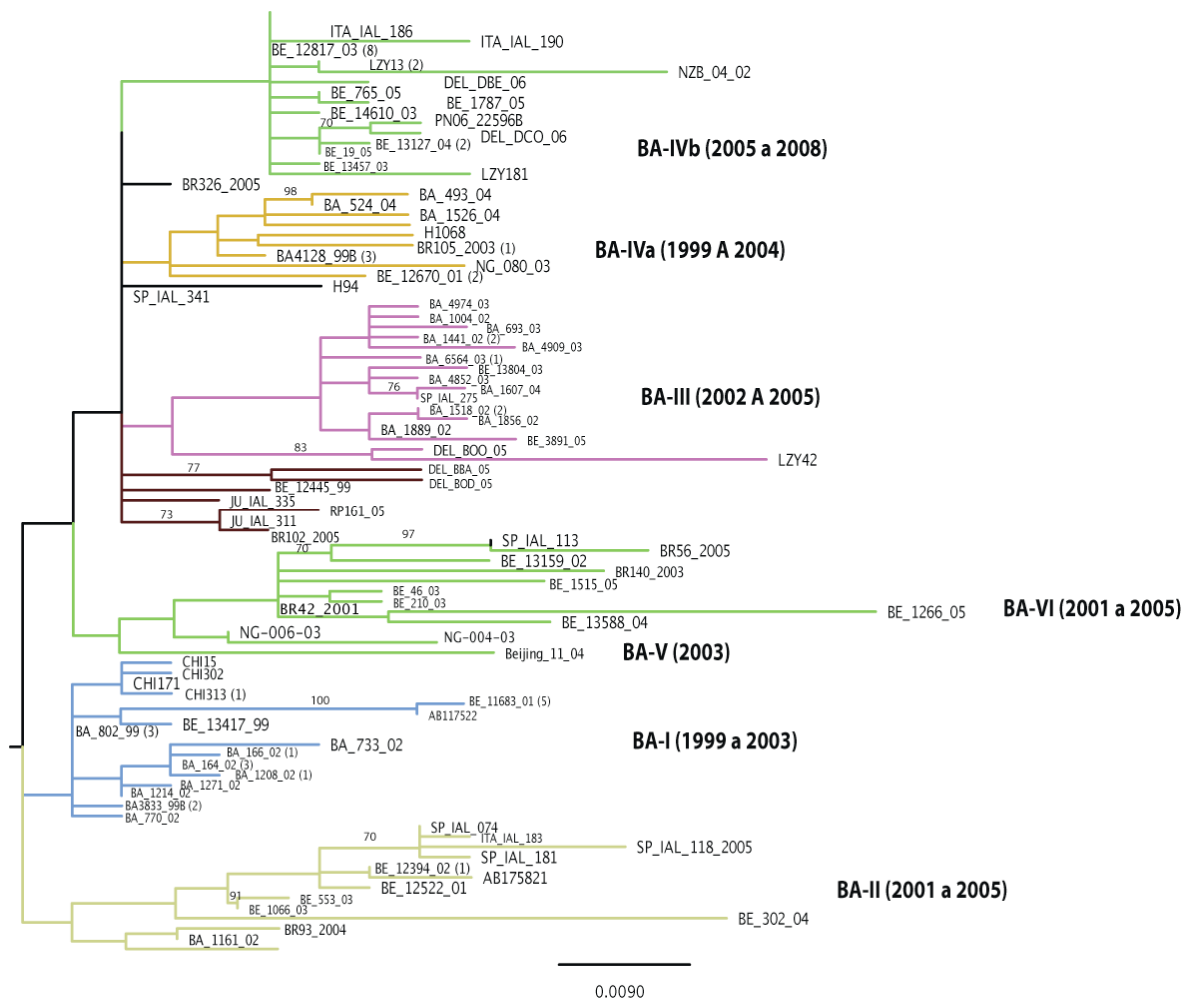


Figura 24b: Ampliação de parte da figura 24a mostrando os *clusters* BA-IVb (2005 a 2008), BA-IVa (1999 a 2004), BA-III (2002 a 2005), BA-VI (2001 a 2005), BA-I (1999 a 2003) e BA-II (2001 a 2005). As amostras brasileiras estão representadas por BR = São Paulo (analisada neste estudo); JU = Jundiá (São Paulo); IAL = São Paulo (São Paulo); ITA = Itapevi (São Paulo); RP = Ribeirão Preto (São Paulo) e BR_CE = Ceará. As sequências internacionais estão representadas por CHI = Chile; SA = África do Sul; QUE = Canadá; BE = Bélgica; DEL e PN = Índia; BA = Argentina; H, LZ Y e Beijing = China; S00-4, NG e Rsvi_Okinawa_JPN = Japão; NZB = Nova Zelândia. *Clusters* expandidos representando as sublinhagens BA-I, BA-II, BA-III e BA-IVa, BA-IVb e BA-VI. Os números marcados nos ramos representam valores de *bootstrap* (500 réplicas).

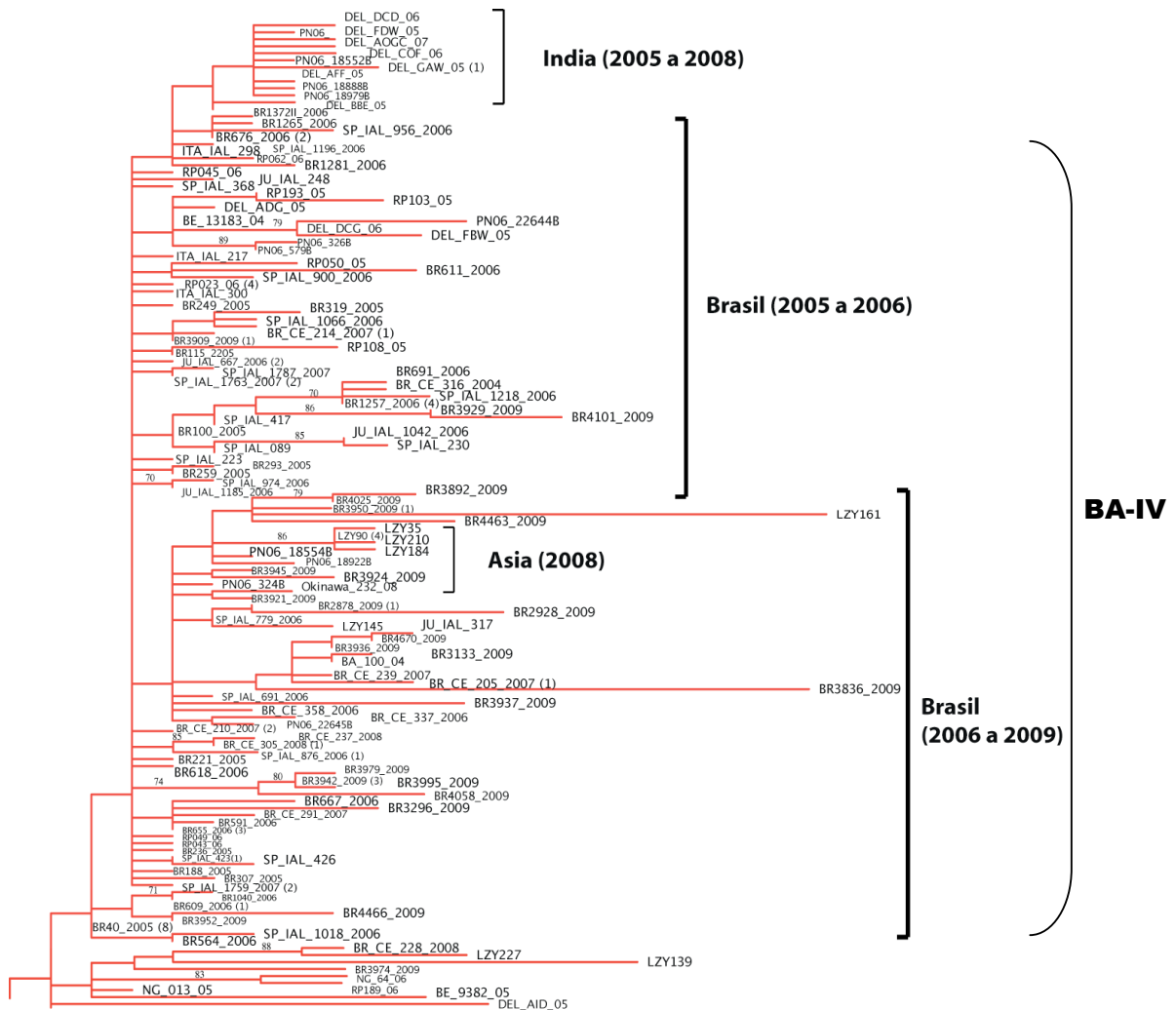


Figura 24c: Ampliação de parte da figura 24a mostrando os *clusters* Índia (2005 a 2008), Brasil (2005 a 2006), Ásia (2008) e Brasil (2006 a 2009). As amostras brasileiras estão representadas por BR = São Paulo (analisada neste estudo); JU = Jundiaí (São Paulo); IAL = São Paulo (São Paulo); ITA = Itapevi (São Paulo); RP = Ribeirão Preto (São Paulo) e BR_CE = Ceará. As sequências internacionais estão representadas por CHI = Chile; SA = África do Sul; QUE = Canadá; BE = Bélgica; DEL e PN = Índia; BA = Argentina; H, LZY e Beijing = China; S00-4, NG e Rsvi_Okinawa_JPN = Japão; NZB = Nova Zelândia. *Clusters* expandidos representando as sublinhagens circulantes no Brasil e Ásia entre 2005 a 2009. Os números marcados nos ramos representam valores de *bootstrap* (500 réplicas).

5 DISCUSSÃO

O HRSV apresenta distribuição mundial e é o principal patógeno relacionado a infecções do trato respiratório inferior em lactentes, crianças em idade pré-escolar e idosos, com incidência entre crianças hospitalizadas variando de 26% a 56% (BYINGTON et al., 2002; NASCIMENTO et al., 1991; SUTMÖLLER et al., 1995; MIYAO et al., 1999; AVENDANO et al., 1991; AVILA et al., 1990; BEDOYA et al., 1996; CABRERA ROCA et al., 1997; FORSTER et al., 2004; GARCIA et al., 2004; OHM-SMITH et al., 2004; KUYPERS et al., 2006; CORSELLO et al., 2008; PECCHINI et al., 2008). As reinfecções são comuns por toda a vida (SCOTT et al., 2006; SHOBUGAWA et al., 2009; MOORE et al., 2009; PECCHINI et al., 2008), sendo que a primeira infecção por HRSV geralmente é mais grave, as re-infecções em crianças mais velhas são brandas e em adultos a doença raramente é grave ou fatal (OGRA 2004; HALL et al., 1991). A prevalência de patógenos virais na população adulta gira em torno de 34%, porém, a prevalência do HRSV é baixa (REN et al., 2009). Entretanto, os adultos podem ser uma fonte potencial de infecção do HRSV para crianças (HALL et al., 1976).

No presente estudo o HRSV foi o patógeno mais frequentemente associado a infecções do trato respiratório inferior de crianças menores de 5 anos de idade, sendo responsável por 33,5% do total de crianças atendidas nos Hospitais Universitário da USP ou Santa Casa de Misericórdia (1431 de 4274), durante os anos de 2001 a 2009 na cidade de São Paulo.

Pelas suas características genéticas e antigênicas, o HRSV é dividido em dois grupos, A e B, sendo que a maior diferença está na glicoproteína G (MUFSON et al., 1985; JOHNSON et al., 1987; HENDRY et al., 1988). Geralmente os dois grupos apresentam co-circulação durante os surtos, sendo o HRSV do grupo A isolado mais freqüentemente do que o grupo B, embora haja relatos de predominância do grupo B em várias localidades e anos diferentes (ANDERSON et al., 1991; VIEGAS et al., 2005; FRABASILE et al., 2003; SCOTT et al., 2004; ZLATEVA et al., 2004, 2007; GILCA et al., 2006; HENDRY et al., 1986; LUKIC-GRLIC et al., 1998; KAPLAN et al., 2008; MLINARIC et al., 2009). Embora o número de amostras caracterizadas no presente estudo seja pequeno em alguns anos, verificamos que durante o período estudado houve a co-circulação de ambos os grupos, com predominância alternada

entre os grupos A (2002, 2003, 2004, 2007 e 2008) e grupo B (2001, 2005, 2006 e 2009).

Estudos epidemiológicos realizados em diferentes regiões do Brasil, como na cidade de Belém do Pará, na região Norte (MELLO e SILVA, 1992), na cidade de Salvador, no Nordeste (MOURA et al., 2003), no Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Uberlândia e São Paulo no Sudeste (SIQUEIRA et al., 1991; CINTRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008; BOTOSSO 2002, 2004, 2006; CAMPOS et al., 2007) e em Porto Alegre na região Sul (STRALIOTTO et al., 2001) relataram a circulação de ambos os grupos, com uma predominância do grupo A e com raros casos de predominância do grupo B (SIQUEIRA et al., 1991; CINTRA et al., 2001).

A análise da variabilidade genética do gene G permitiu a divisão em vários genótipos, que podem co-circular durante um mesmo surto, geralmente com predominância de um ou dois, que podem tanto persistir no decorrer dos anos, como ter a circulação diminuída até o desaparecimento (PERET et al., 1998, 2000; VENTER et al., 2001; BOTOSSO, 2002; BOTOSSO et al., 2009; MATHENSON et al., 2006; ZLATEVA et al., 2004, 2005; MOURA et al., 2004; SILVA et al., 2008). A classificação em genótipos, entretanto, não pode ser considerada conclusiva, à medida que um número maior de seqüências do gene G do HRSV são analisadas, novos genótipos estão continuamente emergindo, enquanto outros podem não mais ser detectados (SULLENDER, 2000; CANE, 2001).

Dentro dessa premissa, em 1999, em Buenos Aires na Argentina, foi identificado um novo genótipo, denominado BA, que apresentava uma duplicação de 60 nucleotídeos na posição correspondente ao nucleotídeo 792 da região G2 do gene da glicoproteína G da amostra protótipo CH18537 do HRSV-B. Nos últimos dez anos, esse novo genótipo foi detectado em várias regiões do mundo demonstrando sua larga disseminação (SCOTT et al., 2004; TRENTO et al., 2003, 2006 e 2010; NAGAI et al., 2004, BOTOSSO et al., 2009; ZLATEVA et al., 2007; PARVEEN et al., 2006; SATO et al., 2005; VISSER et al., 2008).

Para analisar a diversidade genética das amostras pertencentes ao genótipo BA, com inserção de 60 nt do gene G na cidade de São Paulo, foram colhidas amostras de crianças atendidas e internadas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2007 e no Hospital da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2009. Após a amplificação parcial do gene G foi verificado que

algumas amostras tiveram produtos amplificados que migraram mais lentamente no gel de agarose quando comparados com outras amostras, apresentando padrão de banda maior que o esperado (Figura 20).

As seqüências de nucleotídeos da região G2 do gene G destas amostras foram alinhadas e comparadas com o protótipo BA disponível no *GeneBank*, confirmando a presença da duplicação dos 60 nucleotídeos (TRENTO et al., 2003).

Para o estudo da circulação do genótipo BA no Brasil, além das seqüências desse estudo, foram analisadas outras seqüências pertencentes a esse genótipo identificadas no país, a partir de 2001, data na qual as primeiras amostras pertencentes ao genótipo BA foram descritas no Brasil (BOTOSSO et al., 2009), dois anos após ter surgido na Argentina (TRENTO et al., 2003).

A árvore filogenética da figura 23a representa a circulação do genótipo BA em duas diferentes regiões do Brasil, Nordeste (cidade de Fortaleza, Ceará) e Sudeste (cidades do estado de São Paulo). As seqüências formaram 3 *clusters* de acordo com uma relação temporal (BR-I, BR-II e BR-III), com alternância na circulação das linhagens com o passar do tempo.

O primeiro *cluster* englobou as amostras mais antigas (2001 a 2004), quando o genótipo apresentou baixa circulação (2 em 2001, 3 em 2004 (1 de SP e 2 do CE) e 2 em 2003) e algumas de 2005. A grande maioria das amostras identificadas em 2005 e 2006 agrupou no segundo *cluster*. Durante esses anos o genótipo apresentou larga disseminação em São Paulo, sendo o predominante entre todos os genótipos identificados, tanto na grande São Paulo, que englobou amostras identificadas nas cidades de São Paulo, Jundiaí e Itapevi, como na cidade de Ribeirão Preto, localizada a 336 km da capital. Entretanto não foi identificada nenhuma amostra deste genótipo no ano de 2005 no Ceará (PERDIGÃO, 2009). As duas amostras identificadas em 2007, na grande São Paulo, também agruparam nesse *cluster*.

O terceiro *cluster* agrupou as seqüências da cidade de São Paulo obtidas em 2008 e 2009, ano no qual houve, novamente, um aumento da circulação de vírus (90,9% dentre as amostras do grupo B). Portanto, verificamos a partir de 2001, uma expansão gradual até o ano de 2004, rápida expansão em 2005 e 2006 seguido de diminuição no tamanho efetivo da população entre os anos de 2007 e 2008, e nova expansão no ano de 2009. Trento et al. (2010) descreveu uma história demográfica semelhante com seqüências de várias localidades do mundo, com aumento gradual

da prevalência do genótipo BA desde o seu surgimento, em 1999, primeiro de maneira moderada, até o ano de 2003, seguido de rápida expansão nos anos de 2004 e 2005. Após esse período houve uma diminuição no tamanho da população, provavelmente pelo efeito conhecido como efeito de gargalo (*Bottleneck effect*) após o surgimento da nova linhagem, conhecida como BA-IV, que substituiu todas as linhagens circulantes, sugerindo uma adaptação do genótipo ao seu hospedeiro.

Entretanto, no estado do Ceará a circulação do HRSV e, conseqüentemente, do genótipo BA foi diferente. Os primeiros dados obtidos datam de 2004, no qual as 4 amostras classificadas dentro do grupo B pertenciam ao genótipo BA (PERDIGÃO, 2009). Não foram realizados estudos anteriores a esse ano, não sendo, portanto, possível determinar o início da circulação deste genótipo na cidade de Fortaleza (Moura, 2010 – comunicação pessoal¹). Perdigão (2010) relatou que durante os anos de 2004 a 2008, as amostras do grupo A e B apresentaram um equilíbrio de circulação, com ligeira predominância do grupo A em todos os anos, com exceção de 2005, ano no qual o grupo A foi o predominante, sendo detectadas poucas amostras do grupo B e nenhuma do genótipo BA. Nos demais anos (2004, 2006, 2007 e 2008), o genótipo BA foi o mais detectado entre amostras do grupo B, demonstrando um padrão de circulação diferente do verificado na região sudeste do Brasil, parecendo estar deslocado em 1 ou 2 anos (Figura 23a).

A dinâmica de circulação do HRSV – sazonalidade e duração das epidemias pode ser influenciada, dentre outras condições, pela seleção natural devida à imunidade adquirida e mudanças cíclicas na suscetibilidade da população, a índices de superlotação, densidade populacional e a fatores geográficos e climáticos (ZLATEVA et al., 2005; STENBALLE et al., 2003, 2009; GIRARD et al., 2005; BULKOW et al., 2002; SIMOES et al., 2003; ZACHARIAH et al., 2009).

As diferenças de circulação entre as duas regiões brasileiras também é verificada com outras viroses respiratórias, como o Influenza, na qual a circulação ocorre de maneira similar a uma “onda” anual, com início da circulação das cepas nas zonas equatoriais, disseminando-se progressivamente para as zonas tropicais e subtropicais, geralmente mais populosas, com um intervalo de aproximadamente três meses entre o pico das regiões Norte e Sul do país (ALONSO et al., 2007).

Interessante ressaltar ainda, que 2 amostras de 2004 do estado do Ceará,

¹ MOURA, Fernanda. Universidade Federal do Ceará, 2010.

apresentaram sequências idênticas ao protótipo BA isolado em 1999 em Buenos Aires, Argentina, podendo supor que esta foi importada diretamente de lá e estava entre as últimas amostras isoladas pertencentes que mantinha a mesma informação genética do isolado argentino.

Ao analisar o *data set* contendo as amostras brasileiras isoladas entre 2001 e 2009, verificamos que a maioria das amostras apresentaram mudanças na sequências de nucleotídeos e aminoácidos em relação ao protótipo BA.

Algumas amostras apresentaram inserções esporádicas, como a BR93_2004 e SP_IAL_691_06, isoladas na cidade de São Paulo, que tiveram uma inserção de treonina e isoleucina, respectivamente, na posição 232 da proteína G do protótipo BA. A amostra RP_193_05, isolada na cidade de Ribeirão Preto, apresentou duas inserções, Lisina e Glutamato na posição 226 do protótipo. Essas inserções, no entanto, não ocorreram em mais nenhuma outra amostra estudada. Inserções de poucos aminoácidos de maneira esporádica também são descritas na literatura (ZLATEVA et al., 2004, 2005; BOTOSSO et al, 2009).

Analisando o fragmento correspondente à região G2 das amostras pertencentes ao genótipo BA, foi observada a presença de algumas mutações pontuais de aminoácidos em algumas amostras, sem correspondência em outras. Por outro lado, algumas alterações ocorridas nos primeiros anos de isolamento deste genótipo fixaram-se no restante das amostras, demonstrando, talvez, uma vantagem evolutiva para adaptação do vírus ao hospedeiro. Como por exemplo, cita-se as alterações nos sítios 223 (Leu223Pro) e 271 (Val271Ala), ocorridas a partir do ano de 2004. Noventa (73%) das 123 amostras brasileiras, tiveram a substituição do aminoácido Valina por Alanina na posição 271, fixando praticamente em todas as amostras a partir do ano de 2005. Trento et al. (2010) descreveram essas mutações como definidoras dos clados correspondentes aos genótipos mais recentes dentro da sublinhagem BA-IV, (sítio 223 - BA-IVb, MAD-II, MAD-III, Índia, Brasil e sítio 271 - Índia e Brasil). Outro exemplo envolve uma substituição ocorrida no resíduo 270 (isoleucina para treonina), também dentro do fragmento duplicado, que ocorreu na maioria das amostras colhidas até o ano de 2004, revertendo nas amostras mais recentes (a partir de 2005) para o aminoácido original. Botosso et al. (2009) relataram que esse sítio estava sob pressão seletiva positiva e que também ocorria um fenômeno denominado *flip flop*, nos quais há a tendência de reversão dos aminoácidos aos originais, revelando que, embora a proteína G suporte

modificações, inserções e deleções há um limite do repertório de alteração de aa em sítios específicos.

Nas amostras analisadas, também foi possível observar que os códons de terminação, (*stop codons*), estão localizados em 3 posições diferentes, gerando diferenças na extensão da proteína, que pode conter 312, 315 e 319 aminoácidos, sendo que as amostras isoladas entre 2001 e 2005 apresentaram tamanho correspondente a 315 ou 319 aminoácidos, devido a uma alteração no códon 313 (stop para Gln). Por outro lado, as amostras mais recentes, apresentaram proteína composta de 312 aminoácidos, devido a nova alteração nesse sítio, revertendo de Gln para Stop. Botosso et al. (2009), descreveram esse sítio como estando sob pressão seletiva positiva, sendo responsável pela definição de importantes clados dentro do grupo B. Trento et al. (2010), sugeriram que essa substituição estava relacionada à definição do *cluster* que agrupava as amostras mais recentes, denominado como sublinhagem BA-IV.

Na tabela 6 foram descritas várias substituições de aminoácidos ocorridas nas amostras brasileiras. Algumas dessas substituições (219, 242, 269, 270, 297, 305, 306 e 313) foram identificados anteriormente por Botosso et al., (2009) como sendo sítios sob pressão seletiva positiva nas amostras do grupo B, sugerindo pressão imune sobre esses códons, embora não sejam conhecidos os epítomos dessa proteína. As alterações desses sítios podem possibilitar o escape da imunidade preexistente e, conseqüentemente, a re-infecção da população.

Ao compararmos o número total de substituições de aminoácidos que ocorreram nas amostras brasileiras na região anterior a duplicação com o da região duplicada (tabela 6), concluímos que a primeira, na qual ocorreram um total de 28 substituições de aminoácidos em 25 amostras, foi mais conservada em relação à segunda, na qual ocorreram 159 substituições de aminoácidos em 102 amostras. A região duplicada parece, portanto, ainda estar em adaptação dentro do genoma viral.

Os grupos químicos (apolar, neutro, ácido ou básico) dos aminoácidos também foram analisados (Tabela 7) e observamos que dentre todas as substituições, 74 foram mudanças não conservativas, ou seja, os aminoácidos foram substituídos por outros pertencentes a outros grupos químicos. Entretanto, é interessante ressaltar que as duas substituições (Leu223Pro e Val271Ala) que se

fixaram na maioria das amostras ao longo do tempo ocorreram entre aminoácidos do mesmo grupo químico (apolar).

Destacam-se também o grande número de substituições que ocorreram entre os aminoácidos neutros, passando a apolares (37) e de apolares para neutros (13). A substituição dos demais grupos de aminoácidos (2 básico para neutro, 2 básico para apolar, 3 básico para ácido, 4 neutro para básico, 1 neutro para ácido, 5 ácido para neutro, 2 ácido para básico, 5 ácidos para apolar) somaram somente 24 eventos, ou seja, as substituições entre aminoácidos de grupos químicos sem carga (apolar, neutro) são mais frequentes, podendo supor que isso ocorra porque talvez sejam mais vantajosas para o vírus, já que a carga dos aminoácidos são essenciais nas ligações iônicas que ocorre durante a formação da estrutura terciária das proteínas influenciando no seu enovelamento final (NELSON, 2008), e mudanças envolvendo aminoácidos carregados alterar o número de ligações iônicas, o que inviabilizaria a formação correta da proteína e, podendo alterar sua função e, conseqüentemente, a viabilidade do vírus.

Em estudos realizados em diversos países como Japão, Espanha, Bélgica e Argentina mostram que a circulação do genótipo BA vem aumentando gradativamente, tornando-se o mais prevalente entre os isolados do grupo B (ZLATEVA et al., 2007; PARVEEN et al., 2006; SATO et al., 2005; VISSER et al., 2008; TRENTO et al., 2010). Por exemplo, na Bélgica o genótipo BA correspondeu a 100% dos isolados do grupo B entre os anos de 2003 a 2006. Achados semelhantes foram verificados na Índia (surto de 2001 a 2005), no Japão (surto de 2002 e 2003) e Madri (2003 a 2007). Portanto, houve uma tendência mundial de aumento de circulação deste genótipo em todos os locais aonde foi realizada a epidemiologia molecular do HRSV, atingindo o ápice da circulação no surto de 2004-2005, tanto nos países do hemisfério Norte quanto do Hemisfério Sul. A exceção ocorreu justamente no estado do Ceará, no qual em 2005 o vírus não foi detectado e houve o aumento da prevalência em 2007 e 2008.

A análise filogenética desse genótipo revelou 6 *clusters*, identificados por Trento et al. (2006, 2010) como sublinhagens BA-I, BA-II, BA-III, BA-IV, BA-V e BA-VI, sendo o BA-IV subdividido em linhagens, BA-IVa, BA-IVb, Índia, Brazil, Madri-III (TRENTO et al., 2006, 2010).

A árvore filogenética da figura 24a representa a circulação das amostras do genótipo BA em várias regiões do mundo. Verificamos que as amostras brasileiras foram classificadas dentro dessas sublinhagens, sendo divididas conforme o ano. Assim, verificamos que a linhagem BAII compreendeu amostras de 2004 e 2005, a linhagem BA-III amostras de 2005 e a linhagem BA-VI amostras de 2001, 2003 e 2005. Não verificamos mais a circulação dessas linhagens em nosso país, em concordância com Trento et al. (2010) que descreveram o desaparecimento dessas em várias localidades do mundo. As linhagens BA-IVa e BA-IVb compreendem amostras de 2003 e 2004/2005, respectivamente. A maior parte das amostras brasileiras, identificadas a partir de 2006, estão agrupadas em um mesmo *cluster*, denominado por Trento et al. (2010) como Brasil, já que representaram um *cluster* geográfico e temporal.

De acordo com os resultados apresentados, observamos que algumas dessas linhagens co-circularam em um mesmo ano ou em anos diferentes e que as linhagens identificadas até o ano de 2004 não circulam atualmente. Algumas amostras identificadas na cidade de São Paulo foram idênticas às amostras encontradas no Canadá, Argentina, Bélgica, Chile e África do Sul, no estado do Ceará e em outras cidades do Estado de São Paulo (Jundiaí, Ribeirão Preto, Itapevi) (Anexo D), demonstrando a disseminação desse vírus no Brasil e ao redor do mundo.

A região C terminal da proteína G tem se mostrado imunologicamente relevante, e mudanças como a que ocorreu nas amostras com genótipo BA, que geraram a emergência de um novo genótipo, podem permitir a reinfecção de indivíduos expostos anteriormente a um genótipo diferente, conferindo uma vantagem evolutiva ao vírus.

Acreditamos que estudos mais completos envolvendo o genoma completo, ou pelo menos a caracterização das proteínas de superfície possam elucidar as vantagens evolutivas que envolveram esse novo genótipo e levaram a se sobrepor sobre os demais do grupo B.

6 CONCLUSÃO

- Desde a primeira descrição vírus HRSV-B com duplicação de 60 nt no gene G, no Brasil, ocorrida em 2001, o mesmo apresentou aumento de circulação progressiva, culminando nos anos de 2005 e 2006, quando foi o predominante entre todos os genótipos identificados;
- Nos anos subsequentes, 2007 e 2008, a circulação apresentou declínio, e voltou a ser o predominante em 2009, sendo responsável por 89% dentre as amostras de HRSV-B identificadas, e 85% entre todas as amostras;
- A análise filogenética revelou a presença de vários *clusters*, denominados linhagens, com a co-circulação de várias delas em São Paulo. Algumas destas linhagens deixaram de circular com o tempo, e outras surgiram, sendo verificado, portanto uma alternância de circulação;
- As sequências de aminoácidos apresentaram mutações pontuais de inserção e/ou substituição de aminoácidos;
- Algumas alterações de nucleotídeos e/ou aminoácidos ocorridas nos primeiros anos de isolamento fixaram-se no restante das amostras, levando a definição dos clados contendo amostras mais recentes;

REFERÊNCIAS*

ADAIR, B.M. Nanoparticle vaccines against respiratory viruses. *Wiley Interdiscip Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, v. 1, n. 4, p. 405-414, July 2009. Review.

ADAMS, O.; BONZEL, L.; KOVACEVIC, A.; MAYATEPEK, E.; HOEHN, T.; VOGEL, M. Palivizumab-resistant human respiratory syncytial virus infection in infancy. *Clin. Infect. Dis.*, v. 15, n. 51(2), p. 185-188, July, 2010.

ALDOUS, W. K.; KRIS, G.; TARGGAT, E. W.; RUPP, J.; WINTCH, J.; DALY, J. A. A comparison of Thermo Electron™ RSV OIA® to viral culture and direct fluorescent assay for respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 224-228, 2005.

ALONSO, W. J.; VIBOUD, C.; SIMONSEN, L.; HIRANO, E. W.; DAUFENBACH, L. Z.; MILLER, M. A. Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. *Am. J. Epidemiol.*, v. 165, p. 1434-1442, 2007.

ANDERSON, L. J. et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.*, v.151, n. 4, p. 626-633, 1985.

ANDERSON, L. J.; BINGHAM, P.; HIERHOLZER, J. C.; Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixture of F and G protein monoclonal antibodies. *J. Virol.*, v. 62, p. 4232-4238, 1988.

ANDERSON, L. J.; PARKER, R. A.; STRIKAS, R. L. Association between respiratory syncytial virus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. *J. Infect. Dis.*, v. 161, p. 640-646, 1990.

ANDERSON, L. J.; HENDRY, R. M.; PIERIK, L. T.; TSOU, C.; MCINTOSH, K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.*, v. 163, p. 687-692, 1991.

ANDERSON R, Huang Y, Langley JM. Prospects for defined epitope vaccines for respiratory syncytial virus. *Future Microbiol.*, v. 5, n. 4, p. 585-602, Apr. 2010.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARBIZA, J. G.; TAYLOR, J. A.; LOPEZ, J.; FURZE, S.; WYLD, P.; WHYTE, E. J.; et.al. Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 2225-2234, 1992.

ARLANÁGIC, E.; MATSUMOTO, M.; SUZUKI, K.; NEROME K, TSUTSUMI, H.; HUNG, T. Maturation of respiratory syncytial virus within HEp-2 cell cytoplasm. **Acta. Virol.**, v. 40, n. 4, p. 209-214, 1996.

ATREYA, P. A.; PEEPLES, M.; COLLINS, P. C. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. **J. Virol.**, v. 72, p. 1452-1461, 1998.

AUSAR, S. F.; REXROAD, J.; FROLOV, V. G.; LOOK, J. L.; KONAR, N.; MIDDGAUGH, C. R. Analysis of thermal and pH stability of human respiratory syncytial virus. **Molec. Pharm.**, v. 2, n. 6, p. 491-499, 2005.

AVENDANO, L. F.; LARRANAGA, C.; PALOMINO, M. A.; GAGGERO, A.; MONTALDO, G.; SUAREZ, M.; DIAZ, A. Community and hospital acquired respiratory syncytial virus infection in Chile. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, p. 564, 1991.

AVILA, M.; SALOMON, H.; CARBALLAL, G.; EBKIAN, B.; WOYSKOVSKY, N.; CERQUEIRO, M. C.; WEISSENBACHER, M. Isolation and identification of viral agents in Argentinian children with acute lower respiratory tract infection. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12, n. 8, p. S974-S981, 1990.

BARIK, S. Development of gene-specific double-stranded RNA drugs. **Ann. Med.**, v. 36, n. 7, p. 540-551, 2004.

BEELEER, J. A.; COELING, K.; Neutralization epitopes of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. **J. Virol.**, v. 63, p. 2941-2950, 1989.

BECK, E. T.; JURGENS, L. A.; KEHL, S. C.; BOSE, M. E.; PATITUCCI, T.; LAGUE, E.; DARGA, P.; WILKINSON, K.; WITT, L. M.; FAN, J. H. E. J.; KUMAR, S.; HENRICKS, N. K. J. Development of a rapid automated influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus A/B multiplex real-time RT-PCR assay and its use during the 2009 H1N1 swine-origin influenza virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin. **J. Mol. Diagn.**, v. 12, n. 1, p. 74-78, Jan. 2010.

BECNEL, D.; YOU, D.; ERSKIN, J.; DIMINA, D. M.; CORMIER, S. A. A role for airway remodeling during respiratory syncytial virus infection. **Respir. Res.**, v. 6, p. 122, 2005.

BEDOYA, V. I.; ABAD, V.; TRUJILLO, H. Frequency respiratory syncytial virus in hospitalized infants with lower acute respiratory tract infection in Colombia. **Ped. Infect. Dis. J.**, v. 15, p. 1123-1124, 1996.

BELSHE, R. B.; MUFSON, M. A. Respiratory Syncytial Virus. In: BELSHE, R. B. **Textbook of human virology**. New York: Littleton Psg Publishing, 1991. p. 388-407.

BELSHE, R. B.; ANDERSON, E. L.; WALSH, E. E. Immunogenicity of purified F Glycoprotein of respiratory syncytial virus: clinical and immune responses to subsequent natural infection in children. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 1024-1029, 1993.

BOLT, G. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. **Virus Res.**, v. 68, p. 25-33, 2000.

BOSSO, P. A. R. **Ausência de Escapes Mutantes para o medicamento Palivizumab® do Vírus Respiratório Sincicial Humano (hRSV) circulante, na cidade de São Paulo durante o ano de 2004**. 2008. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BOTOSSO, V. F.; ZANOTTO, P. M.; UEDA, M.; ARRUDA, E.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S. E.; STEWIEN, K. E.; PERET, T. C.; JAMAL, L. F.; PARDINI, M. I.; PINHO, J. R.; MASSAD, E.; SANT'ANNA, O. A.; HOLMES, E. C.; DURIGON, E. L. VGDN CONSORTIUM. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. **PLoS. Pathog.**, v. 5, n. 1, p. e1000254, Jan. 2009.

BOYCE, T. G.; MELLEN, B. G.; MITCHEL, E. F. R.; WRIGHT, P. F.; GRIFFIN, M. R. Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. **J Pediatr.**, v. 137, n. 6, p. 865-870, Dec. 2000.

BRANDT, C.; POWER, U. F.; PLOTNICKY, G. H.; HUSS, T.; NGUYEN, T.; LAMBERT, P. H.; BINZ, H.; SIERGRIST, C. A. Protective immunity against respiratory syncytial virus in early life after murine maternal or neonatal vaccination with the recombinant G fusion protein BBG2Na. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 884-891, 1997.

BROUARD, J.; FREYMUTH, F.; CONSTANTINI, S.; PETITJEAN, J.; SCHREVEL, G.; DUHAMEL, J. F. Prévalence et aspects cliniques de l'infection par les sous-types A et B du virus respiratoire syncytial. Observation de 8 épidémies consécutives de 1982 à 1990. **Arch. Fr. Pédiatr.**, v. 50, p. 639-643, 1993.

BROUGHTON, S.; GREENOUGH, A. Effectiveness of drug therapies to treat or prevent respiratory syncytial virus infection-related morbidity. **Expert. Opinion in Pharmacother.**, v. 4, p. 1801-1808, 2003.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R. E. WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, v. 1, n. 365, p. 1147-1152, Mar. 2005.

BUKREYEV, A.; WHITEHEAD, S. S.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. **J. Virol.**, v. 71, p. 8973-8982, 1997.

BULKOW, L. R.; SINGLETON, R. J.; KARRON, R. A.; HARRISON, L. H.; ALASKA RSV STUDY GROUP. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection among Alaska native children. **Pediatrics**, v. 109, n. 2, p. 210-216, Feb. 2002.

BYINGTON, C. L.; CASTILLO, H.; GERBER, K.; DALY, K.; DALY, J. A.; BRIMLEY, L. A.; ADAMS, S.; CHRISTENSON, J. C.; PAIVA, A. T. The effect of rapid respiratory viral diagnostic testing on antibiotic use in children's hospital. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 156, p. 1230, 2002.

CABRERA-ROCA, G.; DOMÍNGUEZ, O. F.; LAFARGA, C. B.; CALVO, R. J. Clinical and epidemiological survey of RSV infection in infants. **An. Esp. Pediatr.**, v. 46, n. 6, p. 576-580, 1997.

CALEGARI, T.; QUEIROZ, D. A.; YOKOSAWA, J.; SILVEIRA, H. L.; COSTA, L. F.; OLIVEIRA, T. F.; LUIZ, L. N.; OLIVEIRA, R. C.; DINIZ, F. C.; ROSSI, L. M.; CARVALHO, C. J.; LIMA, A. C.; MANTESE, O. C. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, n. 2, p. 156-161, Apr. 2005.

CAMPOS, A. C. A.; DURIGON, E. L.; LEAL, A. L.; SOUSA, T. S.; BOSSO, P. A. R.; MORAES, C. T. P.; LIMA, H. N.; VIEIRA, S. E.; BOTOSSO, V. F.; STEWIEN, Klaus Eberhard. Comparison Between Ectodomain and G2 Region of G Glycoprotein for Genotyping of HRSV. In: XVIII National Meeting of Virology, 2007,

Armação dos Búzios - RJ. **Virus Reviews & Research**. Rio de Janeiro – RJ, v. 12, p. 174-174, 2007.

CANDEIAS, J. A. N. Isolamento de vírus respiratório sincicial em crianças com quadro respiratório agudo. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v. 9, n. 1, p. 27-30, 1967.

CANDUCCI, F.; DEBIAGGI, M.; SAMPAOLO, M.; MARINOZZI, M. C.; BERRÈ, S.; TERULLA, C.; GARGANTINI, G.; CAMBIERI, P.; ROMERO, E.; CLEMENTI, M. Two-year prospective study of single infections and co-infections by Respiratory Syncytial Virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. **J. Med. Virol.**, v. 80, p. 716-723, 2008.

CANE, P. A.; MATTHEWS, D. A.; PRINGLE, C. R. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 1-4, 1994.

CANE, P. A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. **Rev. Med. Virol.** v. 11, p. 103-16, 2001.

CARBONELL-ESTRANY, X.; SIMÕES, E. A.; DAGAN, R.; HALL, C. B.; HARRIS, B.; HULTQUIST, M.; CONNOR, E. M.; LOSONSKY, G. A. MOTAVIZUMAB STUDY GROUP. Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial. **Pediatrics**, v. 125, n. 1, p. 35-51. Jan, 2009.

CARDENAS, S.; AUAIS, A.; PIEDIMONTE, G. Palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus infection. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 3, n. 5, p. 719-726, Oct, 2005.

CARROMEU, C. **Estudos de caracterização estrutural, localização intracelular e imunogenicidade da RNA polimerase do Vírus Respiratório Sincicial Humano**. 2007. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CARTEE, T. L.; WERTZ, G. W.; Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection, **J. Virol.**, v. 75, p. 12188-12197, 2001.

CHANOCK, R. M.; FINBERG, L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. **Am. J. Hyg.**, v. 66, p. 281-290, 1957a.

CHANOCK, R. M.; FINBERG, L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiological aspects of infection in infants and young. **Am. J. Hyg.**, v. 66, p. 291-300, 1957b.

CHAPMAN, J.; ABBOTT, E.; ALBER, D. G.; BAXTER, R. C.; BITHELL, S. K.; HENDERSON, E. A.; CARTER, M. C.; CHAMBERS, P.; CHUBB, A.; COCKERILL, G. S.; COLLINS, P. L.; DOWDELL, V. C.; KEEGAN, S. J.; KELSEY, R. D.; LOCKYER, M. J.; LUONGO, C.; NAJARRO, P.; PICKLES, R. J.; SIMMONDS, M.; TAYLOR, D.; TYMS, S.; WILSON, L. J.; POWELL, K. L. RSV604, a novel inhibitor of respiratory syncytial virus replication. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 9, p. 3346-3353. Sep, 2007.

CHEN, M. D. VAZQUEZ M, BUONOCORE L, KAHN JS. Conservation of the respiratory syncytial virus SH gene. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 4, p. 1228-33. Oct, 2000.

CHOI, E. H.; LEE, H. J. Genetic Diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B of respiratory syncytial virus isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. **J. Inf. Dis.**, v. 181, p. 1547-1556, 2000.

CHAO, R. K.; FISHAUT, M.; SCHAWARTZMAN, J. D.; MCINTOSH, K. Detection of respiratory syncytial virus in nasal secretions from infants by enzima-linked immunosorbent assay. **J. Infect. Dis.**, v. 139, n. 4, p. 483-486, 1979.

CHENG, X.; PARK, H.; ZHOU, H.; JIN, H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. **J. Virol.**, v. 79, n. 22, p. 13943-13952, 2005.

CHRISTENSEN, L. S.; LARSEN, L. B.; JOHANSEN, J.; ANDERSEN, E. A.; WEJSE, C.; KLUG, B.; HORNSLETH, A. The fluctuating pattern of various genome types of respiratory syncytial virus in Copenhagen and some other locations in Denmark. **APMIS.**, v. 107, p. 843-850, 1999.

CILLA, G.; OÑATE, E.; PEREZ-YARZA, E. G.; MONTES, M.; VICENTE, D.; PEREZ-TRALLERO, E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: High rate of viral coinfection. **J Med Virol.**, v. 80, n. 10, p. 1843-1849 Oct, 2008.

CINTRA, O. A. L.; OWA, M. A.; MACHADO, A. A.; CERVI, M. C.; FIGUEIREDO, L. T. M.; ROCHA, G. M.; SIQUEIRA, M. M.; ARRUDA, E. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A e B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. **J. Med. Virol.**, v. 65, p. 408-412, 2001.

COATES, H. V.; CHANOCK, R. M. Experimental infection with respiratory syncytial virus in several species of animals. **Am. J. Hyg.**, v. 76, p. 302-312, 1962.

COGGINS, W. B.; LEFKOWITZ, E. J.; SULLENDER, W. M. Genetic variability among group A and B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. **J. Clin. Microbiol.** V. 36, p. 3552-3557, 1998.

COIRAS, M. T.; PEREZ-BRENA, P.; GARCÍA, M. L.; CASAS, I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription Nested-PCR assay. **J. Virol.**, v. 69, p. 132-144, 2003.

COLLINS, P. L.; PURCELL, R. H.; LONDON, W. T.; LAWRENCE, L. A.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. Evaluation in chimpanzees of vaccinia virus recombinants that express the surface glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **Vaccine**, v. 8, p. 164-168, 1990.

COLLINS, P. L.; MCINTOSH, K.; CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. In: FIELDS, B. N. (Ed.). **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001. p. 1313-1351.

COLLINS, P. L.; MURPHY, B. R.; Respiratory syncytial virus: reverse genetics and vaccine strategies. **Virology**, v. 10, n. 296, p. 204-211, May 2002.

COLLINS, P. L.; CROWE, J. E. J. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, p. 1601-1646. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (Ed.). **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

COLLINS, P. L.; GRAHAM, B. S. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. **J. Virol.**, v. 82, n. 5, p. 2040-2055, 2008.

COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASE. Use of ribavirin in the treatment of respiratory syncytial virus infection. **Pediatrics**, v. 92, p. 501-504, 1993.

COMMITTEE ON INFECTIONS DISEASES AND COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN. Prevention of respiratory syncytial virus infections: indications for the use of palivizumab and update on the use of RSV-IGIV. **Pediatrics**, v. 102, n. 5, p. 1211-1216, 1998.

CORSELLO, G.; DICARLO, P.; SALSA, L.; GABRIELE, B.; MELI, L.; BRUNO, S.; TITONE, L. Respiratory syncytial virus infection in a Sicilian pediatric population: risk factors, epidemiology, and severity. **Allergy Asthma Proc.**, v. 29, n. 2, p. 205-210, Mar.-Apr. 2008.

COWTON, V. M.; MCGIVERN, D. R.; FEARNNS, R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. **J Gen Virol.**, v. 87, p. 1805-1821, July 2006. Review.

CROWE, J. E. J. R.; BUI, P. T.; DAVIS, A. R.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. A further attenuated derivative of a cold-passaged temperature-sensitive mutant of human respiratory syncytial virus retains immunogenicity and protective efficacy against wild-type challenge in seronegative chimpanzees. **Vaccine**, v. 12, p. 783-790, 1994.

CROWE, J. E.; FIRESTONE, C.Y.; CRIM, R.; BEELER, J. A.; COELINGH, K. L.; BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. Monoclonal antibody-resistant mutants selected with a respiratory syncytial virus-neutralizing human antibody fab fragment (F19) define a unique epitope on the fusion. **Virology**, v. 252, p. 373-375, 1998.

CUESTA, I.; GENG, X.; ASENJO, A.; VILLANUEVA, N. Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. **J. Virol.**, v. 74, p. 9858-9867, 2000.

D'ELIA, C.; SIQUEIRA, M. M.; PORTES, S. A.; SANT'ANNA, C. C. Respiratory syncytial virus –associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 1, p. 7-10, 2005.

DeVINCENZO, J. P. A new direction in understanding the pathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis: how real infants suffer. **J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 195, n. 8, p. 1084-1086, Apr. 2007.

DeVINCENZO, J. Passive antibody prophylaxis for RSV. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 27, n. 1, p. 69-70, Jan. 2008.

DUDAS, R. A.; KARRON, R. A. Respiratory Syncytial Virus Vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 430-439, 1998.

DURBIN, A. P.; KARRON, R. A. Progress in the development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 1668-1677, 2003.

EMPEY, K. M.; PEEBLES, R. S. J.; KOLLS, J. K. Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. **Clin. Infect. Dis.**, v. 1, n. 50, n. 9, p. 1258-1267, May. 2010.

ERDMAN, D.D.; WEINBERG, G.A.; EDWARDS, K.M.; WALKER, F.J.; ANDERSON, B.C.; WINTER, J.; GONZÁLEZ, M.; ANDERSON, L.J. GeneScan Reverse Transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4298-4303, 2003.

FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Safety and immunogenicity of respiratory syncytial virus subunit vaccine (PFP-2) in the institutionalized elderly. **Vaccine**, v. 15, p. 1130-1132, 1997.

FALSEY, A. R. Respiratory syncytial virus infection in older persons. **Vaccine**, v. 16, n. 18, p. 1775-1778, 1998.

FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 3, p. 371-384, 2000.

FAN, J.; HENRICKSON, K. J.; SAVATSKI, L. L. Rapid simultaneous diagnosis of infection with respiratory syncytial viruses A and B, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridisation assay (Hexaplex). **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 1397-1402, 1998.

FEARNS, R.; COLLINS, P. L. Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. **J. Virol.**, v. 73, p. 388-397, 1999a.

FEARNS, R.; COLLINS, P. L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. **J. Virol.**, v. 73, p. 5852-5864, 1999b.

FELDMAN, S. A.; CRIM, R. L.; AUDET, S. A.; BEELER, J. A. Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex. **Arch. Virol.**, v. 146, p. 2369-2383, 2001.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**. v. 39, p. 783-791, 1985.

FENG, D. F.; DOOLITTLE, R. F.; Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. **J. Mol. Evol.**, v. 25, p. 351-360, 1987.

FERNIE, B.; DAPOLITO, G.; COTE, P. J. J.; GERIN, J. L. Kinetics of synthesis of respiratory syncytial virus glycoproteins. **J. Gen. Virol.**, v. 66, p. 1983-1990, Sep. 1985.

FODHA, I.; VABRET, A.; BOUSLAMA, L.; LEROUX, M.; LEGRAND, L.; DINA, J.; GOUARIN, S.; PETITJEAN, J.; DEWAR, J.; TRABELSI, A.; BOUJAAFAR, N.; FREYMUTH, F. Molecular diversity of the aminoterminal region of the G protein gene of human respiratory syncytial virus subgroup B. **Pathol. Biol. (Paris)**, v. 56, n. 2, p. 50-57, Mar. 2008.

FOSTER, J. et al. Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infection in children under 3 years of age (the PRI.DE study). **Eur. J. Pediatr.**, v. 163, p. 709-716, 2004.

FRABASILE, S.; DELFARO, A.; FACAL, L.; GALIANO, M.; de SIERRA, M. J.; RUCHANSKY, D.; VITUREIRA, N.; BEROIS, M.; CARBALLAL, G.; RUSSI, J.; ARBIZA, J. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. **J. Med. Virol.**, v. 71, p. 305-312, 2003.

FREYMUTH, F.; VABRET, A.; GALATEAU-SALLE, F.; FERREY, J.; EUGENE, G.; PETIGEAN, J.; GENNETAY, E.; BROUARD, J.; JOKIK, M.; DUHAMEL, J.; GUILLOIS, B. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza 3, adenovirus and rhinovirus sequence in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. **Clin. Diagn. Virol.**, v. 8, p. 31-40, 1997.

FUENTES, S.; TRAN, K. C.; LUTHRA, P.; TENG, M. N.; HE, B. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. **J Virol.**, v. 81, n. 15, p. 8361-8366, Aug. 2007.

GALIANO, M. C.; LUCHSINGER, V.; VIDELA, M. C.; SOUZA, L. D.; PUCH, S. S.; PALOMO, C.; RICARTE, C.; EBKIAN, B.; AVENDAÑO, L.; CARBALLAL, G. Intragroup antigenic diversity of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Argentina and Chile. **J. Méd. Virol. N.**, v. 7, p. 311-316, 2005.

GARCÍA-BEATO, R.; MARTÍNEZ, I.; FRANCÍ, C.; REAL, F. X.; GARCÍA-BARRENO, B.; MELERO, J. A. Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein. **Virology**. v. 15, n. 221, n. 2, p. 301-309, July, 1996.

GARCÍA-BARRENO, B.; PORTELA, A.; DELGADO, T.; LÓPEZ, J. Á.; MELERO J. A. Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus. **EMBO**, v. 9, n. 12, p. 4181-4187, 1990.

GARCIA, M. L. G.; REY, C. C.; VALLE, M. DEL.; HUERTAS, M. R. L.; FLECHA, I. C.; DIAS-DELEGADO, R.; BRENA, P. P. Infecciones respiratorias por metapneumovirus em lactantes hospitalizados. **Pediatrics**, v. 61, n. 3, p. 213-218, 2004.

GHILDYAL, R.; MILLS, J.; MURRAY, M.; VARDAXIS, N.; MEANGER, J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 753-757, 2002.

GILBERT, L. L.; DAKHAMA, A.; BONE, B. M.; THOMAS, E. E.; HEGELE, R. G. Diagnosis of viral respiratory syncytial virus tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 140-143, 1996.

GILCA, R.; SERRES, G. D.; TREMBLAY, M.; VACHON, M. L.; LEBLANC, E.; BERGERON, M. G.; DÉRY, P.; BOIVIN, G. Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. **J. Infect. Dis.**, v. 193, p. 54-58, 2006.

GIRARD, P. M.; CHERIAN, T.; KIENY, M. P. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. **Vaccine**, v. 23, p. 5708-5724, 2005. Review.

GLEZEN, W. P.; TABER, L. H.; FRANK, A. L.; KASEL, J. A. - Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. **Am. J. Dis. Child.**, v. 140, p. 543-546, 1986.

- GRAHAM, B. S. Biological challenges and technological opportunities for respiratory syncytial virus vaccine development. **Immunol. Rev.**, v. 239, n. 1, p. 149-166, Jan. 2011.
- GOTTSCHALK, J.; ZBINDEN, R. R.; KAEMPF, L.; HEINZER, I. Discrimination of respiratory syncytial virus subgroups A and B by reverse transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 41-43, 1996.
- GRDZELISHVILI, V. Z.; SMALLWOOD, S.; TOWER, D.; HALL, R. L.; HUNT, D. M.; MOYER, S. A. A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral mRNA cap methylation. **J. Virol.**, v. 79, p. 7327-7337, 2005.
- GRÖNDAHL, B.; PUPPER, W.; WEIGL, J.; SCHIMITT, H. J. Comparison of the BD Directigen Flu A + B Kit and the Abbott TestPack RSV with a multiplex RT-PCR ELISA for rapid detection of influenza viruses and respiratory syncytial virus. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 11, p. 848-850, 2005.
- GROOTHUIS, J. R.; GUTIERREZ, K. M.; LAUER, B. A. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. **Pediatrics**, v. 82, n. 2, p. 199-203, 1988.
- GROOTHUIS, J. R.; KIGH, S. J.; HOGERMAN, D. A.; PARADISO, P. R.; SIMÕES, E. A. Safety and immunogenicity of a purified F protein respiratory syncytial virus (PFP-2) vaccine in seropositive children with bronchopulmonary dysplasia. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 467-469, 1998.
- HALLAK, L. K.; COLLINS, P. L.; KNUDSON, W.; PEEPLES, M. E. Iduronic acid containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. **Virology**, v. 271, p. 264-275, 2000a.
- HALLAK, L. K.; SPILLMANN, D.; COLLINS, P. L.; PEEPLES, M. E. Glycosaminoglycan sulfation requirements for syncytial respiratory virus infection. **J. Virol.**, v. 74, p. 10508-10513, 2000b.
- HALL, C. B.; DOUGLAS, R. G. J. Clinically useful method for the isolation of respiratory syncytial virus. **J. Infect Dis.**, v. 131, n. 1, p. 1-5, 1975.
- HALL, C. B.; DOUGLAS, R. G.; GEINAM, J. M. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 293, n. 26, p. 1343-1346, 1975.

HALL, C. B.; WALSH, E. E.; SCHNABEL, K. C.; LONG, C. E.; MCCONNOCHIE, K. M.; HILDRETH, S. W.; ANDERSON, L. J. 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.**, v. 162, p. 1283-1290, 1990.

HALL, C. B.; WALSH, E. E.; LONG, C. E.; SCHNABEL, K. C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **J. Infect. Dis.**, 163, p. 693-698, 1991.

HALL, C. B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. **N. Engl. J. Med.** V. 344, p. 1917-1928, 2001

HAN, L. L.; ALEXANDER, J. P.; ANDERSON, L. J. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. **J. infect. Dis.**, v. 179, p. 25-30, 1999.

HARDY, R. W.; HARMON, S. B.; WERTZ, G. W. Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. **J. Virol.**, v. 73, p. 170-176, 1999.

HARDY, R. W.; WERTZ, G. W. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. **J. Virol.** v. 72, p. 520-526, 1998.

HARRINGTON, R. D. et al. An outbreak of respiratory syncytial virus infection in a bone marrow transplant center. **J. Infect. Dis.**, v. 6, p. 987-993, 1992.

HEIN, N. **Aspectos epidemiológicos da infecção por vírus respiratórios em crianças internadas.** 1997. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

HENDRY, R. M.; TALIS, A. L.; GODFREY, E.; ANDERSON, L. J.; FERNIE, B. F.; MCINTOSH, K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. **J. Infect. Dis.**, v. 153, p. 291-297, 1986.

HENDRY, R. M.; BURNS, J. C.; WALSH, E. E.; WRIGGT, P. F.; HEMMING, V. G.; RODRIGUEZ, W. J.; KIM, H. W.; PRINCE, G. A.; McINTOSH, K. Strain-specific serum antibody responses in infants undergoing primary infection with respiratory syncytial virus. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p. 640-647, 1988.

HENRICKSON, K. J. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 23, n. 1, p. S6-S10, Jan. 2004. Supplement.

HERCYK, N.; HORIKAMI, S. M.; MOYER, S. A. The vesicular stomatitis virus L protein possesses the mRNA methyltransferase activities. **Virology**, v. 163, p. 222-225, 1988.

HITE, S. A.; HUANG, V. T. Microwave-accelerated direct immunofluorescent staining for respiratory syncytial virus and influenza A virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1819-1820, July 1996.

HOLMAN, R. C.; CURNS, A. T.; CHEEK, J. E.; BRESEE, J.S.; SINGLETON, R. J.; CARVER, K.; ANDERSON, L. J. Respiratory syncytial virus hospitalizations among American Indian and Alaska Native infants and the general United States infant population. **Pediatrics.**, v. 114, n. 4, p. e437-e444, Oct. 2004.

HOMA, F. L.; BRIDEAU, R. J.; LEHMAN, D. J.; THOMSEN, D. R.; OLMSTED, R. A.; WATHEN, M. W. Development of a novel subunit vaccine that protects cotton rats against both human respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type-3. **Gen. Virol.**, v. 74, 1999.

HORNSLETH, A.; KLUG, B.; NIR, M.; JONHANSEN, J.; HANSEN, K. S.; CHISTENSEN, L. S.; LARSEN, L. B. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 17, p. 1114-1121, 1998.

HU, A.; COLELLA, M.; TAM, J. S.; RAPPAPORT, R.; CHENG, S. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 149-154, 2003.

HUANG, Y. T.; WERTZ, G. W. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. **J. Virol.**, v. 43, n. 1, p. 150-157, 1982.

HUANG, Y.; TANG, H.; DUFFY, S.; HONG, Y.; NORMAN, S.; GHOSH, M.; HE, J.; BOSE, M.; HENRICKSON, K. J.; FAN, J.; KRAFT, A. J.; WEISBURG, W. G.; MATHER, E. L. Multiplex assay for simultaneously typing and subtyping influenza viruses by use of an electronic microarray. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, v. 2, p. 390-396, Feb, 2009.

IMAZ, M. S.; SEQUEIRA, M. D.; VIDELA, C.; VERONESSI, I.; COCIGLIO, R.; ZERBINI, E.; CARBALLAL, G. Clinical and epidemiological characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fé, Argentina. **J. Med. Virol.**, v. 61, p. 76-80, 2000.

ISON, M. G.; HAYDEN, F. G. Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 15, p. 355-367, 2002.

IWANE, M. K.; EDWARDS, K. M.; SZILAGYI, P. G.; WALKER, F. J.; GRIFFIN, M. R.; WEINBERG, G. A.; COULEN, C.; POEHLING, K. A.; SHONE, L. P.; BALTER, S.; HALL, C. B.; ERDMAN, D. D.; WOOTEN, K.; SCHWARTZ, B.; NEW VACCINE SURVEILLANCE NETWORK. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. **Pediatrics**, v. 113, n. 6, p. 1758-1764, June 2004.

JENKINS, G. M.; RAMBAUT, A.; PYBUS, O. G.; HOLMES, E. C. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. **J. Mol. Evol.**, v. 54, n. 2, p. 156-65, Feb. 2002.

JENTOFT, N. Why are proteins O-glycosylated? **Trends. Biochem. Sci.**, v. 15, n. 8, p. 291-294, Aug. 1990.

JOHANSEN, J.; CHRISTENSEN, L. S.; HORNSLETH, A.; KLUG, B.; HANSEN, K. S.; NIR, M. Restriction pattern variability of respiratory syncytial virus during three consecutive epidemics in Denmark. **APMIS**, v. 105, n. 4, p. 303-308, Apr. 1997.

JOHNSON, P. R.; SPRIGGS, M. K.; OLMSTED, R. A.; COLLINS, P. L. The glycoprotein of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: Extensive sequence divergence between antigenically related proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 5625-5629, 1987.

KAPLAN, N. M.; DOVE, W.; ABD-ELDAYEM, S. A.; ABU-ZEID, A. F.; SHAMOON, H. E.; HART, C. A. Molecular epidemiology and disease severity of respiratory syncytial virus in relation to other potential pathogens in children hospitalized with acute respiratory infection in Jordan. **J. Med. Virol.**, v. 80, n. 1, p. 168-174, Jan. 2008.

KARRON, R. A.; BUONAGURIO, D. A.; GEORGIU, A. F.; WHITEHEAD, S. S.; ADAMUS, J. E.; CLEMENTS-MANN, M. L.; HARRIS, D. O.; RANDOLPH, V. B.; UDEM, S. A.; MURPHY, B. R.; SIDHU, M. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passage, attenuated RSV subgroup B mutant. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, p. 13961-13966, 1997.

KEHL, S. C.; HENRICKSON, K. J.; HUA, W.; FAN, J. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1696-1701, 2001.

KELLOG, J. A. Culture vs direct antigen assay for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 115, p. 451-458, 1991.

KIM, Y. K.; CHOI, E. H.; LEE, H. J. Genetic variability of the fusion protein and circulation patterns of genotypes of the respiratory syncytial virus. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 6, p. 820-828, Jun. 2007.

KINGSBURY, D. W. Paramyxoviridae and their replication. In: FIELDS, B. N. **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1990. p. 945-962.

KRUSAT, T.; STRECKERT, H. J. Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. **Arch. Virol.**, v. 142, n. 6, p. 1247-1254, 1997.

KOCHVA, U.; LEONOV, H.; ARKIN, I. T. Modeling the structure of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein by silent-mutation analysis of global searching molecular dynamics. **Protein Sci.**, v. 12, n. 12, p. 2668-2674, Dec. 2003.

KUMAR, S.; WANG, L.; FAN, J.; KRAFT, A.; BOSE, M. E.; TIWARI, S.; VANDYKE, M.; HAIGIS, R.; LUO, T.; GHOSH, M.; TANG, H.; HAGHNIA, M.; MATHER, E. L.; WEISBURG, W. G.; HENRICKSON, K. J. Detection of 11 common viral and bacterial pathogens causing community-acquired pneumonia or sepsis in asymptomatic patients by using a multiplex reverse transcription-PCR assay with manual (enzyme hybridization) or automated (electronic microarray) detection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 9, p. 3063-3072, Sep. 2008.

KUYPERS, J.; WRIGHT, N.; FERRENBURG, J.; HUANG, M. L.; CENT, A.; COREY, L.; MORROW, R. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 7, p. 2382-2388, July 2006.

KWILAS, S.; LIESMAN, R. M.; ZHANG, L.; WALSH, E.; PICKLES, R. J.; PEEPLES M, E. Respiratory syncytial virus grown in Vero cells contains a truncated attachment protein that alters its infectivity and dependence on glycosaminoglycans. **J. Virol.**, v. 83, n. 20, p. 10710-10718, Oct. 2009.

LAMBERT, D. M. Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. **Virology**, v. 164, n. 2, p. 458-466, June 1988.

LANGEDIJK, J. P. M.; SHAAPER, W. M. M.; MELOEN, R. H.; vanOIRSCHOT, J. T. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1249-1257, 1996.

LEADER, S.; KOHLHASE, K. Respiratory syncytial virus-coded pediatric hospitalizations, 1997 to 1999. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 21, n. 7, p. 629-632, July 2002.

LEVINE, S.; KLAIBER-FRANCO, R.; PARADISO, P. R. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.**, v. 68, n. 9, p. 2521-2524, 1987.

LICHTENSTEIN, D. L.; ROBERTS, S. R.; WERTA, G. W.; BALL, A. Definition and functional analysis of the signal/anchor domain of the human respiratory syncytial virus glycoprotein G. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 109-118, 1996.

LIUZZI, M.; MASON, S. W.; CARTIER, M.; LAWETZ, C.; MCCOLLUM, R. S.; DANSEREAU, N.; BOLGER, G.; LAPEYRE, N.; GAUDETTE, Y.; LAGACÉ, L.; MASSARIOL, M. J.; DÔ, F.; WHITEHEAD, P.; LAMARRE, L.; SEOUTEN, E.; BORDELEAU, J.; LANDRY, S.; RANCOURT, J.; FAZAL; SIMONEAU, B. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA quanylylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. **J. Virol.**, v. 79, p. 13105-13115, 2005.

LOPEZ, J. A.; PENAS, C.; GARCIA-BARRENO, B.; MELERO, J. A.; PORTELA A. Location of a thightly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus. **J. Virol.**, v. 64, p. 927-930, 1990.

LÓPEZ, J. A.; BUSTOS, R.; ORVELL, C.; BEROIS, M.; ARBIZA, J.; GARCIA-BARRENO, B.; MELERO, J. A. Antigenic structure of human respiratory syntycial virus fusion glycoprotein. **J. Virol.**, v. 72, p. 6922-6928, 1998.

LOW, K. W.; TAN, T.; NG, K.; TAN, B.H.; SUGRUE, R. J. The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. **Biochem Biophys Res. Commun.**, v. 8, n. 366, n. 2, p. 308-313, Feb. 2008.

LUKIC-GRLIC, A.; CANE, P. A.; BACE, A.; PRINGLE, C. R.; MLINARIC-GALINOVIC, G.; POPOW-KRAUPP, Th. Antigenic and genomic diversity of central European respiratory syncytial virus strains. **Arch. Virol.**, v. 143, p. 1441-1447, 1998.

MACKIE, P. L. K.; GETTY, S.; PATON, J. Y. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus by using pernasal swabs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, p. 2653-2655, 1991.

MACLELLAN, K.; LOEY, C.; YEO, R. P.; BHELLA, D. The 24-Angstrom structure of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein-RNA decameric rings. **J. Virol.**, v. 81, p. 9519-9524, 2007.

MARTINEZ, I.; VALDES, O.; DELFRARO, A.; ARBIZA, J.; RUSSI, J.; MELERO, J. A. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 125-130, 1999.

MARTINEZ, I.; MELERO, J. A. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sultdated cell surface proteoglycans. **J. Virol.**, v. 81, p. 2715-2722, 2000.

MASTERS, H. B.; WEBER, K. O.; GROOTHUIS, J. R.; WREN, C. G.; LAUER, B. A. Comparison of nasopharyngeal washing and swabs specimens for diagnosis of respiratory syncytial virus by EIA, FAT and Cell culture. **Diagn. Microbial. Dis.**, v. 8, p. 101-105, 1987.

MATHESON, J. W.; RICH, F. J.; COHET, C.; GRIMWOOD, K.; HUANG, Q. S.; PENNY, D.; HENDY, M. D.; KIRMAN, J. R. Distinct patterns of evolution between respiratory syncytial virus subgroups A and B from New Zealand isolates collected over thirty-seven years. **J. Med. Virol.**, v. 78, n. 10, p. 1354-1364, Oct. 2006.

MATTHEWS, J. M.; YOUNG, T. F.; TUCKER, S. P.; MACKAY, J. P. The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. **J. Virol.**, v. 74, p. 5911-5920, 2000.

MCCONNOCHIE, K. M.; HALL, C. B.; WALSH, E. E.; ROGHMANN, K. J. Variation in severity of respiratory syncytial virus infection with subtype. **J. Pediatr.**, v. 117, p. 52-62, 1990.

MCDONALD, N. E.; HALL, C. B.; SUFFIN, S. C.; ALEXSON, C.; HARRIS, P. J.; MANNING, J. A. Respiratory syncytial virus infection in infants with congenital heart disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 307, p. 397-400, 1982.

MCINTOSH, E. D.; SILVA, L. M.; OATES, R. K. Clinical severity of respiratory syncytial virus group A and B infection in Sidney, Austrália. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 12, n. 10, p. 815-819, 1993.

MCLAURIN, K.; LEADER, S. Growing impact of RSV hospitalizations among infants in the US, 1997-2002. In: PEDIATRIC ACADEMIC SOCIETIES' MEETING, 2005, Washington, DC. **Abstracts...** Washington, DC, 2005.

MELERO, J. A.; GARCIA-BARRENO, B.; MARTINEZ, I.; PRINGLE, C. R.; CANE, P. Antigenic Structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 2411-2418, 1997.

MELLO, W.A.; SILVA, C. Epidemiological aspects of RSV subgroups in Belém, Brazil. *Boletim Latino-americano* 1: 8, 1992.

METEYARD, J. D.; YOUNG, P. R. Optimization of PCR and automated sequencing of clinical isolates of respiratory syncytial virus. **J. Virol. Methods**, v. 50, p. 335-342, 1994.

MLINARIC-GALINOVIC, G.; VOJNOVIC, G.; CEPIN-BOGOVIC, J.; BACE, A.; BOZIKOV, J.; WELLIVER, R. C.; WAHN, U.; CEBALO, L. Does the viral subtype influence the biennial cycle of respiratory syncytial virus? **Virol. J.**, v. 7, n. 6, p. 133, Sep. 2009.

MILLER, H.; MILK, R. AND DIAZ-MITOMA, F. Comparison of the VIDAS RSV assay and abbot testpack RSV with direct immunofluorescence for detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 1336-1338, 1993.

MIYAO, C. R.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S.; HEIN, N.; PAHL, M. M. C.; BETTA, S. L.; DURIGON, E. L.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; BOTOSSO, V. F.; GOMES, M. C. S.; LOPES, C. L. B. C.; EJZEMBERG, B.; OKAY, Y. Infecções Virais em crianças internadas por doença respiratória aguda do trato respiratório inferior. **J. Pediatr.**, v. 75, p. 334-344, 1999.

MORRIS, J. A.; BLOUNT, R. E. J.; SAVAGE, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 92, n. 3, p. 544-549, July, 1956.

MOURA, F. E.; BORGES, L. C.; PORTES, S. A.; RAMOS, E. A.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory Syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description o clinical. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 98, n. 6, p. 739-743, 2003.

MOURA, F. E.; BLANC, A.; FRABASILE, S.; DELFRARO, A.; DE SIERRA, M. J.; TOME, L.; RAMOS, E. A.; SIQUEIRA, M. M.; ARBIZA, J. Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. **J. Med. Virol.**, v. 74, n. 1, p. 156-160, Sep. 2004.

MOURA, F. E.; NUNES, I. F.; SILVA, G. B. J.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory syncytial virus infection in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74. n. 1, p. 165-167, 2006.

MOORE, H. C.; KLERK, N.; RICHMOND, P.; KEIL, A. D.; LINDSAY, K.; PLANT, A.; LEHMANN, D. Seasonality of respiratory viral identification varies with age and Aboriginality in metropolitan Western Australia. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, n. 7, p. 598-603, July, 2009.

MUFSON, M. A.; ORVELL, C.; RAFNAR, B.; NORRBY, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.**, v. 10, p. 2111-2124, 1985.

MULLINS, J. A.; ERDMAN, D. D.; WEINBERG, G. A.; EDWARDS, K.; HALL, C. B.; WALKER, F. J.; IWANE, M.; ANDERSON, L. J. Human metapneumovirus igection among children hospitalized with acute respiratory illness. **Emer. Infect. Dis.**, v. 10, p. 700-705, 2004.

NAGAI, K.; KAMASAKI, H.; KUROIWA, Y. OKITA, L.; TSUTSUMI, H. Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. **J. Med. Virol.**, v. 74, p. 161-165, 2004.

NASCIMENTO, C. A.; LEAL, A. L.; SOUZA, T. S.; MORAES, C. T. P.; COMONE, P.; TENORIO, E. C. N.; VEDOVELLO, D.; QUINZANI, R. H. A.; GILIO, A. E.; VIEIRA, S. E.; DURIGON, E. L.; BOTOSSO, V. F.; SANT'ANNA, O, A. One Step reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of respiratory syncytial virus in children. **J. Virol. Med.**, v. 148, p. 115-119, 2008.

NASCIMENTO, J. P.; SIQUEIRA, M. M.; SUTMOLLER, F. Longitudinal study of acute respiratory disease in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Rev. Inst. Med. São Paulo**, v. 3, p. 287-296, 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2008. 1100 p.

NOKES, J. D.; CANE, P. A. New strategies for control of respiratory syncytial virus infection. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21. n. 6, p. 639-643, Dec. 2008.

NOLTE, F. S.; MARSHALL, D. J.; RASBERRY, C.; SCHIEVELBEIN, S.; BANKS, G. G.; STORCH, G. A.; ARENS, M. Q.; BULLER, R. S.; PRUDENT, J. R. MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 9, p. 2779-2786, Sep. 2007.

OGINO, T.; KOBAYASHI, M.; IWAMA, M.; MIZUMOTO, K. Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 4429-4435, 2005.

OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. **Pediatrics**, p. S119-S126, 2004. Review. Suppl A.

OIEN, N. L.; BRIDEAU.; WALSH, E. E.; WATHEN, M. W. Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric FG glycoprotein and cholera toxin B subunit. **Vaccine**, v. 12, p. 731-735, 1994.

OHN-SMITH, M. J.; NASSOS, P. S.; HALLER, B. L. Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen, and BD Directigen EZ Assays for Detection of Respiratory Syncytial Virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 2996-2999, 2004.

OLIVEIRA, T.F.; FREITAS, G. R.; RIBEIRO, L. Z.; YOKOSAWA, J.; SIQUEIRA, M. M.; PORTES, S. A.; SILVEIRA, H. L.; CALEGARI, T.; COSTA, L. F.; MANTESE, O. C.; QUEIRÓZ, D. A. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 103, n. 5, p. 417-422, Aug. 2008.

OSTLUND, M. R.; LINDELL, A. T.; STENLER, S.; RIEDEL, H. M.; WIRGART, B. Z.; GRILLNER, L. Molecular epidemiology and genetic variability of respiratory syncytial virus (RSV) in Stockholm, 2002-2003. **J. Med. Virol.**, v. 80, n. 1, p. 159-67, Jan. 2008.

PARVEEN, S., S. BROOR, S. K. KAPOOR, K. FOWLER, AND W. M. SULLENDER.. Genetic diversity among respiratory syncytial viruses that have caused repeated infections in children from rural India. **J. Med. Virol.**, v. 78, p. 659-665, 2006.

PECCHINI, R.; BEREZIN, E. N.; FELÍCIO, M. C.; PASSOS, S. D.; SOUZA, M. C.; LIMA, L. R.; UEDA, M.; MATSUMOTO, T. K.; DURIGON, E. L. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 6, p. 476-479, 2008.

PERDIGÃO, A. C. B. **Caracterização molecular dos vírus sincicial respiratório humano circulantes em Fortaleza-Ceará durante cinco períodos epidêmicos consecutivos (2004-2008)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2009.

PERET, T. C. T.; HALL, C. B.; SCHNABEL, K. C.; GOLUB, J. A.; ANDERSON, L. J. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. **J. Gen. Virol.**, v. 79, p. 2221-2229, 1998.

PERET, T. C. T.; HALL, C. B.; HAMMOND, G. W.; PIEDRA, P. A.; STORCH, G. A.; SULLENDER, W. M.; TSOU, C.; ANDERSON, L. J. Circulation patterns of groups A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1891-1896, 2000.

PIEDRA, P. A.; GRACE, S.; JEWELL, A.; SPINELLI, S.; BUNTING, D.; HOGERMAN, D. A.; MALINOSKI, F.; HIATT, P. W. Purified fusion protein vaccine protects against lower respiratory tract illness during respiratory syncytial virus season in children with cystic fibrosis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 15, p. 23-31, 1996.

PIEDRA, P. A.; GRACE, S.; JEWELL, A.; SPINELLI, S.; HOGERMAN, D. A.; MALINOSKI, F.; et al. Sequential annual administration of purified fusion protein vaccine against respiratory syncytial virus in children with cystic fibrosis. **Pediatric Infect. Dis.**, 17: 217-24, 1998.

PITKÄRANTA, A.; JERO, J.; ARRUDA, E.; VIROLAINEN, A.; HAYDEN, F. G. Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion. **J. Pediatr.**, v. 133, n. 3, p. 390-394, 1998a.

PITKÄRANTA, A.; VIROLAINEN, A.; JERO, J.; ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G. Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Pediatrics**, v. 102, n. 2, p. 291-295, 1998b.

POLACK, F. P. et al. A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 859-865, 2002.

QUEIROZ, D. A.; DURIGON, E. L.; BOTOSSO, V. F.; EJZEMBERG, B.; VIEIRA, S. E.; MINEO, J. R.; YAMASHITA, C.; HEIN, N.; LOPES, C. L.; CACHARO, A. L.; STEVIEW, K. E. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 10, p. 1183-1193, 2002.

RAMILO, O. Evolution of prophylaxis: MoAb, siRNA, vaccine, and small molecules. **Pediatr. Respir. Rev.**, v. 1, n. 10, p. 23-55., June 2009. Review, Suppl.

RANDOLPH, V. B.; KANDIS, M.; STEMLER-HIGGINS, P.; KENNELLY, M. S.; MCMULLEN, Y. M.; SPEELMAN, D. J.; WEEKS-LEVY, C. Attenuated temperature-sensitive respiratory syncytial virus mutants generated by cold adaptation. **Virus Res.**, v. 33, p. 241-259, 1994.

RAMBAUT, A.; CHARLESTON, M. TreeEdit: phylogenetic tree editor v.1.0 alpha 8. 2001. Oxford: University of Oxford. Available: <http://evolve.zoo.ox.ac.uk>).

REICHE, J.; SCHWEIGER, B. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47. n. 6, p. 1800-1810, Jun. 2009.

REIS, A. D.; FINK, M. C.; MACHADO, C. M.; PAZ, J. D. E. P. J.; OLIVEIRA, R. R.; TATENO, A. F.; MACHADO, A. F.; CARDOSO, M.R.; PANNUTI, C. S.; CHIADO AND RDGV/FAPESP RESEARCH GROUPS. Comparison of direct immunofluorescence, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates from infants. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 50. n. 1, p. 37-40, Jan.-Feb. 2008.

REN, L.; GONZALES, R.; WANG, Z.; XIANG, Z.; WANG, Y.; ZHOU, H.; LI, J.; XIAO, Y.; YANG, Q.; ZHANG, J.; CHEN, L.; WANG, W.; LI, T.; MENG, X.; ZHANG, Y.; VERNET, G.; PARANHOS-BACCALÀ, G.; CHEN, J.; JIN, Q.; WANG, J. Prevalence of human respiratory syncytial virus in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, 2005-2007. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15, p. 1146-1153, 2009.

RIBES, J. A.; SEABOLT, J. P.; OVERMAN, S. B. Performance characteristics of VIDAS and Directigen respiratory syncytial virus (RSV) antigen detection assay and culture for the identification of RSV in respiratory specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1818-1820, 2002.

RIXON, H. W. M.; BROWN, G.; SUGRUE, R. J. Multiple glycosylated forms of the respiratory syncytial virus fusion protein are expressed in virus-infected cell. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 61-66, 2002.

RIXON, H. W. M.; BROWN, G.; AITKEN, J.; McDONALD, T.; GRAHAM, S.; SUGRUE, R. J. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. **J. Gen. Virol.**, v. 85, p. 1153-1165, 2004.

ROVIDA, F.; PERCIVALLE, E.; ZAVATTONI, M.; TORSSELLINI, M.; SARASINI, A.; CAMPANINI, G.; PAOLUCCI, S.; BALDANTI, M.; REVELLO, M. G.; GERNA, G. Monoclonal antibodies versus reverse transcription-PCR for detection of respiratory viruses in a patient population with respiratory tract infections admitted to hospital. **J. Med. Virol.**, v. 75, p. 336-347, 2005.

RUSSI, J. C.; CHIAPARELLI, H.; MONTANO, A.; ETORENA, P.; HORTAL, M. Respiratory syncytial virus subgroups and pneumonia in children. **Lancet**, v. 2, p. 1039-1040, 1989a.

RUSSI, J. C. et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus associated with acute respiratory infections in Uruguayan children from 1985 to 1987. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 1464-1466, 1989b.

RUUSKANEN, O.; OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus. **Curr. Probl. Pediatr.** V. 23, p. 50-79, 1993.

SANGARÉ, L.; CURTIS, M. P.; AHMAD, S. Hospitalization for respiratory syncytial virus among California infants: disparities related to race, insurance, and geography. **J. Pediatr.**, v. 149, n. 3, p. 373-377, Sep, 2006.

SANZ, M. C.; KEW, O. M.; ANDERSON, L. J. Genetic Heterogeneity of the attachment glycoprotein G among group A respiratory Syncytial viruses. **Virus Res.**, v. 33, p. 203-217, 1994.

SARKKINEN, H. K.; HALONEN, P. E.; ARSTILA, P. P.; SALMI, A. A. Detection of respiratory syncytial, parainfluenza type 2, and adenovirus antigens by radioimmunoassay and enzymeimmunoassay on antigens by specimens from children with acute respiratory disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 13, n. 2, p. 258-265, 1981.

SASTRE, P.; MELERO, J. A.; BARRENO-GARCÍA, B.; PALOMO, CONCEPCIÓN. Comparison of antibodies directed against human respiratory syncytial virus antigens present in two commercial preparations of human immunoglobulins with different neutralizing activities. **Vaccine**, v. 23, p. 435-443, 2004.

SATO, M.; SAITO, R.; SAKAI, T.; SANO, Y.; NISHIKAWA, M.; SASAKI, A.; SHOBUGAWA, Y.; GEJYO, F.; SUZUKI, H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections in children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 36-40, 2004.

SATO, M.; SAITO, R.; SAKAI, T.; SANO, Y.; NISHIKAWA, M.; SASAKI, A.; SHOBUGAWA, Y.; GEJYO, F.; SUZUKI, H. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 1, p. 36-40, Jan, 2005.

SCHICKLI; J. H.; DUBOVSKY, F.; TANG, R. S. Challenges in developing a pediatric RSV vaccine. **Hum. Vaccin.**, v. 5, n. 9, p. 582-591, Sep. 2009, Review.

SCHMIDT, A. C.; COUCH, R. B.; GALASSO, G. J.; HAYDEN, F. G.; MILLS, J.; MURPHY, B. R.; Chanock, R. M. Current research on respiratory viral infections: Third International Symposium. **Antivir. Res.**, v. 50, n. 3, p. 157-196, 2001.

SCHMIDT, A. C.; MCAULIFFE, J. M.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L. Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. **J. Virol.**, v. 75, n. 10, p. 4594-603, 2001.

SERAFINO, R. L.; GURGEL, R. Q.; DOVE, W.; HART, C. A.; CUEVAS, L. E. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus in children over two seasons with a high incidence of respiratory infections in Brazil. **Ann. Trop. Pediatr.**, v. 24, n. 3, p. 213-217, 2004.

SCOTT, P. D. et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. **J. Med. Virol.**, v. 74, p. 344-345, 2004.

SCOTT, P. D.; OCHOLA, R.; NGAMA, M.; OKIRO, E. A.; NOKES, D. J.; MEDLEY, G. F.; CANE, P. A. Molecular analysis of respiratory syncytial virus reinfection in infants from Coastal Kenya. **J. Infect. Dis.**, v. 193, p. 59-67, 2006

SELVARANGAN, R.; ABEL, D.; HAMILTON, M. Comparison of BD Directigen EZ RSV and Binax NOW RSV tests for rapid detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates in a pediatric population. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 2, n. 2, p. 157-161, Oct. 2008.

SHAY, D. K.; HOLMAN, R. C.; NEWMAN, R. D.; LIU, L. L.; STOUT, J. W.; ANDERSON, L. J. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. **JAMA.**, v. 282, n. 15, p. 1440-1446, Oct. 1999.

SHOBUGAWA, Y.; SAITO, R.; SANO, Y.; ZARAKET, H.; SUZUKI, Y.; KUMAKI, A.; DAPAT, I.; OGUMA, T.; YAMAGUCHI, M.; SUZUKI, H. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 8, p. 2475-2482, Aug. 2009.

SIGURS, N.; BJARNASON, R.; SIGURBERGSSON, F.; KJELLMAN, B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 161, p. 1501-1507, 2000.

SIGURS, N.; GUSTAFSSON, P. M.; BJARNASON, R. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 171, p. 137-141, 2005.

daSILVA, L. H.; SPILKI, F. R.; RICCETTO, A. G.; DE ALMEIDA, R. S.; BARACAT, E. C.; ARNS, C. W. Genetic variability in the G protein gene of human respiratory syncytial virus isolated from the Campinas metropolitan region, Brazil. **J. Med. Virol.**, v. 80, n. 9, p. 1653-1660, Sep. 2008.

SIMON, A.; KHURANA, K.; WILKESMANN, A.; MÜLLER, A.; ENGELHART, S.; EXNER, M.; SCHILDGEN, O.; EIS-HÜBINGER, A. M.; GROOTHUIS, J. R.; BODE, U. Nosocomial respiratory syncytial virus infection: impact of prospective surveillance and targeted infection control. **Int. J. Hyg. Environ. Health.**, v. 209, n. 4, p. 317-324, July, 2006.

SMITH, E. C.; POPA, A.; CHANG, A.; MASANTE, C.; DUTCH, R. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. **The FEBS Journal**, v. 276, p. 7217-7227, 2009.

SIMOES, E. A. Environmental and demographic risk factors for respiratory syncytial virus lower respiratory tract disease. **J. Pediatr.**, v. 143, n. 5, p. S118-26, Nov. 2003.

SIQUEIRA, M. M.; NASCIMENTO, J. P.; ANDERSON, L. J. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, V. 29, P. 557-559, 1991.

SLINGER, R.; MILK, R.; GABOURY, I.; DIAZ-MITOMA, F. Evaluation of the QuickLab RSV Test, a new rapid lateral-flow immunoassay for detection of respiratory syncytial virus antigen. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 3731-3733, 2004.

STENSBALLE, L. G.; DEVASUNDARAM, J. K.; SIMOES, E. A. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 22, n. 2, p. S21-S32, 2003.

STENSBALLE, L. G.; RAVN, H.; KRISTENSEN, K.; MEAKINS, T.; AABY, P.; SIMOES, E. A. Seasonal variation of maternally derived respiratory syncytial virus antibodies and association with infant hospitalizations for respiratory syncytial virus. *J. Pediatr.*, v. 154, n. 2, p. 296-298, Feb. 2009.

STRALIOTTO, S. M.; ROITMAN, B.; LIMA, J. B.; FISHER, G. B.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis: comparative study of RSV groups A and B infected children. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 27, n. 1, p. 1-4, 1994.

STRALIOTTO, S. M.; NESTOR, S. M.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory Syncytial Virus Groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* vol. 96, n. 2, p. 155-158, Feb, 2001.

SUGRUE, R. L. Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not requirement for its transport to the surface of virus-infected cell. *J. Gen. Virol.*, v. 82, p. 1375-1386, 2001,

SULLENDER, W. M.; MUFSON, M. A.; ANDERSON, L. J.; WERTZ, G. W. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J. Virol.*, v. 65, n. 10, p. 5425-5434. Oct. 1991.

SULLENDER, W. M. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 13, p. 1-15, 2000.

SUTMOLLER, F.; ANDRADE FERRO, Z. P.; ASENI, M. D.; FERREIRA, V.; MAZZEI, I. S.; CUNHA, B. L. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and Hospital study in Rio de Janeiro. *Clin. Inf. Dis.*, v. 20, p. 854-860, 1995.

STEIN, R. T.; SHERRIL, D.; MORGAN, W. J. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. **Lancet**, v. 354, p. 541-545, 1999.

TANG, R. S.; NGUYEN, N.; CHENG, X.; JIN, H. Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. **J. Virol.**, v. 75, p. 11328-11335, 2001.

TAYLOR, G.; STOTT, E. B. J.; BEW, M. Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. **Immunology**, v. 52, p. 137-142, 1984.

TAYLOR, C. E.; MORROW, S.; SCOTT, M.; YOUNG, B.; TOMS, G. J. Comparative virulence of respiratory syncytial virus subgroups A and B. **Lancet**, v. 1, p. 777-778, 1989.

TECHAARPORNKUL, S.; BARRETTO, N.; PEEPLES, M. E.; Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or glycoprotein gene. **J. Virol.**, v. 75, p. 6825-6834, 2001.

THOMAZELLI, L. M. **Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pela técnica de GeneScan-RT-PCR**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TILLMANN, R. L.; SIMON, A.; MÜLLER, A.; SCHILDGEN, O. Comparison of in-house PCR, rapid ELISA and NASBA technology for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimen. **J. Clin. Virol.**, v. 41, n. 2, p. 168-169, Feb. 2008.

TRAN, T. L.; CASTAGNÉ, N.; BHELLA, D.; VARELA, P. F.; BERNARD, J.; CHILMONCZYK, S.; BERKENKAMP, S.; BENHAMO, V.; GRZNAKOVA, K.; GROSCLAUDE, J.; NESPOULOS, C.; REY, F. A.; ELÉOUËT, J. F. The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. **J. Gen. Virol.**, v. 88, p. 196-206, Jan. 2007.

TRENTO, A.; GALIANO, M.; VIDELA, C.; CARBALLAL, G.; GARCIA-BUENO, B.; MELERO, J. A.; PALOMO, C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 pb nucleotides. **J. Gen. Virol.**, v. 84, p. 3115-3120, 2003.

TRENTO, A.; VIEGAS, M.; GALIANO, M.; VIDELA, C.; CARBALLAL, G.; MISTCHENKO, A. S.; MELERO, J. A. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. **J. Virol.**, v. 80, n. 2, p. 975-984, Jan. 2006.

TRENTO, A.; CASAS, I.; CALDERÓN, A.; GARCIA-GARCIA, M. L.; CALVO, C.; PEREZ-BREÑA, P.; MELERO, J. A. Ten Years of Global Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus BA Genotype with a 60-Nucleotide Duplication in the G Protein Gene. **J. Virol.**, v. 84, n. 15, p. 7500-7512, Aug. 2010.

TRISTAM, D. A.; WELLIVER, R. C. Respiratory syncytial virus. In: LENNETTE, E. H.; LENNETTE, D. A.; LENNETTE, E. T. (Ed.). **Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections**. 7th ed. Washington: American Public Health Association, 1995. p. 539-552.

TRISTAM, D. A.; WELLIVER, R. C. Respiratory syncytial virus. In Diagnostic. Procedure for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7th ed. **American Public Health Association**, 1996.

TURNER, R. B. Nosocomial viral respiratory infections. In: MAYHALL, C. G. (Ed.) **Pediatric Patients**. Hospital Epidemiology and Infection Control, 1996. p. 485-493.

VALDIVIA, A.; SAVÓN, C.; CHACÓN, D.; SARMIENTO, L.; MORIER, L.; OTERO, A.; SOTO, Y.; OROPESA, S.; GOYENECHEA, A. Analysis of respiratory syncytial virus in clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction restriction mapping. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 3, p. 389-393, 1997.

vanREGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M. ; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy**: Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000.

VENTER, M.; MADHI, S. A.; TIEMESSEN, C. T.; SCHOUB, B. D. Genetic 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.**, v. 82, p. 2117-2124, 2001.

VENTRE, K.; RANDOLPH, A. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. **Cochrane Database Syst. Rev.** 4: CD000181, 2004

VIEGAS, M.; MISTCHENKO, A, S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004) in Argentina. **J. Med Virol.**, v. 77, p. 302-310, 2005.

VIEIRA, S. E.; STEWIEN, K. E.; QUEIROZ, D. A. O.; DURIGON, E. L.; TÖRÖK, T. J.; ANDERSON, L. J.; MIYAO, C. R.; HEIN, N.; BOTOSSO, V. F.; PAHL, M. M.; GILIO, A. E.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 43, n. 3, p. 125-131, 2001.

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.**, v. 80, n. 4, p. 724-732, Apr, 2008.

WALSH, E. E.; FALSEY, A. R.; SULLENDER, W. M. Monoclonal antibody neutralization escape mutants of respiratory syncytial virus with unique alterations in the attachment (G) protein. **J. Gen. Virol.**, v. 79, n. 3, p. 479-487, 1998.

WALSH, E. E.; FALSEY, A. R.; SWINBURNE, I. A.; FORMICA, M. A. Reverse Transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for diagnosis of respiratory infection in adults: Use of Single-Tube "Hanging Droplet" Nested PCR. **J. Med Virol.**, v. 63, p. 259-63, 2001.

WARIS, M. Detection and antigenic variantion of respiratory syncytial virus. **Annales Universitatis Turkuensis**, A II. 79, 1992. p. 86

WEBER, A.; WEBER, M.; MILLIGAN, P. Modeling epidemics caused by respiratory syncytial virus (RSV). **Math Biosci.**, v. 172, n. 2, p. 95-113, Aug. 2001.

WEINBERG, G. A. D.; ERDMAN, K. M.; EDWARDS, C. B.; HALL, F. J.; WALKER, M. R.; GRIFFIN, B.; SCHWARTZ. THE BEW VACCINE SURVILLANCE NETWORK STUDY GROUP. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 706-710, 2004.

WELLIVER, R. C. Respiratory syncytial Virus and other respiratory viruses. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 22, n. 2, p. 6-10, 2003.

WERTZ, G. W.; COLLINS, P. L.; HUANG, Y.; GRUBER, C.; LEVIN, S. Nucleotide, Sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 4075-4079, 1985.

WERTZ, G. W.; MOUDY, R. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus. **J. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 23, n. 1S, p. 19-24, 2004.

WHITE, L. J.; WARIS, M.; CANE, P. A.; NOKES, D. J.; MEDLEY, G. F. The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England; Wales and Finland: seasonality and cross-protection. **Epidemiologic**, v. 233, p. 279-89, 2005

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Initiative for Vaccine Research (IVR). Respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. Disease burden. WHO, Geneva, Switzerland. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index2.html>. Acesso em: 30 May 2010.

WILLIAMS, J. V.; HARRIS, P. A.; TOLLEFSON, S. J.; HALBURNT-RUSH, L. L.; PINGSTERHAUS, J. M.; EDWARDS, K. M.; WRIGHT, P. F.; CROWE, J. E. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise health infants and children. **New Engl. J. Med.**, v. 350, p. 443-450, 2004.

WOELK, C. H.; HOLMES, E. C. Variable immune-driven natural selection in the attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus (RSV). **J. Mol. Evol.**, v. 52, n. 2, p. 182-192, Feb. 2001.

WRIGHT, P. F.; KARRON, R. A.; BELSHE, R. B.; THOMPSON, J.; CROWE, J. E. J.; BOYCE, T. G.; HALBURNT, L. L.; REED, G. W.; WHITEHEAD, S. S.; ANDERSON, E. L.; WITTEK, A. E.; CASEY, R.; EICHELBERGER, M.; THUMAR, B.; RANDOLPH, V. B.; UDEM, S. A.; CHANOCK, R. M.; MURPHY, B. R. Evaluation of a live, cold-passaged, temperature-sensitive, respiratory syncytial virus vaccine candidate in infancy. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 5, p. 1331-1342, Nov. 2000.

WYDE, P. R. Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control. Mini-Review. **Antivir. Res.**, v. 39, p. 63-79, 1998.

ZACHARIAH, P.; SHAH, S.; GAO, D.; SIMÕES, E. A. Predictors of the duration of the respiratory syncytial virus season. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, n. 9, p. 772-776, 2009.

ZHAO, X.; CHEN, F.P.; MEGAW, A. G.; SULLENDER, W. M. Variable resistance to palivizumab in cotton rats by respiratory syncytial virus mutants. **J. Infect. Dis.**, v. 190, n. 11, p. 1941-1946, Dec. 2004.

ZHAO, X.; SULLENDER, W. M. In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab. **J. Virol.**, 79, n. 7, p. 3962-3968, Apr. 2005.

ZHAO, X.; LUI, E.; CHEN, F. P.; SULLENDER, W. M.; In Vivo Fitness of Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody Escape Mutants. **J. Virol.**, 11651-11657, Dec. 2006.

ZLATEVA, K. T.; LEMEY, P.; VANDAMME, A. M.; 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.** v. 78, p. 4675-4683, 2004.

ZLATEVA, K. T.; LEMEY, F.; MÖES, E.; VANDAMME, A.; RANST, M. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 79, n. 14, p. 9157-9167, 2005.

ZLATEVA, K. T.; VIJGEN, L.; DEKEERSMAEKER, C.; NARANJO, RANST. M. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3022–3030, 2007.

ZELAYA, E. A. C.; PETTERSON, C. A.; FORSGREN, M.; ORVELL, C; STRANNEGARD, O. Respiratory syncytial virus infection in hospitalized patients and healthy children in El Salvador. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, v. 51, n. 5, p. 577-584, 1994.

ZHANG, Y.; XU, W.; SHEN, K.; XIE, Z.; SUN, L.; LU, Q.; LIU, C.; LIANG, G.; BEELER, J. A.; ANDERSON, L. J. Genetic variability of group A and B human respiratory syncytial viruses isolated from 3 provinces in China. **Arch. Virol.**, v. 152, n. 8, p. 1425-1434, 2007.

ZHENG, H.; PERET, T. C. T.; RANDOLPH, V. B.; CROWLEY, J. C.; ANDERSON, L. J. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: Means to distinguish candidate vaccine from wild-type strain of respiratory syncytial virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 2, p. 334-337, 1996.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

**Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: **Variabilidade Genética da proteína G do HRSV de amostras com genótipo BA.**

Seu filho está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo, então leia atentamente e caso tenha dúvidas, vou esclarecê-las (se não souber ler, fique tranquilo(a) que leio para você). Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início a pesquisa. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você, nem ao seu (sua) filho(a).

Eu, RG, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) nascido(a) em ____ / ____ / ____ , seja voluntário do estudo **“Variabilidade Genética da proteína G do HRSV de amostras com genótipo BA”**, esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que possam descobrir as possíveis causas da doença denominada **“Doenças Respiratórias”** (explicar o que significa os termos científicos).
- II) Serão feitas duas coletas de aspirado de nasofaringe do(a) meu(minha) filho(a);
- III) Essas coletas serão realizadas apenas para estudos e em nada influenciará no tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo (a); mas não causará nenhum problema;

- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de se submeter a um tratamento terapêutico e será sem custo algum para mim;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e sem que venha interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de 2005.

Paciente / Responsável

.....

Testemunha 1 : _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____
Dr. Responsável

ANEXO B - LISTA DE AMOSTRAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO

	Nome da amostra	Número de Acesso <i>GeneBank</i>
1	BR19-2001	EU582432
2	BR42-2001	EU582433
3	BR105-2003	EU582448
4	BR140-2003	EU582447
5	BR093-2004	EU582449
6	BR332-2005	EU582483
7	BR319-2005	EU582482
8	BR307-2005	EU582481
9	BR305-2005	EU582480
10	BR301-2005	EU582479
11	BR293-2005	EU582478
12	BR290-2005	EU582477
13	BR274-2005	EU582476
14	BR271-2005	EU582475
15	BR259-2005	EU582474
16	BR252-2005	EU582473
17	BR242-2005	EU582472
18	BR237-2005	EU582471
19	BR236-2005	EU582470
20	BR233-2005	EU582469
21	BR222-2005	EU582468
22	BR216-2005	EU582467
23	BR158-2005	EU582460
24	BR154-2005	EU582459
25	BR149-2005	EU582458
1	DEL_DCD_06	EU368639
2	DEL_AAOW_06	EU368650
3	DEL_COF_06	EU368649
4	DEL_BBE_05	EU368644
5	DEL_AFF_05	EU368643
6	DEL_AOGC_07	EU368642
7	DEL_DCG_06	EU368641
8	DEL_ADI_05	EU368640
9	DEL_DCO_06	EU368638
10	DEL_DBG_06	EU368637
11	DEL_FDW_05	EU368633
12	DEL_GAW_05	EU368634
13	DEL_HFW_05	EU368635
14	DEL_DBE_06	EU368636
15	DEL_FBW_05	EU368632
16	DEL_BOO_05	EU368628
17	DEL_BOD_05	EU368629

18	DEL_BBA_05	EU368630
19	DEL_EFW_05	EU368631
20	DEL_AID_05	EU368627
21	DEL_AGG_05	EU368626
22	DEL_AFE_05	EU368625
23	DEL_AEG_05	EU368624
24	DEL_ADG_05	EU368623
25	PN06-18979B	EU267366
26	PN06-22596B	EU267365
27	PN06-324B	EU267364
28	PN06-22645B	EU267363
29	PN06-22644B	EU267362
30	PN06-326B	EU267361
31	PN06-18922B	EU267359
32	PN06-18936B	EU267360
33	PN06-579B	EU267358
34	PN06-18888B	EU267357
35	PN06-18554B	EU267356
36	PN06-18552B	EU267355
37	JU(IAL)261	EU259708
38	JU(IAL)335	EU259707
39	SP(IAL)500	EU259706
40	SP(IAL)642	EU259705
41	SP(IAL)437	EU259704
42	SP(IAL)434	EU259703
43	SP(IAL)426	EU259702
44	SP(IAL)424	EU259701
45	SP(IAL)423	EU259700
46	SP(IAL)418	EU259699
47	SP(IAL)417	EU259698
48	SP(IAL)387	EU259697
49	SP(IAL)341	EU259696
50	SP(IAL)368	EU259695
51	SP(IAL)331	EU259694
52	SP(IAL)327	EU259693
53	SP(IAL)308	EU259692
54	SP(IAL)286	EU259691
55	SP(IAL)275	EU259690
56	SP(IAL)245	EU259689
57	SP(IAL)230	EU259688
58	SP(IAL)227	EU259687
59	SP(IAL)225	EU259686
60	SP(IAL)224	EU259685
61	SP(IAL)223	EU259684
62	SP(IAL)074	EU259683
63	SP(IAL)208	EU259682

64	SP(IAL)207	EU259681
65	SP(IAL)192	EU259680
66	SP(IAL)182	EU259679
67	SP(IAL)181	EU259678
68	SP(IAL)113	EU259676
69	SP(IAL)089	EU259675
70	SP(IAL)100	EU259674
71	SP(IAL)099	EU259673
72	SP(IAL)092	EU259672
73	SP(IAL)091	EU259671
74	SP(IAL)067	EU259670
75	JU(IAL)516	EU259669
76	SP(IAL)055	EU259668
77	SP(IAL)039	EU259667
78	JU(IAL)374	EU259666
79	JU(IAL)317	EU259665
80	JU(IAL)311	EU259664
81	SP(IAL)340	EU259663
82	JU(IAL)294	EU259662
83	JU(IAL)248	EU259661
84	ITA(IAL)339	EU259660
85	ITA(IAL)300	EU259659
86	ITA(IAL)298	EU259658
87	ITA(IAL)221	EU259657
88	ITA(IAL)217	EU259656
89	ITA(IAL)190	EU259655
90	ITA(IAL)188	EU259654
91	ITA(IAL)186	EU259653
92	ITA(SP)183	EU259652
93	SP(IAL)118_2005	DQ289649
94	Beijing_B_04_11	DQ227408
95	BA_1526_04	DQ227407
96	BA_493_04	DQ227406
97	BA_354_04	DQ227405
98	BA_5021_03	DQ227404
99	BA_4909_03	DQ227403
100	BA_4852_03	DQ227402
101	BA_4830_03	DQ227400
102	BA_693_03	DQ227399
103	BA_1445_02	DQ227398
104	BA_1326_99	DQ227397
105	BA_1607_04	DQ227396
106	BA_524_04	DQ227395
107	BA_100_04	DQ227394
108	BA_6564_03	DQ227392
109	BA_4974_03	DQ227391

110	BA_4862_03	DQ227390
111	BA_4915_03	DQ227389
112	BA_4826_03	DQ227388
113	BA_1889_02	DQ227387
114	BA_1856_02	DQ227386
115	BA_1606_02	DQ227385
116	BA_1565_02	DQ227384
117	BA_1562_02	DQ227383
118	BA_1518_02	DQ227382
119	BA_1461_02	DQ227381
120	BA_1441_02	DQ227380
121	BA_1271_02	DQ227379
122	BA_1214_02	DQ227378
123	BA_1208_02	DQ227377
124	BA_1161_02	DQ227376
125	BA_1004_02	DQ227375
126	BA_998_02	DQ227374
127	BA_733_02	DQ227373
128	BA_770_02	DQ227372
129	BA_619_02	DQ227371
130	BA_505_02	DQ227370
131	BA_495_02	DQ227369
132	BA_167_02	DQ227368
133	BA_166_02	DQ227367
134	BA_164_02	DQ227366
135	BA_3997_99	DQ227365
136	BA_3931_99	DQ227364
137	BA_1370_99	DQ227363
138	BA_802_99	DQ985147
139	BE_13588_04	DQ985154
140	BE_13804_03	DQ985153
141	BE_13146_04	DQ985152
142	BE_13547_04	DQ985151
143	BE_3891_05	DQ985150
144	BE_13689_04	DQ985149
145	BE_1515_05	DQ985148
146	BE_1266_05	DQ985146
147	BE_9382_05	DQ985145
148	BE_13183_04	DQ985144
149	BE_10451_05	DQ985143
150	BE_9388_05	DQ985142
151	BE_12963_03	DQ985141
152	BE_19_05	DQ985140
153	BE_2988_05	DQ985139
154	BE_13127_04	DQ985138
155	BE_12546_04	DQ985137

156	BE_1787_05	DQ985136
157	BE_765_05	DQ171878
158	NZB_04_02	AY751131
159	BE_13417_99	AY751130
160	BE_12369_01	AY751129
161	BE_11683_01	AY751128
162	BE_11702_01	AY751127
163	BE_758_02	AY751126
164	BE_11535_01	AY751125
165	BE_12446_01	AY751124
166	BE_302_04	AY751123
167	BE_1066_03	AY751122
168	BE_553_03	AY751121
169	BE_12349_02	AY751120
170	BE_12394_02	AY751119
171	BE_12522_01	AY751118
172	BE_12370_01	AY751117
173	BE_13159_02	AY751116
174	BE_11508_01	AY751115
175	BE_626_02	AY751114
176	BE_13242_02	AY751113
177	BE_12158_03	AY751112
178	BE_11732_01	AY751111
179	BE_210_03	AY751110
180	BE_46_03	AY751109
181	BE_1802_03	AY751108
182	BE_12598_01	AY751107
183	BE_12595_01	AY751106
184	BE_12379_01	AY751105
185	BE_11500_01	AY751104
186	BE_1162_02	AY751103
187	BE_1613_02	AY751102
188	BE_11609_01	AY751101
189	BE_1584_02	AY751100
190	BE_11813_01	AY751099
191	BE_12653_01	AY751097
192	BE_11949_01	AY751096
193	BE_12398_01	AY751095
194	BE_1192_02	AY751094
195	BE_12445_99	AY751093
196	BE_14610_03	AY751092
197	BE_257_04	AY751091
198	BE_12817_03	AY751090
199	BE_788_04	AY751089
200	BE_12973_03	AY751088
201	BE_13058_03	AY751087

202	BE_13457_03	AY751086
203	BE_12670_01	AY751085
204	BE_920_03	AY751084
205	BE_12358_02	GU357530
206	LZY227	GU357529
207	LZY210	GU357528
208	LZY184	GU357527
209	LZY181	GU357526
210	LZY161	GU357524
211	LZY154	GU357525
212	LZY155	GU357523
213	LZY150	GU357521
214	LZY145	GU357520
215	LZY139	GU357516
216	LZY93	GU357515
217	LZY90	GU357514
218	LZY85	GU357512
219	LZY80	GU357511
220	LZY48	GU357510
221	LZY44	GU357509
222	LZY42	GU357508
223	LZY35	GU357505
224	LZY13	GU357504
225	LZY6	GU357503
226	LZ639	AY333364
227	BA4128_99B	AY333363
228	BA3859_99B	AY333362
229	BA3833_99B	AB485790
230	RSvi_Okinawa.JPN_232.08	AB470482
231	NG-064-06	AB470481
232	NG-013-05	AB470480
233	NG-080-03	EU625797
234	SP(IAL)1787_2007	EU625796
235	SP(IAL)1763_2007	EU625789
236	SP(IAL)1086_2006	EU625778
237	SP(IAL)1408_2006	EU625777
238	JU(IAL)1324_2006	EU625776
239	JU(IAL)1240_2006	EU625775
240	SP(IAL)1218_2006	EU625774
241	SP(IAL)1196_2006	EU625773
242	SP(IAL)1189_2006	EU625772
243	JU(IAL)1185_2006	EU625771
244	JU(IAL)1125_2006	EU625770
245	JU(IAL)1124_2006	EU625768
246	SP(IAL)1079_2006	EU625767
247	SP(IAL)1067_2006	EU625766

248	SP(IAL)1066_2006	EU625763
249	SP(IAL)1052_2006	EU625762
250	SP(IAL)1051_2006	EU625761
251	JU(IAL)1042_2006	EU625760
252	SP(IAL)1023_2006	EU625758
253	SP(IAL)1018_2006	EU625755
254	SP(IAL)974_2006	EU625753
255	SP(IAL)956_2006	EU625751
256	SP(IAL)931_2006	EU625752
257	SP(IAL)955_2006	EU625750
258	SP(IAL)929_2006	EU625749
259	SP(IAL)928_2006	EU625747
260	SP(IAL)915_2006	EU625746
261	SP(IAL)914_2006	EU625745
262	SP(IAL)912_2006	EU625743
263	SP(IAL)900_2006	EU625742
264	SP(IAL)876_2006	EU625741
265	SP(IAL)779_2006	EU625740
266	SP(IAL)773_2006	EU625739
267	SP(IAL)725_2006	EU625738
268	SP(IAL)691_2006	EU625737
269	JU(IAL)667_2006	EU625736
270	SP(IAL)661_2006	EU625735
271	RP189_06	EU635872
272	RP062_06	EU635871
273	RP049_06	EU635870
274	RP045_06	EU635869
275	RP043_06	EU635868
276	RP033_06	EU635867
277	RP023_06	EU635866
278	RP193_05	EU635865
279	RP125_05	EU635863
280	RP161_05	EU635864
281	RP108_05	EU635861
282	RP103_05	EU635860
283	RP082_05	EU635859
284	RP066_05	EU635857
285	H4012	DQ270228
286	H1068	DQ270227
287	H94	DQ270226
288	NG-153-03	AB175821
289	NG-006-03	AB175820
290	NG-004-03	AB175819
291	S00-4	AB117522
292	SA433941K06	EF219433
293	SA481582K06	EF219431

294	SA415319K06	EF219432
295	QUE_155_01-02	AY927412
296	QUE_85_02_03	AY927408

Sequências que não estão no *GeneBank*

- 1 BR_CE_168_2004
- 2 BR_CE_170_2007
- 3 BR_CE_205_2007
- 4 BR_CE_210_2007
- 5 BR_CE_214_2007
- 6 BR_CE_225_2004
- 7 BR_CE_228_2008
- 8 BR_CE_237_2008
- 9 BR_CE_239_2007
- 10 BR_CE_259_2008
- 11 BR_CE_268_2005
- 12 BR_CE_291_2007
- 13 BR_CE_305_2008
- 14 BR_CE_316_2004
- 15 BR_CE_337_2006
- 16 BR_CE_358_2006

- 1 BR100_2005
- 2 BR102_2005
- 3 BR111_2005
- 4 BR115_2205
- 5 BR150_2005
- 6 BR184_2005
- 7 BR188_2005
- 8 BR195_2005
- 9 BR210_2005
- 10 BR215_2005
- 11 BR22_2005
- 12 BR221_2005
- 13 BR243_2005
- 14 BR249_2005
- 15 BR256_2005
- 16 BR27_2005
- 17 BR282_2005
- 18 BR321_2005
- 19 BR326_2005
- 20 BR37_2005
- 21 BR38_2005
- 22 BR40_2005
- 23 BR41_2005

24 BR53_2005
25 BR56_2005
26 BR73_2005
27 BR80_2005
28 BR1040_2006
29 BR1077_2006
30 BR1089_2006
31 BR1257_2006
32 BR1265_2006
33 BR1281_2006
34 BR1372II_2006
35 BR1380_2006
36 BR564_2006
37 BR609_2006
38 BR611_2006
39 BR618_2006
40 BR630_2006
41 BR636_2006
42 BR655_2006
43 BR660_2006
44 BR667_2006
45 BR671_2006
46 BR672_2006
47 BR676_2006
48 BR691_2006
49 BR701_2006IH
50 BR2829_2008
51 BR2878_2008
52 BR2928_2008
53 BR3133_2008
54 BR3296_2008
55 BR3836_2009
56 BR3846-2009
57 BR3860_2009
58 BR3892_2009
59 BR3909_2009
60 BR3919_2009
61 BR3921_2009
62 BR3924_2009
63 BR3929_2009
64 BR3936_2009
65 BR3937_2009
66 BR3942_2009
67 BR3945_2009
68 BR3950_2009
69 BR3952_2009

70 BR3974_2009
71 BR3975_2009
72 BR3979_2009
73 BR3995_2009
74 BR4025_2009
75 BR4058_2009
76 BR4101_2009
77 BR4463_2009
78 BR4466_2009
79 BR4670_2009

1 CHI15_2003
2 CHI171_2003
3 CHI302_2003
4 CHI313_2003
5 CHI186_2003

ANEXO C - LISTA DE AMOSTRAS IDÊNTICAS E ÚNICAS - BRASIL

BR_CE_225_2004	BR_CE_168_2004
----------------	----------------

SP_IAL_1079_2006	BR216_2005
------------------	------------

BR_CE_170_2007	
JU_IAL_1240_2006	
JU_IAL_1125_2006	BR636_2006
SP_IAL_915_2006	
JU_IAL_1124_2006	

SP_IAL_1052_2006	
SP_IAL_1086_2006	BR655_2006
BR671_2006	

BR630_2006	
BR672_2006	
BR660_2006	BR1257_2006
SP_IAL_1051_2006	

SP_IAL_327_2005	
BR222_2005	BR249_2005
BR195_2005	

BR301_2005	BR41_2005
------------	-----------

SP_IAL_387_2005	
BR158_2005	
BR242_2005	BR149_2005
ITA_IAL_188_2005	
SP_IAL_192_2005	

SP_IAL_227_2005	
SP_IAL_286_2005	
SP_IAL_434_2005	
SP_IAL_099_2005	BR40_2005
JU_IAL_516_2005	
JU_IAL_261_2005	
SP_IAL_039_2005	
SP_IAL_437_2005	

SP_IAL_955_2006	BR676_2006
SP_IAL_1408_2006	

BR3975_2009	BR3950_2009
-------------	-------------

BR2829_2008	BR2878_2008
-------------	-------------

BR3860_2009	BR3942_2009
BR3846-2009	
BR3919_2009	

BR701_2006IH	BR609_2006
--------------	------------

SP_IAL_1067_2006	BR3909_2009
------------------	-------------

BR_CE_268_2005	BR_CE_210_2007
----------------	----------------

BR_CE_259_2008	BR_CE_305_2008
----------------	----------------

BR1089_2006	BR1380_2006
-------------	-------------

BR42_2001	BR19_2001
-----------	-----------

SP_IAL_500_2005	BR1077_2006
SP_IAL_642_2005	
SP_IAL_418_2005	
SP_IAL_331_2005	
SP_IAL_308_2005	
SP_IAL_245_2005	
SP_IAL_225_2005	
SP_IAL_224_2005	
SP_IAL_208_2005	
SP_IAL_207_2005	
SP_IAL_182_2005	
SP_IAL_092_2005	
SP_IAL_091_2005	
SP_IAL_100_2005	
BR22_2005	
BR243_2005	
SP_IAL_067_2005	
SP_IAL_055_2005	
JU_IAL_374_2005	
SP_IAL_340_2005	
JU_IAL_294_2005	
ITA_IAL_339_2005	
ITA_IAL_221_2005	
JU_IAL_1324_2006	
SP_IAL_1023_2006	

SP_IAL_914_2006
 SP_IAL_773_2006
 SP_IAL_725_2006
 RP033_06
 RP125_05
 RP082_05
 RP066_05
 BR111_2005
 BR150_2005
 BR154_2005
 BR184_2005
 BR210_2005
 BR215_2005
 BR233_2005
 BR237_2005
 BR252_2005
 BR256_2005
 BR27_2005
 BR271_2005
 BR274_2005
 BR282_2005
 BR290_2005
 BR305_2005
 BR321_2005
 BR332_2005
 BR37_2005
 BR38_2005
 BR53_2005
 BR73_2005
 BR80_2005

SP_IAL_424_2005 SP_IAL_423_2005

SP_IAL_931_2006 SP_IAL_876_2006

SP_IAL_928_2006 SP_IAL_1763_2007
 SP_IAL_912_2006

SP_IAL_929_2006 JU_IAL_667_2006
 SP_IAL_661_2006

AMOSTRAS ÚNICAS

BR105_2003
 BR1372II_2006

BR140_2003
BR221_2005
BR236_2005
BR259_2005
BR293_2005
BR307_2005
BR319_2005
BR326_2005
BR56_2005
BR564_2006
BR611_2006
BR618_2006
BR667_2006
BR691_2006
BR93_2004
BR3937_2009
BR3945_2009
BR3952_2009
BR3974_2009
BR3979_2009
BR4025_2009
BR4058_2009
BR4101_2009
BR4463_2009
BR4466_2009
BR4670_2009
BR3836_2009
BR3929_2009
BR3936_2009
BR1040_2006
BR188_2005
BR2928_2008
BR3133_2008
BR3296_2008
BR3924_2009
BR3892_2009
BR3921_2009
BR3995_2009
BR_CE_205_2007
BR_CE_214_2007
BR_CE_228_2008
BR_CE_237_2008
BR_CE_239_2007
BR_CE_291_2007
BR_CE_316_2004
BR_CE_337_2006

BR_CE_358_2006
BR100_2005
BR102_2005
BR115_2205
BR1265_2006
BR1281_2006
ITA_IAL_183_2005
ITA_IAL_186_2005
ITA_IAL_190_2005
ITA_IAL_217_2005
ITA_IAL_300_2005
ITA_IAL_298_2005
JU_IAL_1042_2006
JU_IAL_1185_2006
JU_IAL_248_2005
JU_IAL_311_2005
JU_IAL_317_2005
JU_IAL_335_2005
RP023_06
RP043_06
RP045_06
RP049_06
RP062_06
RP103_05
RP108_05
RP161_05
RP189_06
RP193_05
SP_IAL_089
SP_IAL_1018_2006
SP_IAL_1066_2006
SP_IAL_113_2005
SP_IAL_118_2005
SP_IAL_1189_2006
SP_IAL_1196_2006
SP_IAL_1218_2006
SP_IAL_1787_2007
SP_IAL_181_2005
SP_IAL_223_2005
SP_IAL_230_2005
SP_IAL_275_2005
SP_IAL_341_2005
SP_IAL_368_2005
SP_IAL_417_2005
SP_IAL_426_2005
SP_IAL_691_2006

SP_IAL_779_2006
SP_IAL_900_2006
SP_IAL_956_2006
SP_IAL_974_2006
SP_IAL_074_2005

ANEXO D - LISTA DE AMOSTRAS IDÊNTICAS E ÚNICAS - MUNDO

QUE_82_02_03	
BR_CE_225_2004	BR_CE_168_2004
BA4128_99B	

BE_920_03	BE_12670_01
BE_12358_02	

CHI186	CHI313
--------	--------

BE_12349_02	BE_12394_02
-------------	-------------

BE_758_02	
BE_12369_01	
BE_11535_01	BE_11683_01
BE_12446_01	
BE_11702_01	

BE_12817_03	
BE_788_04	
BE_257_04	
BE_12973_03	JU_IAL_1104_2006
BE_13058_03	
BA_354_04	
BE_12963_03	
BE_12963_03	

BA_3931_99	BA3833_99B
BA3859_99B	

BA_4862_03	BA_4826_03
------------	------------

BA_1562_02	BA_1518_02
BA_495_02	

BA_1445_02	BA_1441_02
------------	------------

BA_1606_02	BA_1208_02
------------	------------

BA_619_02	
BA_505_02	BA_164_02
BA_1461_02	

BA_167_02	BA_166_02
BA_3997_99 BA_1326_99 BA_1370_99	BA_802_99
BE_9388_05 SP_IAL_1079_2206 BE_10451_05	BR216_2005
BR_CE_170_2007 JU_IAL_1240_2006 JU_IAL_1125_2006 SA433941K06 SP_IAL_915_2006 JU_IAL_1124_2006	BR636_2006
SP_IAL_1052_2006 SP_IAL_1086_2006 BR671_2006	BR655_2006
BR630_2006 BR672_2006 BR660_2006 SP_IAL_1051_2006	BR1257_2006
SP_IAL_327 BR222_2005 BR195_2005	BR249_2005
BR301_2005	BR41_2005
SP_IAL_387 BR158_2005 BR242_2005 ITA_IAL_188 SP_IAL_192	BR149_2005
SP_IAL_424	SP_IAL_423
SP_IAL_227 SP_IAL_286 SP_IAL_434	BR40_2005

SP_IAL_099 JU_IAL_516 JU_IAL_261 SP_IAL_039 SP_IAL_437	
--	--

SP_IAL_955_2006 SP_IAL_1408_2006	BR676_2006
-------------------------------------	------------

BR3975_2009	BR3950_2009
-------------	-------------

BR2829_2008	BR2878_2008
-------------	-------------

BR3860_2009 BR3846-2009 BR3919_2009	BR3942_2009
---	-------------

BR701_2006IH	BR609_2006
--------------	------------

SP_IAL_1067_2006	BR3909_2009
------------------	-------------

BA_5021_03	BA_6564_03
------------	------------

BE_2988_05 BE_12546_04	BE_13127_04
---------------------------	-------------

DEL_W_05	DEL_GAW_05
----------	------------

DEL_ADI_05 DEL_AAOW_06 DEL_EFW_05 DEL_AFE_05 DEL_A_05 DEL_AGG_05	DEL_AEG_05
---	------------

SP_IAL_1693_2007 SP_IAL_1746_2007	SP_IAL_1759_2007
--------------------------------------	------------------

SP_IAL_1054_2206 SP_IAL_999_2006 SP_IAL_958_2006 SP_IAL_918_2006	RP023_06
---	----------

SP_IAL_987_2006	SP_IAL_902_2006
-----------------	-----------------

SP_IAL_931_2006	SP_IAL_876_2006
-----------------	-----------------

SP_IAL_928_2006	SP_IAL_1763_2007
SP_IAL_912_2006	

SP_IAL_929_2006	JU_IAL_667_2006
SP_IAL_661_2006	

LZY080	
LZY6	LZY90
LZY150	
LZ639	

LZY154	LZY155
--------	--------

LZY85	LZY13
LZY93	

LZY48	LZY44
-------	-------

SA481582K06	BR_CE_205_2007
-------------	----------------

QUE_155_01_02	BR_CE_214_2007
---------------	----------------

SA415319K06	BR_CE_210_2007
BR_CE_268_2005	

BR_CE_259_2008	BR_CE_305_2008
----------------	----------------

BR157_04	BR105_2003
----------	------------

BR1089_2006	BR1380_2006
-------------	-------------

BE_1584_02	
BE_11508_01	
BE_12370_01	
BE_626_02	BR42_2001
BE_12598_01	
BE_12595_01	
BE_13242_02	
BE_12379_01	

BE_1613_02
BE_11609_01
BE_12158_03
BE_11732_01
BE_12595_01
BE_12379_01
BE_11500_01
BE_1162_02
BE_1613_02
BE_11609_01
BE_11813_01
BE_12653_01
BE_11949_01
BE_12398_01
BE_1192_02
BE_1802_03
BR19_2001

BA_4915_03
BA_4830_03
BA_1565_02

BA_998_02

BE_13547_04
BE_13689_04

BE_13146_04

SP_IAL_500
SP_IAL_642
SP_IAL_418
SP_IAL_331
SP_IAL_308
SP_IAL_245
SP_IAL_225
SP_IAL_224
SP_IAL_208
SP_IAL_207
SP_IAL_182
SP_IAL_092
SP_IAL_091
SP_IAL_100
BR22_2005
BR243_2005
SP_IAL_067
SP_IAL_055
JU_IAL_374

BR1077_2006

SP_IAL_340
JU_IAL_294
ITA_IAL_339
ITA_IAL_221
JU_IAL_1324_2006
SP_IAL_1023_2006
SP_IAL_914_2006
SP_IAL_773_2006
SP_IAL_725_2006
RP033_06
RP125_05
RP082_05
RP066_05
BR111_2005
BR150_2005
BR154_2005
BR184_2005
BR210_2005
BR215_2005
BR233_2005
BR237_2005
BR252_2005
BR256_2005
BR27_2005
BR271_2005
BR274_2005
BR282_2005
BR290_2005
BR305_2005
BR321_2005
BR332_2005
BR37_2005
BR38_2005
BR53_2005
BR73_2005
BR80_2005

AMOSTRAS ÚNICAS

BE_13417_99
BE_302_04
BE_1066_03
BE_553_03
BE_12522_01

BE_13159_02
BE_210_03
BE_46_03
BE_12445_99
BE_14610_03
BE_13457_03
Beijing_B_04_11
BA_1526_04
BA_493_04
BA_4909_03
BA_4852_03
BA_693_03
BA_1607_04
BA_524_04
BA_100_04
BA_4974_03
BA_1889_02
BA_1856_02
BA_1271_02
BA_1214_02
BA_1161_02
BA_1004_02
BA_733_02
BA_770_02
BE_13588_04
BE_13804_03
BE_3891_05
BE_1515_05
BE_1266_05
BE_9382_05
BE_13183_04
BE_19_05
BE_1787_05
BE_765_05
NZB_04_02
H4012
H1068
H94
DEL_DCD_06
DEL_COF_06
DEL_BBE_05
DEL_AFF_05
DEL_AOGC_07
DEL_DCG_06
DEL_DCO_06
DEL_DBG_06

DEL_FDW_05
DEL_DBE_06
DEL_FBW_05
DEL_BOO_05
DEL_BOD_05
DEL_BBA_05
DEL_AID_05
DEL_ADG_05
PN06_18979B
PN06_22596B
PN06_324B
PN06_22645B
PN06_22644B
PN06_326B
PN06_18922B
PN06_18936B
PN06_579B
PN06_18888B
PN06_18554B
PN06_18552B
JU_IAL_335
SP_IAL_426
SP_IAL_417
SP_IAL_341
SP_IAL_368
SP_IAL_275
SP_IAL_230
SP_IAL_223
SP_IAL_181
SP_IAL_113
SP_IAL_089
JU_IAL_317
JU_IAL_311
JU_IAL_248
ITA_IAL_300
ITA_IAL_217
ITA_IAL_190
ITA_IAL_186
ITA_IAL_183
SP_IAL_1787_2007
SP_IAL_1218_2006
SP_IAL_1196_2006
SP_IAL_1189_2006
JU_IAL_1185_2006
SP_IAL_1066_2006
JU_IAL_1042_2006

SP_IAL_1018_2006
SP_IAL_974_2006
SP_IAL_956_2006
SP_IAL_900_2006
SP_IAL_779_2006
SP_IAL_691_2006
SP_IAL_118_2005
RP189_06
RP062_06
RP049_06
RP045_06
RP043_06
RP193_05
RP161_05
RP108_05
RP103_05
RP050_05
LZY227
LZY210
LZY184
LZY181
LZY161
LZY145
LZY139
LZY42
LZY35
BR1372II_2006
BR140_2003
BR221_2005
BR236_2005
BR259_2005
BR293_2005
BR307_2005
BR319_2005
BR326_2005
BR56_2005
BR564_2006
BR611_2006
BR618_2006
BR667_2006
BR691_2006
BR93_2004
BR3937_2009
BR3945_2009
BR3952_2009
BR3974_2009

BR3979_2009
BR4025_2009
BR4058_2009
BR4101_2009
BR4463_2009
BR4466_2009
BR4670_2009
BR3836_2009
BR3929_2009
BR3936_2009
BR1040_2006
BR188_2005
BR2928_2008
BR3133_2008
BR3296_2008
BR3924_2009
BR3892_2009
RSvi_Okinawa_JPN_232_08
NG_64_06
NG_013_05
NG_080_03
AB175821
AB175820
AB175819
AB117522
BR3921_2009
BR3995_2009
BR_CE_228_2008
BR_CE_237_2008
BR_CE_239_2007
BR_CE_291_2007
BR_CE_316_2004
BR_CE_337_2006
BR_CE_358_2006
BR100_2005
BR102_2005
BR115_2205
BR1265_2006
BR1281_2006
CHI15_2003
CHI171_2003
CHI302_2003