



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

MÉDICA

ANNE CAROLINNE BEZERRA PERDIGÃO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS
SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO
CIRCULANTES EM FORTALEZA-CEARÁ DURANTE
CINCO PERÍODOS EPIDÊMICOS CONSECUTIVOS
(2004-2008).**

FORTALEZA/CE

2009

ANNE CAROLINNE BEZERRA PERDIGÃO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS
SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO
CIRCULANTES EM FORTALEZA-CEARÁ DURANTE
CINCO PERÍODOS EPIDÊMICOS CONSECUTIVOS
(2004-2008).**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Edna Araújo Moura

FORTALEZA/CE

2009

P485c Perdigão, Anne Carolinne Bezerra

**Caracterização molecular dos vírus sincicial respiratório humano circulantes em Fortaleza-Ceará durante cinco períodos epidêmicos consecutivos (2004-2008) / Anne Carolinne Bezerra Perdigão. – Fortaleza, 2009.
130f. : il.**

**Orientadora: Prof^a. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Médica.**

**1. Vírus Sincicial Respiratório Humano 2. Epidemiologia
3. Variação Antigênica I. Moura, Fernanda Edna Araújo
(Orient.) II. Título.**

CDD: 618.922

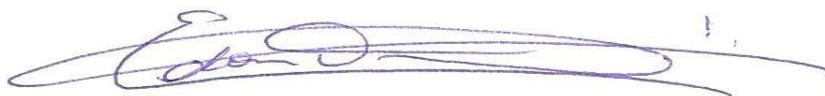
ANNE CAROLINNE BEZERRA PERDIGÃO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO
HUMANO CIRCULANTES EM FORTALEZA-CEARÁ DURANTE CINCO
PERÍODOS EPIDÊMICOS CONSECUTIVOS (2004-2008).**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Edison Luiz Durigon
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de São Paulo

Prof. Dr. José Júlio da Costa Sidrim
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura (Orientadora)
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

*À Deus, pelo dom da vida e
por me amparar nos momentos mais
difíceis, dando-me forças para superar!*

*Aos meus pais, Dalva e Fernando Perdigão, por todo incentivo,
compreensão e carinho durante esta trajetória,
apoiando-me de todas as maneiras possíveis;
agüentando minha ansiedade em todas as
grandes etapas que o mestrado possui,
ouvindo meu choro nos momentos de desespero
e escutando-me nos momentos de empolgação.
Amo vocês!*

*Aos meus irmãos, Fernanda e Daniel Perdigão,
Pela companhia e por estarem presentes em minha vida.
Vocês são essenciais em minha vida!*

*Ao meu namorado, Leonardo Gomes Justino,
que apesar de longe, esteve sempre presente,
dando-me amor, carinho e compreensão
em cada etapa desse trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Fernanda Edna Araújo Moura, minha orientadora, pela oportunidade, pela confiança depositada e por sua imensa dedicação e colaboração dispensada ao longo desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Edison Luís Durigon, pela oportunidade de estar em um centro de excelência em pesquisa como a USP, por todo o apoio e incentivo para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, coordenador do Mestrado em Microbiologia Médica, pela sua dedicação para o funcionamento desse mestrado.

À Danielle Bruna Leal de Oliveira, pelos ensinamentos em biologia molecular, pela sua disponibilidade, por seus conselhos e palavras de incentivo.

À Dra Viviane Fongaro Botosso, pelos ensinamentos nas análises filogenéticas, pelas dicas e trocas de *emails*.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, Prof. Dr. José Júlio da Costa Sidrim e Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, por terem aceitado gentilmente a participar da avaliação desse trabalho.

A todos os professores do mestrado, com os quais tive a oportunidade e o prazer de aprender.

A todos os que fazem, ou fizeram parte, do Laboratório de Virologia, por executarem as atividades fundamentais que possibilitaram o desenvolvimento dessa dissertação.

A todos que fazem parte do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, que me ajudaram durante os experimentos desse trabalho, em especial a Raquel Negrão, pelo companherismo, e, Angélica Cristine, por tão gentilmente ter me abrigado em sua casa.

Aos meus colegas de curso, em especial aos amigos Bruno Jaegger, Rafael Carvalho e Emerson Ramalho, pela companhia e palavras de estímulo ao longo desses meses.

À amiga Joyce Fonteles Ribeiro, por sua amizade, ensinamentos, apoio e torcida.

Ao Olavo, técnico do Setor de Microbiologia, pelo auxílio concedido para a realização desse trabalho, por sua amizade e pelo café.

À Carol, secretária do curso, por estar sempre disposta a ajudar, por sua dedicação e eficiência na resolução de etapas burocráticas.

A todas as crianças e seus responsáveis que participaram desse trabalho e permitiram a coleta das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

RESUMO

O vírus sincicial respiratório humano (VSRh) é o agente viral mais frequentemente relacionado a infecções do trato respiratório inferior em crianças menores de dois anos de idade. O VSRh é caracterizado antigenicamente em dois grupos: A e B, e cada grupo apresenta vários subgrupos. A glicoproteína G é a principal responsável pela a variação antigênica inter e intragrupos desse vírus. Os objetivos desse estudo foram caracterizar os períodos epidêmicos e a diversidade antigênica e genômica dos VSRh circulantes em Fortaleza, Ceará – Brasil, durante cinco períodos epidêmicos consecutivos (2004-2008). A imunofluorescência indireta (IFI) foi utilizada para a triagem de VSRh e de todos os vírus analisados e para a caracterização antigênica dos VSRh. A RT-nested-PCR seguida do seqüenciamento parcial do gene G foi utilizada para a caracterização genômica dos VSRh. O VSRh foi detectado em 456 das 2885 (15,8%) amostras. O pico dos períodos epidêmicos de VSRh ocorreu nos meses de março a maio relacionado à ocorrência de chuvas. Um total de 282 VSRh (62,8%) foram caracterizados antigenicamente por IFI, sendo 170 VSRhA (60,3%) e 112 VSRhB (39,7%). Ambos os grupos circularam durante todo o período analisado sendo observado o predomínio de A em todos os anos. Um total de 250 VSRh (54,8%) foi submetido à RT-nested-PCR com amplificação de 133 e seqüenciamento de 86. A caracterização genômica dos VSRh identificou os subgrupos GA2 e GA5 para o VSRhA e os subgrupos GB3 e BA para o VSRhB. Esses quatro subgrupos co-circularam durante o ano de 2006. Nos anos de 2004, 2005 e 2007 verificou-se a presença dos dois subgrupos de VSRhA. Em 2008 somente o GA2 circulou. Em 2004, 2007 e 2008 somente o subgrupo BA esteve presente. Em 2005 somente o GB3 circulou. Os VSRhA apresentaram uma maior variabilidade nas seqüências nucleotídicas, indicando uma possível pressão seletiva positiva. Houve variações no início, fim e duração de cada período epidêmico de VSRh, assim como na circulação de grupos e subgrupos.

Palavras chave: vírus sincicial respiratório humano; epidemiologia; variação antigênica

ABSTRACT

The human respiratory syncytial virus (HRSV) is the major agent of lower respiratory tract in children under two years old. HRSV is characterized antigenically into two groups: A and B, and each group has several subgroups. Glycoprotein G is primarily responsible for the antigenic variation between and within groups of viruses. The aims of this study were to characterize the epidemic periods and the antigenic and genomic diversity of circulating HRSV in Fortaleza, Ceará - Brazil, for five consecutive epidemic periods (2004-2008). The screening of positive samples to HRSV and other viruses analyzed, as the antigenic characterization of HRSV was carried out by indirect immunofluorescence. RT-nested-PCR followed by partial sequencing of the gene G was used for genomic characterization of HRSV. The HRSV was detected in 456 of 2885 samples (15.8%). The peak of the epidemic periods of HRSV occurred from March to May related to rainfall. A total of 282 HRSV (62.8%) were characterized antigenically, with 170 HRSVA (60.3%) and 112 HRSVB (39.7%). Both groups circulated throughout the period analyzed with a predominance of HRSVA in all years of study. A total of 250 HRSV (54.8%) were submitted to RT-nested-PCR with amplification of 133 and sequencing of 86. The genomic characterization of HRSV identified subgroups GA2 and GA5 for HRSVA and subgroups GB3 and BA for HRSVB. In the years 2004, 2005 and 2007 both subgroups of HRSVA circulated. In 2008 only GA2 circulated. In 2004, 2007 and 2008 only the subgroup BA was present. In 2005 only the GB3 circulated. The HRSV A showed a higher variability in nucleotide sequences, indicating a possible positive selective pressure. There were variations in the beginning, end and duration of each epidemic period of HRSV, as well as in the occurrence of groups and subgroups.

Key words: human respiratory syncytial virus; epidemiology; antigenic variation

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Histórico	15
1.2 Características do Vírus	15
1.2.1 Classificação	15
1.2.2 Estrutura Viral	16
1.2.3 Organização Genômica	21
1.2.4 Replicação Viral	23
1.3 Características Antigênicas e Moleculares	24
1.4 Epidemiologia	26
1.5 Diagnóstico Laboratorial	29
1.6 Profilaxia e Tratamento.....	31
1.7 Pergunta de Partida.....	33
1.8 Hipóteses.....	33
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Descrição do Estudo	35
3.1.1 Tipo de Estudo	35
3.1.2 Local e População de Estudo.....	35
3.1.3 Material Clínico e Coleta de Dados	35
3.2 Diagnóstico Laboratorial	36
3.2.1 Coleta das Amostras	36
3.2.2 Processamento das Amostras	36
3.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta	37
3.2.4 Caracterização Antigênica das Amostras de VSRh	38
3.2.5 Estudo Sobre a Sazonalidade do VSRh	38
3.3 Análise Genômica	38
3.3.1 Cepas Padrões	39
3.4 Extração do RNA total	39
3.4.1 Obtenção do cDNA	40
3.4.2 <i>Primers</i>	40
3.4.3 Amplificação da Região G2 do Gene G	41

3.4.4 Detecção dos Produtos Amplificados	41
3.4.4.1 Viabilidade das Amostras	42
3.4.5 Purificação dos Produtos Amplificados	42
3.4.6 Quantificação do DNA	42
3.5 Sequenciamento Parcial do Gene G do VSRh	43
3.5.1 Purificação	43
3.5.2 Processamento e Alinhamento das Sequências Obtidas.....	44
3.6 Análise da Variabilidade de Nucleotídeos e Aminoácidos Inter e intra-grupos	44
3.7 Análises Filogenéticas	44
4. RESULTADOS	46
4.1 Caracterização das Amostras Analisadas	46
4.2 Distribuição das IRA no Período de Estudo.....	47
4.3 Sazonalidade do VSRh na População Estudada.....	48
4.4. Caracterização Antigênica em Grupos A e B do VSRh.....	49
4.5 Amplificação do Ácido Nucléico dos VSRh por <i>nested</i> PCR	50
4.5.1 Viabilidade das Amostras.....	51
4.6 Sequenciamento da Região G2 do Gene G	51
4.7 Análises Filogenéticas.....	52
4.8 Caracterização da Circulação dos Subgrupos dos VSRh.....	56
4.9 Análise da Variabilidade de Nucleotídeos e Aminoácidos Inter e intra-grupos.....	56
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	
Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	94
Anexo II – Ficha Epidemiológica.....	95
Anexo III – Número de Acesso ao <i>GenBank</i> das Amostras Utilizadas para Comparação e Realização das Análises Filogenéticas do VSRh	96
Anexo IV - Alinhamento de Nucleotídeos das Sequências de VSRh Circulantes entre 2004 e 2008 Pertencentes ao Grupo A	100
Anexo V - Alinhamento de Nucleotídeos das Sequências de VSRh Circulante entre 2004 e 2008 Pertencentes ao Grupo B	104

Anexo VI - Alinhamento de Aminoácidos das Seqüências de VSRh Circulante entre 2004 e 2008 Pertencentes ao Grupo A.....	107
Anexo VII - Alinhamento de Aminoácidos das Seqüências de VSRh Circulante entre 2004 e 2008 Pertencentes ao Grupo B.....	108
Artigos	
Artigo Publicado	110
Artigo Submetido	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – Classificação dos membros da família <i>Paramyxoviridae</i>	16
FIGURA 02 – Representação esquemática do vírus sincicial respiratório humano.	17
FIGURA 03 – Representação esquemática da glicoproteína F.....	19
FIGURA 04 – Representação esquemática da glicoproteína G	20
FIGURA 05 – Mapa gênico do vírus sincicial respiratório humano (linhagem A2).....	22
FIGURA 06 – Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus sincicial respiratório humano.	24
FIGURA 07 – Esquema do genoma viral e emparelhamento dos <i>primers</i>	40
FIGURA 08 - Distribuição semanal acumulada nos diversos anos de estudo de todos os casos de infecções respiratórias agudas analisadas, dos casos de infecções respiratórias agudas causadas pelo vírus sincicial respiratório humano e de infecções respiratórias agudas causadas por outros vírus pesquisados.....	48
FIGURA 09 – Distribuição semanal de infecções respiratórias agudas causadas pelo vírus sincicial respiratório humano durante os períodos epidêmicos ocorridos de 2004 a 2008 em Fortaleza.....	49
FIGURA 10 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio para visualização do produto do <i>Nested-PCR</i> da região G2 amplificada gene G.....	50
FIGURA 11 – Filograma representativo da topologia da árvore de consenso estrito, obtida pelo método da Máxima Parcimônia para as cepas de VSRhA circulantes em Fortaleza nos anos de 2004 a 2008.....	52
FIGURA 12 – Filograma representativo da topologia da árvore de consenso estrito, obtida pelo método da Máxima Parcimônia para as cepas de VSRhB circulantes em Fortaleza nos anos de 2004 a 2008.....	53
FIGURA 13 – Filograma representativo da topologia da árvore consenso estrito obtida pelo método da distância evolutiva, das cepas de VSRhA circulantes em Fortaleza nos anos de 2004 a 2008.....	54
FIGURA 14 – Filograma representativo da topologia da árvore consenso estrito obtida pelo método da distância evolutiva, das cepas de VSRhB circulantes em Fortaleza nos anos de 2004 a 2008.....	55

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01- Relação dos <i>primers</i> utilizados para reação de PCR, <i>nested</i> e sequenciamento.	41
QUADRO 02- Sequências dos <i>primers</i> 16S.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Características da população de estudo conforme resultado da pesquisa viral na amostra clínica por imunofluorescência indireta.....	46
TABELA 02 – Caracterização e distribuição das amostras coletadas e analisadas por ano de estudo.....	47
TABELA 03 – Distribuição em grupos antigênicos dos vírus sincicial respiratório humano detectados no estudo e analisados por imunofluorescência indireta..	50
TABELA 04 – Distribuição em grupos antigênicos dos vírus sincicial respiratório humano detectados no estudo e analisados por sequenciamento de nucleotídeos.....	51
TABELA 05 – Distribuição dos subgrupos dos vírus sincicial respiratório humano circulantes em Fortaleza durante o período de estudo.....	55
TABELA 06 - Correlação genética entre sequências dos vírus sincicial respiratório de cada subgrupo.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcM – anticorpo monoclonal

cDNA – DNA complementar

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxinucleotídeo trifosfato

ddNTP - didesoxinucleotídeo trifosfato

ECP- efeito citopático

ELISA - ensaio imunoenzimático de fase sólida

FUNCEME – fundação cearense de meteorologia

IF - imunofluorescência

IFD – imunofluorescência direta

IFI - imunofluorescência indireta

Hep-2 – linhagem celular derivada de carcinoma de laringe

HIAS - Hospital Infantil Albert Sabin

IgG – imunoglobulina da classe G

IgM – imunoglobulina da classe M

IRA - infecções respiratórias agudas

LV-UFC – laboratório de virologia – Universidade Federal do Ceará

MEM-E - meio essencial mínimo com sais de Earle

MPVh - metapneumovírus humano

NT – nucleotídeos

PB – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

PBS- tampão salina fosfato

RNA – ácido ribonucléico

RPM- rotações por minuto

RT-PCR - reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

VSRh - vírus sincicial respiratório humano

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O vírus sincicial respiratório humano (VSRh) foi descrito pela primeira vez em 1956 por Morris e col., quando um grupo de chimpanzés apresentou sintomatologia de doença respiratória semelhante a um resfriado comum com espirros, coriza, tosse e secreção mucopurulenta. Devido a esse fato, o vírus foi denominado de agente da coriza de chimpanzé (*chimpanzee coryza agent* – CCA) (MORRIS et al., 1956). Em 1957, um vírus semelhante ao CCA foi isolado em duas crianças, uma com pneumonia e outra com crupe, em Baltimore (Estados Unidos - EUA). Devido a sua afinidade pelo trato respiratório e sua capacidade de formar sincícios em culturas celulares, o nome *chimpanzee coryza agent* foi substituído por vírus sincicial respiratório humano (CHANOCK et al., 1957). Estudos sorológicos realizados na época, indicaram que a maioria das crianças menores de quatro anos de idade já tinham sido infectadas pelo VSRh.

No Brasil, os primeiros trabalhos sobre o VSRh foram realizados entre os anos de 1961 e 1968. Os estudos realizados nesse período caracterizaram-se como soroepidemiológicos. (PEREIRA et al., 1961; CANDEIAS, et al., 1966 a,b; CANDEIAS et al., 1968).

Atualmente, no Brasil e no mundo, o VSRh é reconhecido como o principal agente etiológico nos casos de infecções respiratórias de etiologia viral em lactentes e crianças de idade pré escolar, podendo causar desde de infecções brandas a pneumonias e bronquiolites (COLLINS et al., 2007).

1.2 Características do Vírus

1.2.1 Classificação

O VSRh é um membro da ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, e gênero *Pneumovirus*, a qual pertence também o vírus sincicial respiratório bovino e o vírus da pneumonia de camundongo (COLLINS et al., 1996). A atual classificação está representada na figura 01.

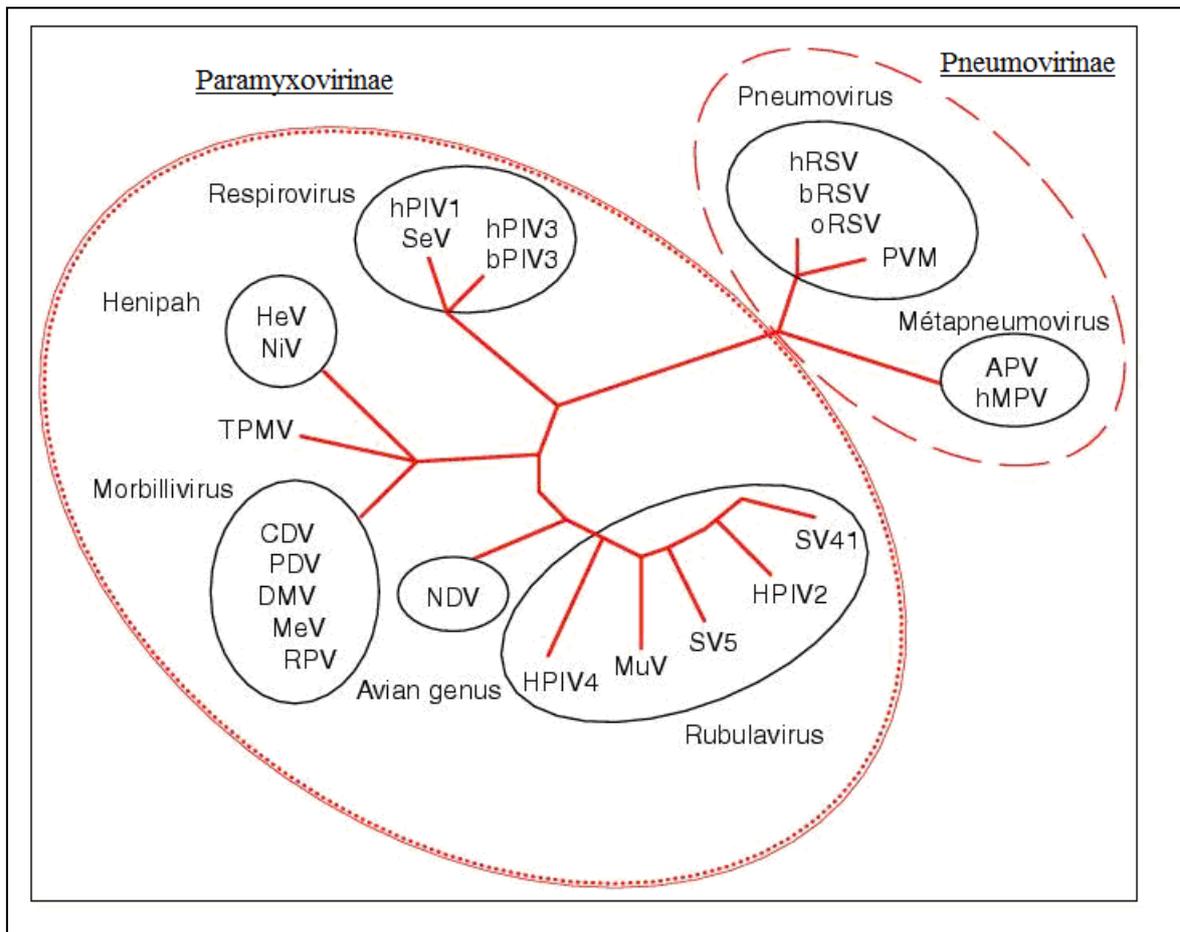


Figura 01 – Classificação dos membros pertencentes a família *Paramyxoviridae*.

Fonte: www.jle.com/.../51/article.md?fichier=images.htm

1.2.2 Estrutura Viral

O vírion do VSRh é composto por um nucleocapsídeo de simetria helicoidal com diâmetro que varia entre 150 a 300nm Na sua superfície encontra-se o envelope, onde estão localizadas as glicoproteínas F e G que estão envolvidas no processo de adsorção e penetração do vírus na célula (COLLINS et al., 2007).

As proteínas virais dividem-se em estruturais: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), as proteínas M_{2-1} e M_{2-2} , pequena proteína hidrofóbica (SH), proteína de adsorção (G), proteína de fusão (F) e complexo polimerase (L), e não estruturais: NS1 e NS2 (COLLINS et al., 2007). A figura 02 mostra a representação esquemática do vírus.

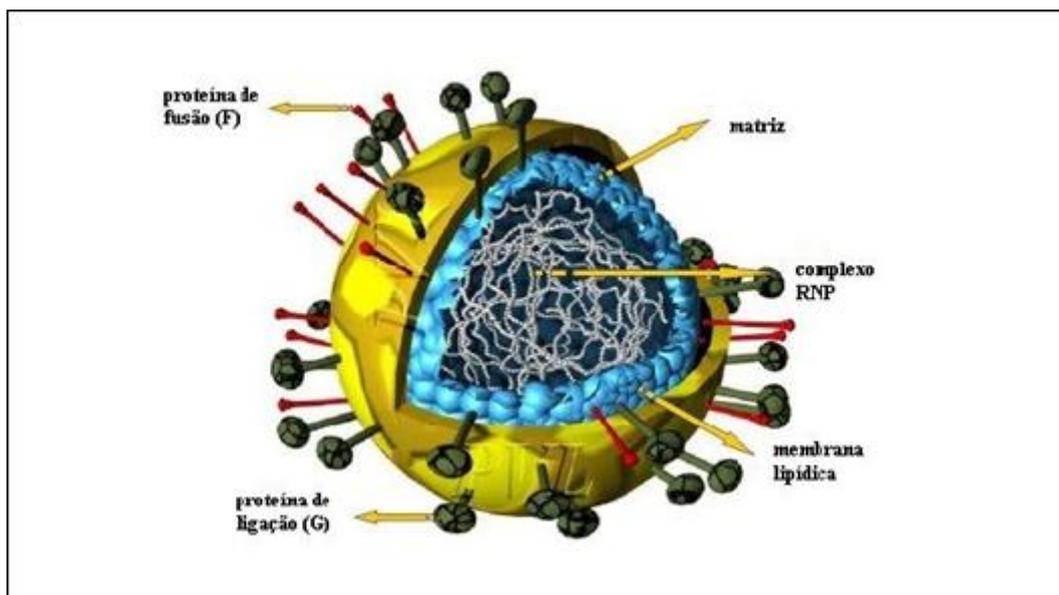


Figura 02 – Representação esquemática do vírus sincicial respiratório humano.

Adaptado de www.bio.warick.ac.uk/easton/images/Diagrams/3d.jpg

As proteínas NS1 e NS2 possuem 139 e 124 aminoácidos, respectivamente. Suas funções não estão totalmente esclarecidas, no entanto por serem proteínas não estruturais sugere-se que elas estejam envolvidas com a regulação da transcrição e da replicação do RNA viral (COLLINS et al., 2007). Estudos sugerem que a presença de tais proteínas pode levar à inibição da liberação de *interferons* (INF) alfa e beta que induzem a resposta imune inata e adaptativa, explicando as freqüentes taxas de reinfecção pelo vírus (LO et al., 2005; MUNIR et al., 2008).

As proteínas M e M₂₋₁ são proteínas internas e não glicosiladas que possuem 256 e 194 aminoácidos, respectivamente. As funções da proteína M são mediar a associação do nucleocapsídeo com envelope nascente e inibir a transcrição celular no início das infecções (HILDYAL et al., 2002; COLLINS et al., 2007; LI et al., 2008).

A proteína M₂₋₁ interage com as proteínas N e P atuando como um fator regulador no processo de transcrição, favorecendo a passagem da polimerase viral pela região intergênica e permitindo seu acesso à unidade final de transcrição (CARTEE; WERTZ, 2001; COLLINS et al., 2007). A proteína M₂₋₁ é essencial para a replicação do VSRh. Alterações na sua seqüência de aminoácidos diminuem a infectividade do vírus (TANG et al., 2001). A proteína M₂₋₂ também é interna e não glicosilada, com função regulatória, envolvendo-se na mudança da transcrição para a replicação do RNA viral (CHENG et al., 2005).

A glicoproteína SH é uma pequena molécula hidrofóbica que possui entre 64 e 65 aminoácidos (CHEN et al., 2000). Durante a infecção, a maioria da proteína SH acumula-se

em estruturas lipídicas do complexo de Golgi e na superfície da célula, ficando uma baixa quantidade da proteína associada ao envelope viral (RIXON et al., 2004). Embora o papel desempenhado pela proteína SH durante a infecção seja desconhecido, alguns estudos relacionam essa proteína à fusão do vírus à célula hospedeira (COLLINS et al., 2007). Estudos recentes sugerem que a presença da proteína SH na célula hospedeira pode inibir a apoptose em várias linhagens de células mamíferas, o que representa um mecanismo de escape à resposta imune do hospedeiro (FUENTES et al., 2007; GAN et al., 2008).

As proteínas N, P e L estão associadas ao nucleocapsídeo e ao RNA genômico, formando o complexo ribonucleoprotéico, considerado como a unidade mínima para a transcrição e replicação viral. A proteína N (nucleoproteína) possui 391 aminoácidos, sendo ela a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo. A proteína P (fosfoproteína), que é altamente fosforilada e ácida tem 241 aminoácidos. A proteína L é a maior proteína expressa pelo vírus sendo formada por 2165 aminoácidos, contendo seis segmentos altamente conservados. Provavelmente, a proteína L é a enzima RNA polimerase RNA dependente, baseada em seu tamanho e localização no nucleocapsídeo (COLLINS et al., 2007).

A proteína F (fusão) e a proteína G (adsorção) são glicoproteínas de superfície que atuam como importantes imunógenos durante a infecção viral (SULLENDER, 2000; CANE, 2001). Anticorpos monoclonais (AcM) e policlonais específicos contra estas proteínas são capazes de neutralizar o vírus *in vitro* (ANDERSON et al., 1988; SULLENDER, 2000).

A glicoproteína F possui 574 aminoácidos e é uma proteína do tipo I, ou seja, está ancorada na membrana próximo a região carboxila-terminal (intracitoplasmática) e contém uma seqüência sinal de clivagem próximo à região amino-terminal (localizada na parte externa da membrana citoplasmática). Ela é responsável pela ligação do envelope viral à membrana da célula hospedeira e pela posterior liberação do nucleocapsídeo viral dentro do citoplasma celular. Também proporciona a ligação da célula infectada a uma adjacente favorecendo a formação de sincícios (COLLINS et al., 2007). É sintetizada inicialmente por um precursor inativo F_0 formado pelo domínio F_2 (aminoácidos 1-130), peptídeo de clivagem (aminoácidos 131-136) e domínio F_1 (aminoácido 137-574). Após a síntese e a glicosilação, o precursor F_0 é clivado no complexo de Golgi em duas subunidades ligadas por pontes dissulfeto, F_1 e F_2 . A subunidade F_1 é relativamente bem conservada e permanece ancorada à membrana, enquanto a subunidade F_2 está relacionada à formação de sincícios (SCHLENDER et al., 2003). A glicoproteína F está representada na figura 03.

As espículas da proteína F apresentam-se de forma homotetramérica, ou seja, cada espícula é formada por quatro unidades idênticas da proteína e induz a formação de anticorpos neutralizantes (SULLENDER et al., 1998; COLLINS et al., 2007).

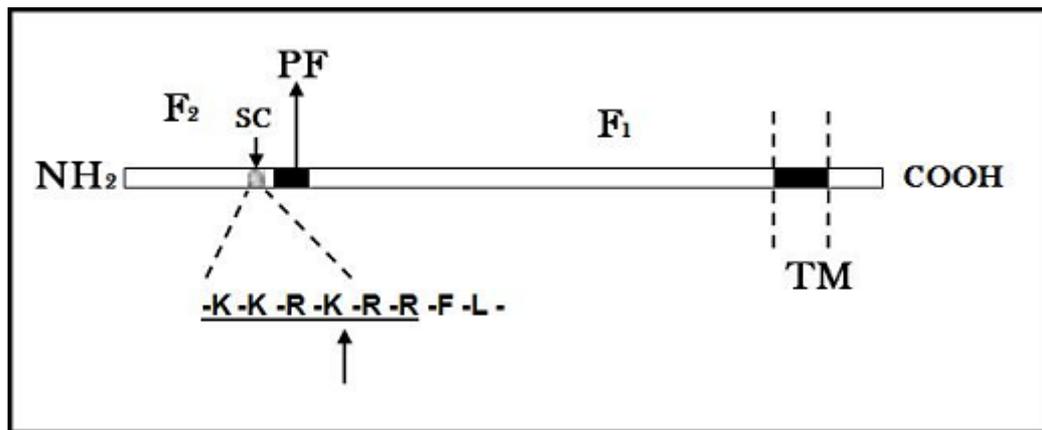


Figura 03 – Representação esquemática da glicoproteína F. Os domínios F1 e F2 são formados após clivagem proteolítica do precursor F₀. A região transmembrana (TM) e o sítio de clivagem (SC) localizado entre os aminoácidos 131-136 de F₀ estão assinalados na figura. Adaptada de COLLINS et al., 1996.

A proteína G possui entre 282 e 319 aminoácidos, dependendo da cepa viral. É o principal componente estrutural viral de adesão do vírus a célula hospedeira. Foi demonstrado que anticorpos neutralizantes contra a proteína G inibiam a ligação do vírus a célula hospedeira (LEVINE et al., 1987). Sabe-se que é uma proteína análoga a hemaglutinina presente nos demais vírus da família *Paramyxoviridae*, porém não apresenta ação hemaglutinante. Essa proteína é uma glicoproteína do tipo II, ancorada à membrana próxima a sua porção amino-terminal por um domínio hidrofóbico não clivável, tipo sinal âncora, que se estende do resíduo 38 ao 66 (COLLINS et al., 2007). O ectodomínio externo carboxila-terminal da proteína G caracteriza-se por conter um alto teor serina e treonina (30%), que são sítios potenciais de ligações glicosiladas tipo “O”, ou seja, ligações de glicídios a átomos de oxigênio das cadeias laterais destes aminoácidos. A glicosilação dessa proteína também se faz por ligações do tipo “N”, ou seja, ligações de glicídios ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral da asparagina. O ectodomínio externo contém de três a oito sítios para a adição de oligossacarídeos por ligação tipo “N” e mais de 70 sítios para ligações do tipo “O”, embora estime-se que a proteína madura possua 24-25 cadeias de glicídios O-ligados. Devido a sua constituição, foi sugerido que a glicoproteína G do VSRh seria homóloga às mucinas secretadas pelas células epiteliais (WERTZ et al., 1985; JOHNSON et al., 1987; COLLINS et al., 2007).

A glicoproteína G caracteriza-se como a região gênica de maior variabilidade entre os isolados virais, podendo suportar substituições e deleções de aminoácidos sem perder sua função (ANDERSON et al., 1985; MUFSON et al., 1985; JOHNSON et al., 1987). A variabilidade da proteína G encontra-se no domínio extracelular, que tem duas regiões variáveis intercaladas por um segmento curto estritamente conservado. As regiões variáveis contêm um alto teor de treonina, serina e prolina e divergem em cerca de 56% entre as cepas do grupo A e B (JOHNSON et al., 1987). A região mais conservada é composta por 13 aminoácidos (164-179, no protótipo A2) e quatro resíduos de cisteína conservados (C^{173} , C^{176} , C^{182} , C^{186}) em todas as amostras de VSRh (MELERO et al., 1997; SULLENDER, 2000). Acredita-se que este segmento conservado, seja o responsável pela ligação do vírus ao receptor celular e que estimula as respostas celulares do tipo Th1 e Th2 (VARGA et al., 2001). A figura 04 mostra a representação esquemática da glicoproteína G.

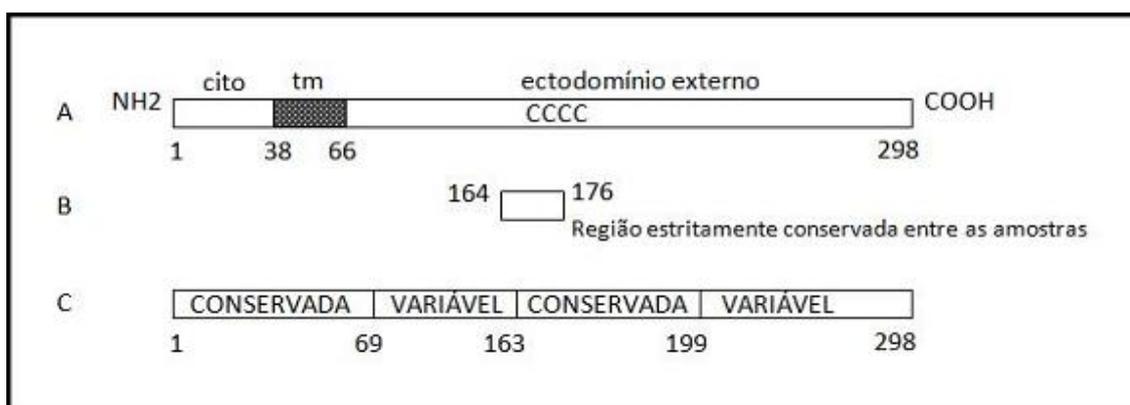


Figura 04 – Representação esquemática da glicoproteína G. (A) Estrutura primária de aminoácidos da linhagem A2, sendo TM = região transmembrana: cito = região citoplasmática, CCCC = quatro resíduos de cisteína conservados (C^{173} , C^{176} , C^{182} , C^{186}) em todas as amostras, (B) Região de 13 aminoácidos estritamente conservada nas amostras de VSRh, (C) Representação das duas regiões variáveis da proteína G intra e inter-grupos do VSRh, ricas em serinas, treonina e prolina, intercaladas por uma região mais conservada, compreendendo os aminoácidos 163-199. As regiões transmembrana e citoplasmática, compreendendo os aminoácidos 1-69, são conservadas. Adaptado de SULLENDER, 2000.

A polimerase do VSRh copia repetidamente parte da seqüência do gene da proteína G, como um mecanismo adicional, gerando uma maior diversidade do vírus. Análises de VSRh circulantes a partir de 1999 mostram uma inserção de 60 nucleotídeos no gene da

proteína G para amostras do grupo B, fato este que confere um aumento de 20 aminoácidos na sua cadeia peptídica (TRENTO et al., 2003). Sugere-se que essa inserção esteja relacionada a um aumento da glicosilação na proteína, o que por sua vez, pode relacionar-se a um aumento da antigenicidade e infectividade do vírus (NAGAI et al., 2004).

1.2.3 Organização Genômica

O genoma viral é composto por uma fita simples de RNA não segmentado de polaridade negativa (-ssRNA) que serve como modelo para a transcrição de 10 moléculas de RNA mensageiro (mRNA) codificando 11 proteínas. O genoma possui 15222 nucleotídeos e peso molecular aproximado de 5×10^6 Da (COLLINS et al., 2007).

A transcrição do genoma viral ocorre no sentido 3'-5'. A região 3' do RNA genômico é composta de um segmento extragênico de 44 nucleotídeos, que contém o promotor viral. Os primeiros 30 nucleotídeos desta região, conhecida como *leader*, são suscetíveis à inativação por inserção ou deleção de nucleotídeos. Após essa região seguem-se dez genes dispostos na seguinte ordem: 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'. O último gene, o (L), é seguido por uma região extragênica, *trailer*, com 155 nucleotídeos que é mais tolerante à inserção ou deleção de nucleotídeos. (COLLINS et al., 1996; SULLENDER, 2000). A figura 05 representa o mapa gênico feito com base na linhagem A2.

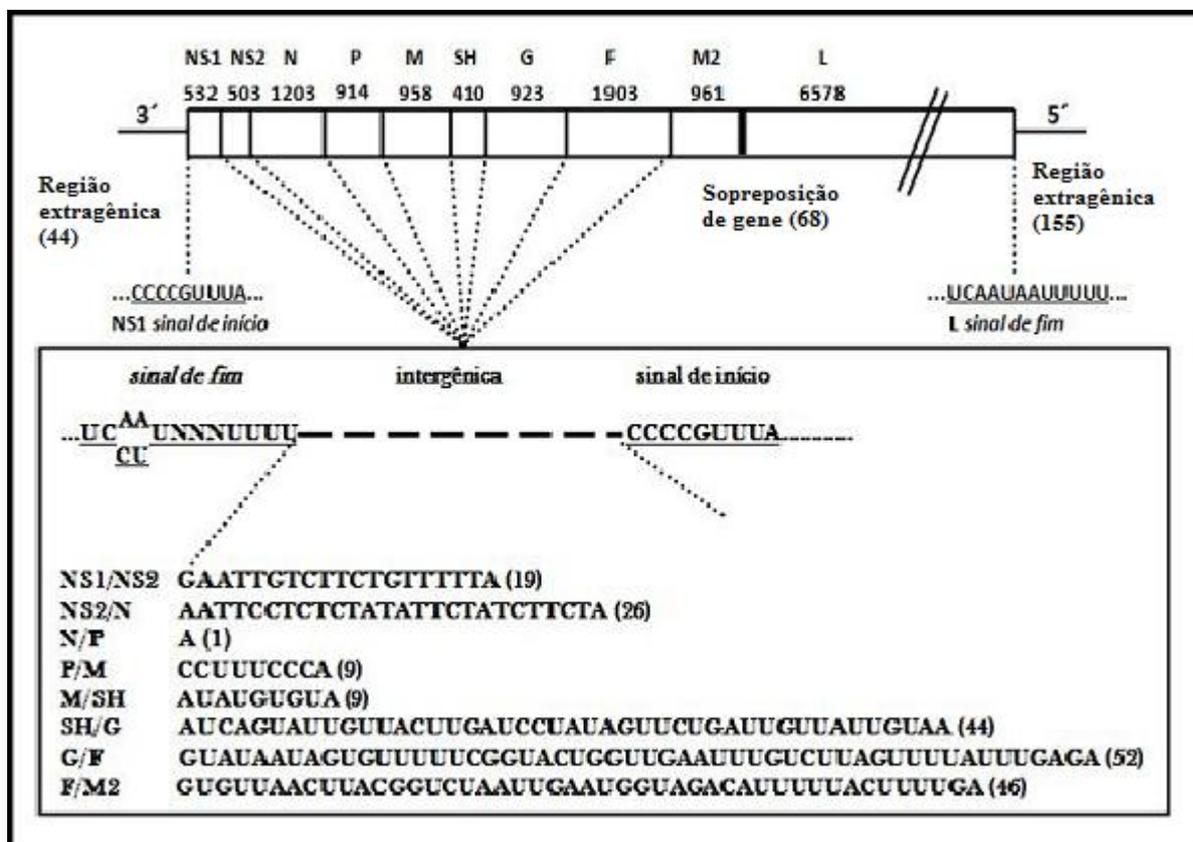


Figura 05 – Mapa gênico do vírus sincicial respiratório humano (linhagem A2). Os genes são identificados de acordo com a proteína que codifica e estão listados ao longo da parte superior do mapa. Os números abaixo dos nomes de cada gene correspondem ao tamanho, em nucleotídeo do gene completo. Os números entre parênteses correspondem ao tamanho, em nucleotídeos, das seqüências apontadas. A caixa de texto mostra as regiões intergênicas. Adaptado de COLLINS et al., 1996.

Cada gene inicia-se com um sinal (*gene-start signal*) de nove nucleotídeos, altamente conservados 3'-CCCCGUUUA, com exceção para o gene L que apresenta diferenças em dois nucleotídeos, 3'-CCCUGUUUUA, e termina com um sinal (*gene-end signal*) semiconservado de 12 a 13 nucleotídeos, 3'-UCA^A_UUN^{AAA}_{UUU}UUU, que direciona a terminação transcricional e a poliadenilação (COLLINS et al., 1996; SULLENDER, 2000).

Os primeiros nove genes são separados por regiões intergênicas que podem variar entre 1 e 52 nucleotídeos, com exceção dos dois últimos genes M2 e L, com o gene L sobrepondo o gene M2 em 68 nucleotídeos, ou seja, o sinal de início do gene L está localizado dentro do gene M2, assim como o sinal de término e poliadenilação do gene M2 está localizado dentro do gene L. O gene M2 possui 2 ORF (*open reading frame*) que dão origem às proteínas M2-1 e M2-2 (COLLINS et al., 2007).

1.2.4 Replicação Viral

O receptor celular específico para a glicoproteína G foi descrito em 1997. A ligação da proteína G à heparina foi demonstrada, ao se demonstrar que incubação do vírus com inibidores de heparina inibia a infecção de culturas celulares. Estes resultados sugeriram que a heparina e outros glicosaminoglicanos (GAG) semelhantes à heparina estão envolvidos na ligação do vírus à célula hospedeira (KRUSAT; STRECKERT, 1997). O sítio de ligação da heparina ou outro GAG está localizado entre os aminoácidos 183-198 da proteína G, portanto fora do segmento de 13 aminoácidos conservados nas amostras de VSRh (FELDMAN et al., 1999).

Após a adsorção da proteína G, a proteína F promove a fusão do envelope viral à membrana celular através de um mecanismo que envolve principalmente a porção hidrofóbica amino-terminal de F1. O processo de fusão introduz o nucleocapsídeo viral diretamente dentro do citoplasma celular, mantendo o envoltório viral integrado à membrana da célula hospedeira. A replicação inicia-se com a transcrição do genoma viral pela polimerase. Os

genes são transcritos de forma seqüencial a partir da extremidade 3', onde se localiza o promotor viral, terminando e reiniciando em cada uma das junções intergênicas. A expressão de cada mRNA está relacionada com a posição do gene no sentido 3'→5', ocorrendo um maior acúmulo dos mRNA na região mais próxima do promotor viral (COLLINS et al., 2001; KREMPL et al., 2002).

Durante a tradução das proteínas, a replicação do genoma viral produz um RNA intermediário de polaridade positiva (+ssRNA), que servirá como molde para gerar cópias do genoma viral infectante (-ssRNA). A produção do RNA intermediário necessita que os mRNA sejam produzidos num modo de “anti-terminação”, ignorando os sinais de início e fim de cada gene (COLLINS et al., 2001).

A montagem do nucleocapsídeo acontece no citoplasma em duas etapas distintas. Na primeira ocorre a associação da proteína N ao RNA genômico formando o complexo ribonucleoproteína (RNP). Em seguida as proteínas P e L se associam ao complexo formando o nucleocapsídeo. A proteína M direciona o nucleocapsídeo às regiões da membrana celular onde se localizam as glicoproteínas virais, já modificadas durante o seu transporte através do retículo endoplasmático e complexo de Golgi. O nucleocapsídeo alcança a superfície viral realizando então o processo de brotamento da partícula viral, com a liberação do vírus. Durante essa etapa o vírus adquire o envelope lipídico na superfície da célula hospedeira (COLLINS et al., 2007). A replicação do VSRh está representada na figura 06.

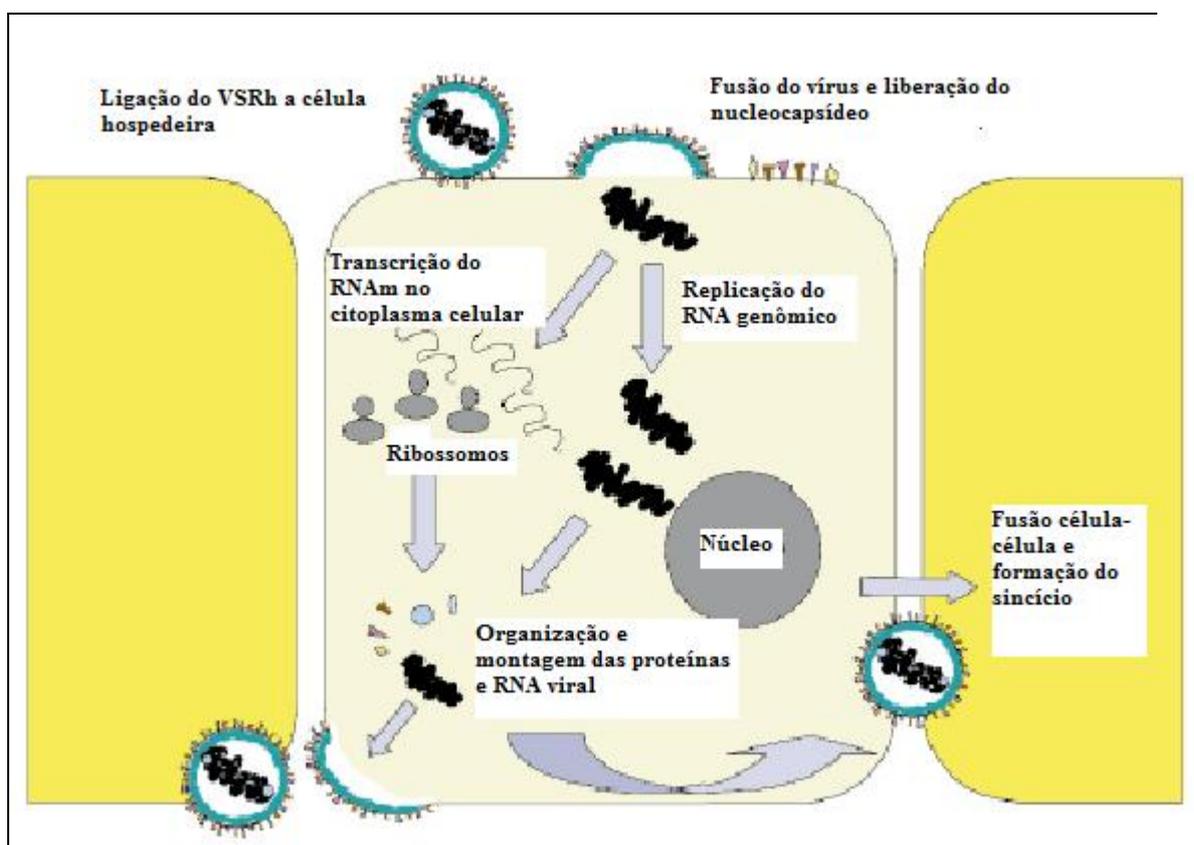


Figura 06 – Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus sincicial respiratório humano. A replicação do RNA envolve a transcrição do mRNA a partir do genoma viral por uma transcriptase viral, depois, usando as proteínas formadas durante a transcrição, há uma produção de fitas positivas, que por sua vez são utilizadas para a síntese do RNA genômico viral. Adaptado de HACKING; HULL, 2002.

1.3 Características Antigênicas e Moleculares

Inicialmente acreditava-se que existia apenas um sorotipo de VSRh, porém em 1963, Coates e colaboradores observaram que existiam diferenças antigênicas entre duas amostras. A cepa A1 não era neutralizada com soro hiperimune de coelhos produzido pela cepa Long. Em um estudo posterior, Coates et al. (1966) observaram diferenças antigênicas em outras cepas virais, Long e CH 18537. Nesse estudo observou-se que a cepa A1 não era neutralizada com soro preparado com a amostra Long ou CH 18537, sugerindo que variantes diferentes poderiam estar circulando simultaneamente na população.

Com o surgimento dos anticorpos monoclonais (AcM) essas diferenças antigênicas tornaram-se mais evidentes (GIMENEZ et al., 1984; ANDERSON et al., 1985). Entretanto, foram os trabalhos de Anderson et al. (1985) e Mufson et al. (1985) que estabeleceram a divisão do VSRh em grupos antigênicos A e B com base na reatividade a um painel de AcM

para as proteínas N e P e para as glicoproteínas G e F, sendo o VSRhA representado pelas cepas A2 e Long e o VSRhB, pelas cepas CH18537 e Sw8/60.

Na segunda metade da década de 80 iniciaram-se os primeiros estudos sobre as bases genéticas da variação antigênica. Ao se comparar as seqüências nucleotídicas e as seqüências deduzidas de aminoácidos do mRNA do gene G das cepas protótipos A2, Long e CH18537 observou-se que entre as amostras do mesmo grupo, A2 e Long, a divergência encontrada foi pequena, de 4% na seqüência de nucleotídeos, e de 6% na seqüência de aminoácidos. Quando comparadas seqüências de grupos distintos, A2 e CH18537, verificou-se uma divergência de 33% na seqüência de nucleotídeos e de 47% na seqüência de aminoácidos (JOHNSON et al., 1987).

Estudos complementares comparando as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos dos genes das proteínas NS1, SH, F e N das amostras A2 e CH18537 mostraram uma menor variação. As porcentagens de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos encontradas foram respectivamente de: 72 e 76% para o gene SH, 82 e 89% para o gene F, 83 e 87% para o gene NS1, 86 e 96% para o gene N (JOHNSON et al. 1987; SULLENDER, 2000).

Posteriormente, observou-se que havia variações antigênicas dentro de cada grupo, possibilitando a divisão em subgrupos característicos. Os estudos de variabilidade antigênica foram complementados com os estudos de variabilidade genômica servindo de base para um melhor entendimento sobre a circulação do vírus e da sua evolução.

A variabilidade dos isolados dentro dos grupos A e B foi inicialmente demonstrada com diferença nas reações com AcM e depois usando métodos de clivagem com enzimas de restrição, ensaio com RNase, ensaio com heteroduplex e análise de seqüenciamento de nucleotídeos (SULLENDER et al., 2000, CANE, 2001, KUROIWA et al., 2004). O seqüenciamento de nucleotídeos do gene G mostra que a variabilidade de aminoácidos é acima de 20% dentro do VSRhA e 9% dentro do VSRhB (CANE, 2001).

O VSRhA é representado por, pelo menos, nove subgrupos distintos, GA1 a GA7, SAA1 e JaA1. Na última década, vem sendo observada a predominância dos subgrupos GA2 e GA5 na Suécia, Bélgica, Moçambique, África do Sul, os EUA, Índia, América do Sul, Singapura, China, Japão e Brasil (PERET et al., 1998; VENTER et al., 2001; LIM et al., 2003; ZLATEVA et al., 2004; GALIANO et al., 2005; KUROIWA et al., 2005; PARVEEN et al., 2006; ZHANG et al., 2007; ANTONIASSI et al., 2008 ; RAFIEFARD et al., 2008). Os subgrupos GA1, GA3 e GA4 foram predominantes no fim da década de 80 e início da década de 90 na Inglaterra e Europa Central, desaparecendo ou diminuindo consideravelmente em períodos seguintes. Em Cuba, o subgrupo GA1 circulou depois 1990 (VALDÉS et al., 1998; CANE, 2001; RAFIEFARD et al., 2004).

O grupo B é dividido em seis subgrupos, GB1 a GB4 e SAB1 a SAB3 (VENTER et al., 2001; GILCA et al., 2006). Desde 1999 vem sendo relatada a circulação de um novo subgrupo caracterizado por possuir uma duplicação de 60 nucleotídeos a partir do resíduo 791 do gene G (TRENTO et al., 2003; NAGAI et al., 2004; ZLATEVA et al., 2004; KUROIWA et al., 2005; SATO et al., 2005; ZLATEVA et al., 2005). Inserções menores (de três a seis nucleotídeos) também vêm sendo relatadas, demonstrando a grande variabilidade da proteína G (BLANC et al., 2005; ZLATEVA et al., 2007).

1.4 Epidemiologia

A infecção pelo VSRh ocupa lugar de destaque dentre as infecções respiratórias agudas (IRA), principalmente em crianças menores de dois anos, em todo o mundo (KANEKO et al., 2002; MOURA et al., 2006; MADHI et al., 2003; SHEK; LEE, 2003; SCOTT et al., 2006). Seu período epidêmico está associado a um aumento no número de atendimentos em emergências hospitalares devido a IRA e um aumento de hospitalizações, principalmente por infecções baixas. Em crianças de idade reduzida e lactentes, o VSRh é considerado o agente viral mais freqüente do trato respiratório inferior, causando bronquiolite e pneumonia (AVEDAÑO et al., 2003; BOSSO et al., 2004; D'ELIA et al., 2005; MOURA et al., 2006; BERGER et al. 2009).

Nos EUA é estimado que o VSRh seja responsável por 18000 a 75000 hospitalizações e 90 a 1900 mortes por ano (GIRARD et al., 2005). A mortalidade é mais comum em crianças que apresentam fatores de risco para doenças mais graves, como por exemplo, doenças cardíacas congênitas, doenças pulmonares e prematuridade, onde a mortalidade pela infecção fica em torno de 10%, 5,5% e 4,6%, respectivamente (SHAY et al., 2001).

Atualmente o VSRh é reconhecido como um importante patógeno para idosos e adultos com doenças de base (doença obstrutiva pulmonar crônica, doença cardíaca e imunocomprometidos) predispostos a infecções mais graves pelo vírus (FALSEY; WALSH, 2005; RAMIREZ, 2008).

A transmissão do VSRh ocorre pelo contato direto com secreções contaminadas em roupas ou objetos e, menos freqüentemente, através da aspiração de perdigotos (TRISTRAM; WELLIVER, 1996). A transmissão em hospitais pediátricos deve ser controlada, principalmente em crianças com fatores de risco para doença grave. Esses pacientes, quando adquirem infecção nosocomial, apresentam hospitalização de duração prolongada e elevada taxa de mortalidade quando comparadas a crianças sem fatores de risco ou com doença adquirida na comunidade (LANGLEY et al., 1997; MLINARIC-GALINOVIC; VARDA-

BRKIC, 2000; THORBURN et al., 2004). A transmissão ocorre principalmente através das mãos da equipe médica (HALL, 2000).

O VSRh apresenta uma sazonalidade bem definida com períodos epidêmicos anuais que variam em intensidade e extensão, de ano para ano (LINA et al., 1996; CHEW et al., 1998; CARBALLAL et al., 2000; VIEIRA et al., 2001; SHEK; LEE, 2003; MOURA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008). Ainda não foram definidos quais os fatores que determinam a variação da circulação do VSRh, entretanto vários estudos demonstram correlações entre os períodos epidêmicos de VSRh e que os fatores ambientais e climáticos como a temperatura, a ocorrência de chuvas, a umidade do ar e a radiação solar (YUSUF et al., 2007; OMER et al., 2008; NOYOLA; MANDEVILLE, 2008).

No Brasil, dados de diferentes estados mostram a variação da circulação do VSRh no país. No Rio de Janeiro e em São Paulo, os períodos epidêmicos ocorrem no outono e inverno, com raros casos no restante do ano (CINTRA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 1991; VIEIRA et al., 2001). No Espírito Santo, o vírus foi identificado durante todo o ano, com exceção dos meses de agosto e dezembro (SILVA, 1999; CHECON et al., 2002). No Rio Grande do Sul, a infecção pelo VSRh aumenta nos meses de frio, podendo circular, mesmo em pequenos números, nos outros meses do ano (STRALIOTTO et al., 2001; STRALIOTTO et al., 2002). Em Uberlândia, o VSRh foi detectado durante o verão e estendendo-se até o fim do outono, durante os meses de março, abril e maio, durante a ocorrência de chuvas na região. Nos estudos realizados no Nordeste, Fortaleza, Salvador, Aracaju e Maceió, a associação da circulação do VSRh com o período chuvoso já está bem definida, a detecção do VSRh ocorre entre fevereiro e agosto com maior incidência observada durante o meio do surto (CUEVAS et al., 2003; MOURA et al., 2003; SERAFINO et al., 2004; MOURA et al., 2006). No norte, com a ocorrência de chuvas e temperaturas elevadas durante todo o ano, a circulação do VSRh apresenta um padrão diferenciado. O vírus pode ser detectado durante todos os meses do ano, com o pico de atividade viral durante os seis primeiros meses do ano estando associado principalmente ao período de troca da estação chuvosa para um período de menor pluviosidade (BARBAGELATA et al., 2007).

A variação antigênica dos grupos de VSRh parece contribuir para a alta incidência de reinfecções durante os primeiros anos de vida. Alguns autores concluíram que as infecções pelo VSRhA são mais graves (HALL et al., 1990; IMAZ et al., 2000; GILCA et al., 2006). Buckingham e colaboradores (2000) não relacionaram uma maior ou menor gravidade da doença com o tipo do vírus, mas com a quantidade de vírus presente na secreção.

O padrão de circulação dos VSRhA e VSRhB diverge de local para local e de ano para ano. Dados da literatura revelam que os dois grupos têm circulados conjuntamente em muitas

epidemias e em várias regiões do mundo, com a predominância do VSRhA (BOTOSSO, 2002; FRABASILE et al., 2003; SCOTT et al., 2004; ZLATEVA et al., 2004; VIEGAS; MISTCHENKO, 2005; GILCA et al., 2006). Relatos de períodos epidêmicos com a predominância do VSRhB são descritos em alguns estudos (HENDRY et al., 1986; LUKIC-GRLIC et al., 1998).

Estudos sobre a variabilidade genômica dos VSRh demonstram a circulação de vários subgrupos em um mesmo período epidêmico, com a predominância de um ou dois subgrupos, os quais podem continuar circulando por vários anos consecutivos ou diminuir nos períodos epidêmicos subseqüentes até seu desaparecimento (CANE; PRINGLE, 1991; CANE et al., 1994; PERET et al., 1998; PERET et al., 2000; CHOI; LEE et al., 2000; ZLATEVA et al., 2004; ZLATEVA et al., 2005; FODHA et al., 2008; RAFIEFARD et al., 2008).

A maioria dos trabalhos sobre variabilidade genômica e evolução da proteína G realizados até o ano 2000, baseava-se na análise de cepas dos VSRh A. Isso limitou o conhecimento sobre a variabilidade genômica do VSRhB (GARCIA et al., 1994; SANZ et al., 1994; ZLATEVA et al., 2004; KAMASAKI et al., 2001; TRENTO et al., 2003). Isto talvez esteja relacionado à predominância de circulação do VSRhA sobre o VSRhB, que pode ser também atribuída à alta variabilidade das amostras do VSRhA (PERET et al., 1998; VENTER et al., 2001). A identificação de cepas de VSRh do grupo B com a inserção dos 60 nucleotídeos, contribuiu sensivelmente para a melhor descrição da diversidade genética e epidemiológica do grupo B (TRENTO et al., 2003; ARBIZA et al., 2005; BLANC et al., 2005; ZLATEVA et al., 2005; FODHA et al., 2008).

Os subgrupos têm distribuição mundial e cepas isoladas em comunidades distintas podem ser mais relacionadas que as isoladas em um mesmo lugar, demonstrando um padrão de circulação mais temporal que geográfico (CANE et al., 1992; GARCIA et al., 1994). Os subgrupos que surgem no final de um período epidêmico tendem a predominar no período seguinte (SATO et al., 2005; ZLATEVA et al., 2005).

As mudanças decorrentes das alterações genéticas nos subgrupos podem interferir na estrutura antigênica do vírus, conferindo uma vantagem evolucionária, o que permite re-infectar indivíduos expostos ao VSRh anteriormente. Dentro de cada subgrupo ocorre um acúmulo progressivo de mudanças de aminoácidos. As mutações sinônimas de nucleotídeos têm uma distribuição uniforme pelo gene G, enquanto as não sinônimas estão concentradas em duas regiões variáveis da molécula G (CANE; PRINGLE, 1995).

Os subgrupos de VSRh A e B mostram uma dinâmica flutuante, uma vez que podem co-circular durante um período, com um ou dois subgrupos dominantes, que são então

substituídos em anos consecutivos (ZLATEVA et al., 2004; ZLATEVA et al., 2005; BOTOSSO et al., 2009).

1.5 Diagnóstico Laboratorial

A fim de aperfeiçoar o diagnóstico das IRA causadas pelo VSRh, várias técnicas laboratoriais têm sido empregadas. A identificação rápida do VSRh em casos de infecção permite a adoção das medidas de controle da infecção, evitando inclusive a ocorrência de surtos de infecções hospitalares, nas quais o VSRh ocupa posição de destaque (GROOTHUIS et al., 2008). A confirmação laboratorial precoce de infecções pelo VSRh poderá ser utilizada para a utilização mais racional de antibióticos.

Os espécimes clínicos utilizados para o diagnóstico de infecções pelo VSRh são as secreções nasofaríngeas obtidas por aspiração, lavagem das secreções e *swab* nasal. Por ser um vírus lábil, as amostras depois de colhidas devem ser mantidas sob refrigeração durante o transporte ao laboratório e processamento e antes da inoculação em cultura de células (COLLINS et al., 2001).

Para o diagnóstico laboratorial de rotina os procedimentos incluem o isolamento do vírus em cultura de células, a detecção do antígeno por imunofluorescência ou ensaio imunoenzimático e a detecção do RNA viral pela técnica de RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa). O diagnóstico do VSRh pode ser direto, pela detecção dos antígenos virais, do ácido nucléico e/ou do vírus infectante ou indireto, pela detecção de anticorpos específicos para o agente (WARIS et al., 1992).

O isolamento em cultura de células pode ser realizado em ampla variedade de linhagens de células humanas e animais. As linhagens mais utilizadas são a HEp-2 (carcinoma de laringe humano) e a NCI-H92 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano) (HIERHOLZER et al., 1994; TRISTAM; WELLIVER et al., 1996). O efeito citopático (ECP) característico é a formação de sincícios resultantes da fusão das células que aparecem dentro de três a sete dias após a inoculação. Após o aparecimento do ECP a confirmação do isolamento viral é feita com reações utilizando anticorpos específicos ou técnicas moleculares. Uma variação da cultura celular é o método *shell vial*, no qual as amostras são inoculadas em células, centrifugadas e incubadas por dois dias. Após esse processo o material também é submetido à reação de imunofluorescência para a detecção dos antígenos virais (REINA et al., 2004).

A imunofluorescência (IF) é uma técnica bastante utilizada para o diagnóstico do VSRh, por se tratar de um método rápido e de fácil execução quando comparado ao

isolamento em cultura celular. Entretanto, esse método requer cuidados essenciais para o seu sucesso, tais como a presença de um número adequado de células na amostra e um microscopista experiente. Tanto a imunofluorescência direta (IFD) com a indireta (IFI) podem ser utilizadas para diagnosticar o VSRh (DAYAN et al., 2002; SARMIENTO et al., 2002).

O ensaio imunoenzimático é um método rápido que permite a análise de um grande número de amostras que é aplicado tanto para a detecção de antígenos virais no material clínico como para a confirmação do isolamento viral em cultura celular. Esses testes utilizam uma combinação de AcM para a captura do antígeno e anticorpos anti-antígenos marcados com peroxidase. As vantagens desse método comparado com a IF são a objetividade da leitura e possibilidade de automação, entretanto ela não é tão sensível quanto a IF podendo apresentar resultados falso-positivos (KELLOGG et al., 1991; FALSEY et al., 2002).

As provas sorológicas utilizadas para o diagnóstico de infecções pelo VSRh incluem as reações de neutralização, fixação do complemento e a determinação de imunoglobulinas classe específicas (IgG, IgM), através da técnica de ELISA. Nelas podem ser utilizados o soro, a saliva ou o aspirado de nasofaringe (TRISTRAM; WELLIVER, 1996; WILSON et al., 2000). Contudo, a sorologia não permite o diagnóstico rápido da doença, já que os anticorpos só surgem após sua fase aguda. Além disso, a sorologia apresenta valor limitado no diagnóstico de infecções primárias em crianças menores de seis meses de idade, pois 40% destas não apresentam aumento de títulos de anticorpos. Em adultos e crianças mais velhas a sorologia é considerada como um bom indicador de reinfecção (CANE, 2001).

A técnica de RT-PCR permite a detecção do ácido nucléico viral. A RT-PCR é considerada uma técnica de alta sensibilidade, especialmente útil no diagnóstico das infecções, em que há uma baixa quantidade de excreção do vírus e o período de excreção maior, como o caso de pacientes idosos (WALSH et al., 2001; MULLINS et al., 2004). Inúmeras variações da técnica de RT-PCR foram desenvolvidas demonstrando sensibilidade igual ou superior a outras técnicas diagnósticas, como a cultura de células convencional e outros métodos de detecção de antígenos (COIRAS et al., 2003; WEINBERG et al., 2004; ROVIDA et al., 2005). A RT-PCR também permite a caracterização antigênica do vírus em grupos A e B, sendo útil para a análise genética das amostras (ZHENG et al., 1996; PERET et al., 1998; PERET et al., 2000).

A técnica de RT *nested* PCR é considerada ainda mais sensível que a técnica de RT-PCR por submeter o produto amplificado a uma segunda amplificação. Porém, enfrenta um grave problema de contaminação devido ao excessivo manuseio da amostra, necessitando de instalações apropriadas para a execução da técnica. Em um estudo brasileiro, a utilização da técnica de RT *nested* PCR para o diagnóstico de VSRh, detectou cerca de 10% mais amostras

positivas que a IF, e diante disso poderia ser considerada uma método diagnóstico mais eficiente. Contudo, a IF apresentou maior praticidade, com menor custo e facilmente executada em laboratórios que apresentam instalações simplificadas. A única ressalva feita à IF é que a leitura é subjetiva e depende da presença de um microscopista com experiência (VIEIRA et al., 2001).

O *genescan*-RT-PCR tem sido empregado para o diagnóstico de viroses respiratórias. Baseando-se na detecção automática de fluorescência durante a eletroforese em capilar, essa técnica de alta precisão, verifica o tamanho dos fragmentos de DNA (ERDMAN et al., 2003). Tal técnica, foi utilizada em um estudo de vigilância epidemiológica de vírus respiratórios em São Paulo apresentando uma boa sensibilidade, especificidade e concordância quando comparada à IFI para diagnóstico de VSRh (THOMAZELLI, 2004).

Real-time PCR é uma técnica de diagnóstico que combina a RT-PCR convencional com uma tecnologia que capta os sinais de fluorescência durante os ciclos da PCR. A *real-time* PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade quando comparada ao isolamento em cultura convencional e *shell vial*. Estudos realizados em Hong Kong, durante o inverno de 2000 e 2001, visando a detecção, caracterização antigênica (A e B) e quantificação do VSRh mostrou que a TaqMan *real-time* PCR é mais sensível que a cultura convencional (HU et al., 2003). O estudo realizado por van Elden e colaboradores em 2003, aplicou a *real-time* PCR como método diagnóstico, concluindo que a RT *nested* PCR e a TaqMan *real-time* PCR são superiores a detecção pela cultura *shell vial*, sendo considerado um teste de diagnóstico rápido e sensível na detecção do VSRh em pacientes adultos e imunocomprometidos. No entanto o *real-time* PCR tem um custo bastante elevado, além de necessitar de equipamento específico, o que dificulta sua utilização na rotina laboratorial de diagnóstico.

Uma técnica de diagnóstico ideal deve ser rápida, sensível, específica, de baixo custo e fácil execução. O tempo de diagnóstico é um fator relevante para adoção de medidas efetivas individuais ou coletivas na profilaxia e no tratamento das IRA pelo VSRh.

1.6 Profilaxia e Tratamento

Como tratamento da infecção pelo VSRh indica-se a utilização da ribavirina (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), um nucleosídeo análogo à guanósina. Seu uso é indicado na forma de aerossol para o tratamento de doenças graves causadas pelo VSRh. Apesar de vários estudos terem demonstrado a eficácia da ribavirina na inibição da replicação do vírus e na melhoria das condições clínicas, proporcionando uma diminuição na necessidade de suplementação de oxigênio e ventilação mecânica em crianças com infecções

respiratórias inferiores, ainda há controvérsias quanto ao seu uso (BRICKS, 2001; WAHAB et al., 2001; CROWE, 2002).

Desde a década de 60, têm-se buscado o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura contra o VSRh a fim de tentar solucionar os problemas decorrentes da infecção pelo vírus, como o alto índice de hospitalizações.

Inicialmente foi produzida e testada em crianças e lactentes uma vacina de vírus inativado com formalina. Foram aplicadas duas doses, por via intramuscular, em crianças de dois meses a sete anos, com intervalo de um a três meses. Porém, além de não proteger contra a doença causada pelo VSRh houve uma exacerbação da mesma após a infecção natural com o vírus selvagem (DUDAS; KARRON, 1998).

A utilização das técnicas de biologia molecular e biotecnologia possibilitaram o desenvolvimento de novas metodologias de produção de vacinas, incluindo: vírus vivo atenuado, vacinas com subunidades virais, vírus recombinantes que contém os epítomos protetores do VSRh, clones infecciosos do VSRh e proteínas virais expressas por DNA plasmidial, entretanto até o momento, não há uma vacina segura e eficaz para o uso em crianças (DUDAS; KARRON et al., 1998; ANDERSON, 2001; CROWEL, 2002).

Como profilaxia alternativa às vacinas, preconiza-se a utilização de AcM, em pacientes de grupos de risco para infecções mais graves pelo VSRh. Vários anticorpos já foram testados, porém apenas o MEDI 493 ou Palivizumab mostrou-se eficaz em testes clínicos. O Palivizumab é uma IgG de camundongo humanizada que atua ligando-se à glicoproteína F (FENTON, 2004). Um estudo multicêntrico realizado nos EUA, Canadá e Reino Unido com a utilização de Palivizumab em pacientes de risco para infecções graves pelo VSRh mostrou haver uma redução de 55% nas hospitalizações por infecções pelo VSRh, queda no número de dias de internação e na necessidade de suplementação de oxigênio (THE IMPACT RSV STUDY GROUP, 1998).

Embora o VSRh tenha sido isolado a mais de cinco décadas e a diferenciação em grupos antigênicos há mais de quarenta anos, muitas questões ainda estão em aberto quanto à patogenicidade dos dois grupos, o padrão epidemiológico do vírus, a resposta imunológica e quanto à relevância das diferenças entre as cepas virais no desenvolvimento de uma vacina.

1.7 Pergunta de Partida

- Quais as características antigênicas e genômicas dos VSRh circulantes em Fortaleza durante cinco períodos epidêmicos consecutivos?

1.8 Hipóteses

- O padrão de circulação dos grupos e subgrupos dos VSRh em Fortaleza durante o período analisado mantém a característica observada na maioria dos outros locais já estudados.
- Os subgrupos dos VSRh circulantes no período de estudo em Fortaleza podem ser mais relacionados aqueles encontrados em áreas geográficas mais próximas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade genética de ambos os grupos A e B do VSRh circulantes em Fortaleza, Ceará – Brasil, durante cinco períodos epidêmicos consecutivos (2004-2008) pelo seqüenciamento de nucleotídeos da região hipervariável C-terminal do ectomínio da proteína G do VSRh.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os períodos epidêmicos de VSRh em Fortaleza.
- Verificar a diversidade genética dos VSRh circulantes em cinco anos consecutivos.
- Caracterizar o padrão de circulação dos diferentes subgrupos identificados nos diversos anos de estudo.
- Comparar o padrão de circulação dos subgrupos de VSRh em Fortaleza com aqueles descritos em alguns estudos já publicados (nacionais e internacionais).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição do Estudo

3.1.1 Tipo de Estudo

Esse foi um estudo do tipo descritivo, transversal, retrospectivo e observacional, que compreendeu o período de janeiro de 2004 a dezembro de 2008.

3.1.2 População e Local do Estudo

A população de estudo foi composta por pacientes atendidos nos setores de emergência (pronto-atendimento) e enfermarias do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS) em Fortaleza. O HIAS é um hospital pediátrico, de nível terciário, com atividades de ensino e assistência, sendo o principal hospital pediátrico do estado do Ceará.

Foram incluídos no estudo pacientes de 0 a 16 anos de idade, com presença de secreção nasofaríngea, atendidos por IRA, iniciada a não mais de sete dias.

3.1.3 Material Clínico e Coleta de Dados

A coleta de dados e do material clínico ficou sob responsabilidade dos estudantes de medicina e enfermagem que participam do Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Ceará (LV – UFC). Esta coleta ocorreu de forma regular, durante os dias úteis, pela manhã e/ou tarde durante o período analisado.

Antes da coleta do material clínico, a secreção de nasofaringe, o responsável do paciente era informado sobre os objetivos da pesquisa realizada pelo LV – UFC e autorizava a coleta assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I), solicitado pelo Comitê de Ética Médica do HIAS.

O responsável pela criança era entrevistado pelos alunos participantes da pesquisa para o preenchimento da ficha epidemiológica (Anexo II). Alguns dados de identificação da criança, história clínica da doença atual foram fornecidos pelo responsável pela criança. Dados de exame físico, exames realizados e tratamento instituído foram obtidos diretamente do médico que prestou atendimento à criança, da folha de atendimento na sala de observação, ou do prontuário do paciente em caso de internamento. Essas informações eram arquivadas em uma planilha do Excel compondo o banco de dados do LV – UFC.

3.2 Diagnóstico Laboratorial

3.2.1 Coleta das Amostras

De uma das narinas da criança foi colhido o espécime clínico, o aspirado nasofarínge (ANF), através de aspiração, utilizando uma sonda de aspiração traqueal nº 6 acoplada a uma seringa de 20 mL, segundo a técnica de Gardner; McQuillin, 1980. A sonda era introduzida em uma das narinas até a altura da nasofarínge (aproximadamente metade da distância compreendida entre o nariz e o ouvido da criança). Caso não fosse coletado material suficiente esse procedimento era repetido na outra narina.

Após a coleta, a amostra era identificada com o nome do paciente da qual foi coletada e colocada em caixa de isopor contendo gelo reciclável, para ser transportada ao final de cada turno de coleta, para o LV – UFC, onde ficava sob refrigeração (4°C) até seu processamento, que deveria ocorrer em no máximo 4 horas após a coleta.

3.2.2 Processamento das Amostras

No máximo 24 horas após a coleta, as secreções de nasofarínge eram transferidas para um tubo de centrífuga de poliestireno, com capacidade para 15 mL, contendo 2 mL de Meio Essencial Mínimo com sais de Earle (MEM-E), adicionado de penicilina-estreptomicina (10.000U/mL de penicilina e 10.000µg/mL de estreptomicina), L-glutamina a 2% e bicarbonato de sódio a 7,5%. Para a quebra do muco e liberação das células presentes nessas secreções, as amostras eram homogeneizadas através de movimentos de aspiração e ejeção da solução com o auxílio de uma pipeta Pasteur conectada a uma pêra de aspiração.

Uma alíquota de aproximadamente 1 mL de material diluído era colocada em criotubos de 2mL e armazenada a -70°C, para posterior análise. Os tubos contendo o restante da secreção diluída eram, então, centrifugados a 1500rpm (400xg), por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante também era armazenado a -70°C para estudos posteriores. O sedimento era diluído em tampão salina fosfato (PBS), em quantidade variável de acordo com o volume do sedimento. A solução homogeneizada como descrito anteriormente era, então, dispensada em lâminas para IFI. Três lâminas foram preparadas para IF, sendo uma para triagem de amostras positivas e negativas, uma para realização da IF específica, em caso de amostra positiva na triagem e a última era utilizada como reserva. A amostra processada era colocada nos dois orifícios centrais da lâmina de triagem e nos orifícios externos das duas outras lâminas para a identificação. A secagem das amostras nas lâminas era realizada em estufa a 37°C, e a fixação, em acetona a 4°C por 10 minutos. Após

evaporação da acetona, as amostras eram submetidas à reação de IFI. As lâminas reservas eram mantidas em freezer -80° C.

3.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta

O método de IFI foi empregado para detecção rápida de antígenos do VSRh, adenovírus, influenza A e B e parainfluenza 1, 2 e 3. Para isso utilizou-se o *Respiratory Panel 1 Viral Screening & Identification Kit* (Chemicon International Inc., EUA).

Na lâmina de triagem, adicionava-se 8µL de um *pool* AcM contra os vírus identificados pelo *kit*, em um dos orifícios e, no outro, 8µL do anticorpo de camundongo não infectado, o controle negativo da reação. As lâminas eram incubadas em câmara úmida, a 37°C, por 30 minutos. A seguir, elas eram lavadas com PBS-Tween por 5 minutos e submetidas à secagem na estufa. O mesmo volume (8µL) do segundo anticorpo (anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à fluoresceína) era, então, colocado nos dois orifícios. O tempo e as condições de incubação eram os mesmos da etapa anterior. Após a secagem final das lâminas, elas eram montadas com lamínulas utilizando-se o óleo de montagem do próprio *kit*. A leitura era realizada em microscópio de fluorescência (Modelo BX-40, marca Olympus). Considerava-se como resultado positivo a presença de inclusões fluorescentes características nas células respiratórias.

A partir de 2006, o metapneumovírus humano passou a ser pesquisado pelo LV-UFC utilizando a técnica de IFI. Para tanto, foi utilizado 8µL do AcM de camundongo anti-MPVh da Chemicon na diluição de 1:80 e 8µL do segundo anticorpo (anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado à fluoresceína - Chemicon) na diluição de 1:40 com 0,001% de Azul de Evans, conforme descrito anteriormente (RIBEIRO; MOURA, 2008).

3.2.4 Caracterização Antigênica das Amostras de VSRh

As amostras positivas para o VSRh foram submetidas a técnica de IFI, seguindo as etapas descritas anteriormente (3.2.3) para caracterização antigênica em grupos A e B. Para tanto, utilizou-se os AcM 92-11C (anti-VSRh tipo A) e 102-10B (anti-VSRh tipo B) diluídos em PBS a 1/30. O segundo anticorpo utilizado foi o anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína. Esses anticorpos foram gentilmente cedidos pela Dra. Marilda Siqueira do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro.

Os dados de tipagem do ano de 2004 foram obtidos a partir de um trabalho realizado anteriormente pelo Laboratório de Virologia (NUNES, 2004). As lâminas reservas dos anos de 2005 a 2008 foram utilizadas para tipagem das amostras.

3.2.5 Caracterização da sazonalidade do VSRh

Para o estudo da sazonalidade dos VSRh em Fortaleza, analisou-se a distribuição dos casos de IRA e IRA causadas pelo VSRh por semana. O VSRh foi considerado ativamente presente quando 10% ou mais das amostras coletadas eram positivas para VSRh. O início de cada período epidêmico foi considerado como a 1ª de duas semanas consecutivas com VSRh ativamente presente. O final de cada período epidêmico foi identificado como a última semana com VSRh ativamente presente, que antecederesse duas semanas consecutivas com VSRh sendo detectado em menos de 10% das amostras coletadas (BORON et al., 2008). A média mensal do índice pluviométrico na cidade de Fortaleza foi obtida através da Fundação Cearense de Meteorologia (FUNCEME).

3.3 Análise Genômica

Foram escolhidas 50 amostras de cada período epidêmico, totalizando 250 amostras para análise genômica. O critério utilizado para seleção de amostras foi o grau de positividade das amostras na IFI. Somente amostras com mais de 10 células fluorescentes por campo microscópico foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação parcial do gene G.

3.3.1 Cepas Padrões

Foram utilizadas cepas padrões de VSRh representantes do grupo A e B, Long e CH 18537, respectivamente, para controle positivo da extração e reação de RT-PCR, mantidas em células Hep-2, gentilmente cedidas pelo Profº. Drº. Edison Luís Durigon (Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB-II- (USP).

3.4 Extração do RNA Total

39

A extração do RNA total das amostras selecionadas para análise molecular foi feita com o auxílio do *QIamp Viral RNA Mini Kit* seguindo instruções do fabricante (Qiagen, Alemanha).

Uma alíquota de 140µL do material clínico foi adicionada a um tubo eppendorf com 560µL do tampão AVL (tiocionato de guanidina). Seguiu-se a homogeneização em vórtex por 15 segundos e incubação por dez minutos em temperatura ambiente (15-25°C). Foram adicionados 560µL de etanol a 100% ao tubo, seguindo-se homogeneização em vórtex por 15 segundos. Uma alíquota de 630µL foi transferida do tubo para a *QIamp mini* coluna, em seguida centrifugada a 8000 rpm por um minuto ou até que toda solução fosse filtrada. O tubo com filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo. À coluna foram adicionados 500µL do tampão AW1 (cloridrato de guanidina) seguindo-se de centrifugação a 8000rpm por um minuto. Novamente o tubo contendo o filtrado era descartado e coluna transferida para um novo tubo. À coluna foram adicionados 500µL do tampão AW2 (tampão de lavagem), com centrifugação a 12000rpm durante três minutos. A *QIamp mini* coluna foi transferida para um tubo de 1,5mL para eluir o RNA com 60µL do tampão AVE (água livre de RNase com 0,04% de azida de sódio) . O RNA extraído foi armazenado em *freezer* a -70°C.

3.4.1 Obtenção do cDNA

A etapa da transcrição reversa (RT) foi realizada com o auxílio do *High Capacity cDNA Archive kit*, conforme instruções do fabricante (Applied Biosystems Inc., EUA). Uma alíquota de 50µL do RNA extraído foi diluída em tampão de reação contendo 50 pmoles de *Randon primers*, 50 mM de Tris-HCl [pH 8,3 a 25°C]/75 mM de KCl/ 3 mM de MnCl₂ (10X *RT Buffer*) 10mM de Dihiothreitol, 50U/µL de *MultiScribe RT enzyme*, 1,5 mM dNTP *mix* e água UltraPure tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato – Gibco BRL®) suficiente para volume final de 100µL. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos no termociclador *Mastercycler personal Eppendorf*.

3.4.2 Primers

Os *primers* complementares aos mRNA dos genes das glicoproteínas G e F foram utilizados para amplificar e seqüenciar as amostras de VSRh. A localização dos *primer* 40 genoma viral, a polaridade, a seqüência 5'-3' e sua utilização estão esquematizadas na figura 07 e no quadro 01.

O cDNA obtido foi amplificado utilizando os *primers* FV e GR5. O produto da PCR foi submetido a uma segunda amplificação tipo *nested*, utilizando os *primers* F1AB e GAB.

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

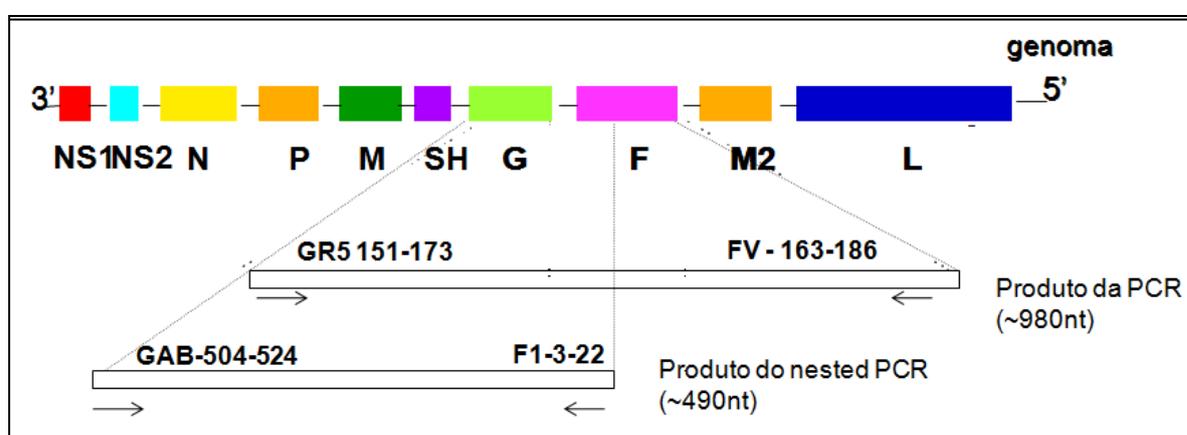


Figura 07 – Esquema do genoma viral e emparelhamento dos *primers*. Os genes estão identificados de acordo com a proteína que codificam e estão listados logo abaixo do esquema do genoma viral. Os retângulos brancos indicam a localização dos *primers* e seu emparelhamento com as fitas alvo. Os tamanhos esperados dos produtos amplificados para cada uma das reações estão indicados à direita do esquema.

Quadro 01- Relação dos *primers* utilizados para reação de PCR, *nested* e seqüenciamento.

<i>Primer</i>	Utilização	Posição (nucleotídeo-nt)	Seqüência (5'-3')	Referência
FV (-)	PCR	163-186 gene F	GTTATGACACTGGTATA CCAACC	ZHENG et al., 1996
GR5 (+)	PCR	151-173 gene G	CTGGCAATGATAATCTC AACTTC	SANZ et al., 1994
F1AB (-)	<i>Nested</i>	3-22 gene F	CAACTCCATTGTTATTT	PERET et al.,

	Seqüenciamento		GCC	1998
GAB (+)	<i>Nested/</i> Seqüenciamento	504-524 gene G	YCAAYTTTGAAGTGTTCA ACTT	PERET et al., 2000

3.4.3 Amplificação da Região G2 do Gene G

A PCR foi realizada com a diluição de 10µL de cDNA, obtido conforme item 3.4.1, em tampão 20 mM de TrisHCl [pH 8,4 a 25°C]/ 50 mM de KCl/ 2 mM de MgCl₂ (10X *buffer*), 25pMol de cada um dos *primers* FV e GR5, 0,2mM de cada dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase (Biotools) e água UltraPure tratada com DEPC (Gibco BRL®) suficiente para volume de 50µL. As amostras foram amplificadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems Inc., EUA), a partir de uma etapa a 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto para a desnaturação das fitas, 54°C por 1 minuto para o *annealing*, 72°C por 1 minuto para a extensão e uma etapa final de 72°C por 7 minutos para completar a extensão das fitas formadas. Os produtos amplificados foram estocados a 4°C.

A reação de *nested* PCR foi feita utilizando 2µL do produto da primeira amplificação, nas mesmas condições descritas acima para volume final de 100µL, utilizando os *primers* F1AB e GAB.

3.4.4 Detecção dos Produtos Amplificados

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% diluída em tampão TBE 1X (45mM de Tris-Borato, 1mM de EDTA[pH 8,0 a 25°C]) e 0,5µg/mL de brometo de etídio. Uma alíquota de 10µL da amostra misturada com 2µL de azul de bromofenol (*loading buffer*) foi submetida à eletroforese em cuba horizontal (Gibco), imerso em tampão TBE 1X durante 40 minutos a 100 Volts. A visualização do gel foi realizada em trans-iluminador de luz ultravioleta.

3.4.4.1 Viabilidade das Amostras

A viabilidade das amostras não amplificadas por PCR ou *nested* PCR foi testada com os *primers* ribossômicos 16S para pesquisa de RNA, gerando um fragmento de 500pb. Essa PCR foi feita nas mesmas condições descritas no item 3.5.3. As seqüências dos *primers* estão representadas no quadro 02.

As amostras que foram amplificadas com o 16S foram submetidas a uma nova reação de *nested* PCR utilizando os *primers* descritos no item 3.4.2 específicos para o VSRh.

Quadro 02- Seqüências dos *primers* 16S

16S (+)	5' - CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'
16S (-)	5' - CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'

3.4.5 Purificação dos Produtos Amplificados

Os produtos da *nested* PCR foram purificados, para remoção de dNTP e *primers* residuais, pelo método de Acetato de Sódio a 3 mM, pH 5,29 e etanol a 100%, conforme descrito por Sambrook e colaboradores em 1989. Para o volume do produto amplificado foram adicionados 10% do volume de acetato de sódio e duas vezes o volume total de etanol gelado a 100%, seguiu-se a homogenização em vórtex e a incubação a -70°C por 3 horas ou em *overnight* a -20°C. A seguir, a mistura foi centrifugada por 30 minutos a 14000 rpm (*Centrifuge 5804R Eppendorf – rotor F 45-36-8*) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 150µL de isopropanol gelado a 75%. A amostra foi centrifugada a 14000rpm por 10 minutos a 4°C (*Centrifuge 5804R Eppendorf – rotor F 45-36-8*), o sobrenadante foi descartado e o sedimento seco em *speed vacuum* à 45°C por 5 minutos. O sedimento foi ressuscitado com 30µL de água UltraPure tratada com DEPC.

3.4.6 Quantificação do DNA

O produto purificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% conforme descrito no item 2.2.10. Sua quantificação foi realizada com o auxílio do marcador de peso molecular DNA *Mass Ladder* (Biotools).

3.5 Seqüenciamento da Região G2 do Gene G

Após a purificação, as fitas de DNA foram submetidas a reação de seqüenciamento utilizando o kit *Abi PRISM DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Big Dye – Applied Biosystems, Inc., EUA)*, seguindo as instruções do fabricante. Cerca de 5µL, correspondendo a 10-30ng do produto purificado foram adicionados a um microtubo com 3,2pMol do *primer* F1AB, 2 µL do *Abi PRISM DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, 2µL do tampão de seqüenciamento (*Save Money – Tris-HCl 200mM [pH 9,0 a 25°C]* e 5mM MgCl₂) e água Mili-Q para completar o volume final de 10µL. O mesmo procedimento foi feito com o *primer* GAB. A extensão enzimática foi realizada em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Inc., EUA) durante 25 ciclos de 96°C por 10 segundos para a desnaturação do DNA molde, 50°C por 10 segundos para o *annealing* dos *primers* e 60°C por 4 minutos para a extensão. Todas as reações foram feitas em triplicadas, sendo uma das reações de seqüenciamento feita com o *primer forward* e duas para o *primer reverse*.

3.5.1 Purificação

O produto obtido foi purificado a fim de remover o excesso de ddNTP “terminadores” presentes na reação por precipitação com isopropanol, descrita a seguir. Ao produto da reação de seqüenciamento foram adicionados 30µL de água MiliQ e 60µL de isopropanol 100%. Essa mistura foi homogenizada em vórtex e centrifugada por 25 minutos a 14000rpm em temperatura ambiente (*Centrifuge 5804R Eppendorf – rotor F 45-36-8*). O sobrenadante foi descartado e em seguida foram adicionados 250µL de etanol a 70%, seguiu-se homogeneização em vórtex e nova centrifugação por 10 minutos a 14000rpm em temperatura ambiente (*Centrifuge 5804R Eppendorf – rotor F 45-36-8*). As amostras purificadas e precipitadas foram ressuspensas com 10µL de formamida ultra pura (Formamida Hi-Di – Applied Biosystems Inc., EUA), desnaturadas a 95°C por 3 minutos e resfriadas em banho de gelo por mais 2 minutos e então submetidas à eletroforese em polímero POP 6 (Applied Biosystems), utilizando o seqüenciador automático ABI-PRISM modelo 3100 (Applied Biosystems).

3.5.2 Processamento e Alinhamento das Seqüências Obtidas

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas com o programa *Sequence Navigator* versão 1.0 (Applied Biosystems) do *Power MacIntosh*, para a obtenção de um segmento de aproximadamente 270 nucleotídeos correspondentes à região G2 do gene codificador da glicoproteína G (PERET et al., 1998; SULLENDER et al., 2000, CAMPOS et al., 2007). Posteriormente, essas seqüências foram traduzidas utilizando-se o programa Edit SeqTM 4,05 – *Expert Analysis software* – DNASTAR, Inc. para PC. As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas juntamente com seqüências adquiridas do *GeneBank* (Anexo III) em dois grupos, A e B, utilizando o programa Meg AlingTM 4,05 – *Expert Analysis software* – DNASTAR, Inc., EUA para PC. Os arquivos correspondentes ao fragmento da região G2 dos grupos A e B foram analisados separadamente com o referido programa, 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 e a genotipagem das amostras.

3.6 Análise da Variabilidade de Nucleotídeos e Aminoácidos Inter e intra-grupos

Para a análise da variabilidade de nucleotídeos intra-grupos, as seqüências representantes de cada grupo foram alinhadas e analisadas, separadamente, utilizando o programa Meg AlingTM 4,05, tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as seqüências, calculado par a par.

Para a análise de variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos inter-grupos foram utilizadas as seqüências consenso representantes de cada um dos grupos. Essas seqüências consenso foram alinhadas e analisadas pelo programa Meg AlingTM 4,05, resultando na obtenção do grau de similaridade entre as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, calculados par a par.

3.7 Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas entre as cepas de VSRh dos grupos A e B foram realizadas empregando os critérios de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (MV) utilizando o programa PAUP*4.0 versão Betas – Sinauer Associates, Inc, (SWOFFORD, 1998), para *Power MacIntosh*.

Os alinhamentos obtidos inicialmente com o programa Meg AlingTM 4,05 foram convertidos em arquivos no formato NEXUS e utilizados para as análises subseqüentes.

O critério de MP (FITCH, 1971) foi empregado utilizando-se busca heurística (*Heuristic Search*) com algoritmo “*stepwise addition*”. Os caracteres foram considerados como não ordenados e sem atribuição de pesos. Os valores dos índices de consistência para as árvores obtidas foram calculados pelo programa MacClade v.3.01 (MADDISON; MADDISON, 1992). A polarização das árvores foi realizada pela inclusão de um grupo externo, representado pela cepa protótipo Long (JOHNSON et al., 1987) para a árvore resultante da análise do grupo B e CH18537 (SULLENDER et al., 1991) para a árvore resultante da análise do grupo A.

Foram calculados valores *bootstrap*, com 100 réplicas, para a verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas (FELSENSTEIN, 1985).

O critério da MV (FELSENSTEIN, 1981) foi empregado realizando-se, inicialmente, o teste de razão de verossimilhança para a escolha do modelo evolutivo a ser utilizado, com o auxílio do programa Modeltest versão 3.06 (David Posada, Department of Zoology, Brigham Young University, USA). Uma vez escolhido o modelo, foi realizada uma busca heurística com o algoritmo de decomposição da politomia.

As taxas de mutações sinônimas e não sinônimas foram analisadas pelo método Nei e Gojobori (NEI; GOJOBORI, 1986) utilizando-se o programa SNAP (Programa de Análise de Mutações Sinônimas e Não Sinônimas).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das Amostras Analisadas

Das crianças atendidas no HIAS durante o período compreendido entre janeiro de 2004 e dezembro de 2008, 2885 foram incluídas na população de estudo. Os casos de IRA dessas crianças submetidos à pesquisa viral por IFI foram definidos como positivos para o VSRh (IRA/VSRh+), IRA viral negativa para VSRh mas positiva para outro(s) vírus pesquisado(s) (IRAV/VSRh-), IRA negativa para qualquer um dos vírus pesquisados (IRA-NV). As características da população de estudo são apresentadas na tabela 01.

Tabela 01 – Características da população de estudo conforme resultado da pesquisa viral na amostra clínica por imunofluorescência indireta.

Características	IRA/VSRh + N(%)	IRAV*/VSRh- N(%)	IRA/NV N(%)	Total de IRA N(%)
Sexo				
Masculino	257 (56,4%)	238 (59,9%)	1145 (56,3%)	1640 (56,8%)
Feminino	198 (43,4%)	158 (39,8%)	884 (43,5%)	1240 (43%)
Idade (meses)				
0-6	149 (32,7%)	71 (17,9%)	391 (19,2%)	611 (21,2%)
7-12	129 (28,3%)	105 (26,4%)	556 (27,4%)	790 (27,4%)
13-18	52 (11,4%)	46 (11,6%)	282 (13,9%)	380 (13,2%)
19-24	52 (11,4%)	55 (13,9%)	290 (14,3%)	397 (13,8%)
25-60	65 (14,2%)	84 (21,2%)	372 (18,3%)	521 (18%)
>60	09 (2%)	36 (9%)	140 (6,9%)	185 (6,4%)
Setor de Atendimento				
Emergência	384 (84,2%)	356 (89,7%)	1829 (90%)	2569 (89%)
Enfermaria	72 (15,8%)	41 (10,3%)	203 (10%)	316 (11%)
Diagnóstico Clínico				
IVAS	161 (35,3%)	220 (55,4%)	1029 (50,6%)	1410 (48,9%)
Bronquiolite	86 (18,9%)	28 (7,1%)	142 (7%)	256 (8,9%)
Pneumonia	88 (19,3%)	59 (14,9%)	347 (17,1%)	494 (17,1%)
Hiperatividade Brônquica	82 (18%)	73 (18,4%)	392 (19,3%)	547 (19%)
Pneumonia+Bronquiolite	21 (4,6%)	02 (0,5%)	22 (1,1%)	45 (1,6%)
Bronquite	17 (3,7%)	12 (3%)	93 (4,5%)	122 (4,2%)
Crupe	01 (0,2%)	03 (0,7%)	07 (0,4%)	11 (0,3%)
Total	456	425	2004	2885

(*) Adenovírus, Influenza A/B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Metapneumovírus humano.

Cada criança foi submetida à coleta de amostra apenas uma vez. Houve coleta regular de amostras em todos os anos analisados, com o mínimo de 411 amostras em 2004 e o máximo de 706 em 2008. Um total de 456 amostras foi positivo para o VSRh, o vírus mais

freqüentemente detectado em todos os anos de estudo. O VSRh esteve em associação com outros vírus em 16 casos. O MPVh foi o vírus mais presente em co-infecção com o VSRh, sendo detectado em nove casos. Adenovírus, influenza A e parainfluenza 1 foram detectados em dois casos cada um e o influenza B em um caso.

A distribuição das amostras coletadas e analisadas em positivas para VSRh, positivas para outros vírus e negativas por ano estudado está representada na tabela 02.

Tabela 02 – Caracterização e distribuição das amostras coletadas e analisadas por ano de estudo.

Ano	Amostras Coletadas	Amostras VSRh + N(%)	Amostras + outros vírus* N(%)	Amostras negativas N(%)
2004	411	102 (24,9%)	57 (13,6%)	252 (61,5%)
2005	492	97 (19,7%)	75 (15,2%)	320 (65,1%)
2006	653	79 (12%)	85 (13%)	489 (74,9%)
2007	623	89 (14,3%)	115 (18,5%)	419 (67,3%)
2008	706	89 (12,6%)	93 (13,2%)	524 (78,2%)
Total	2885	456 (15,8%)	425 (14,7%)	2004 (69,5%)

(*) Adenovírus, Influenza A/B, Parainfluenza 1, 2 e 3, Metapneumovírus humano.

4.2 Distribuição das IRA no Período de Estudo

As IRA ocorreram continuamente ao longo dos cinco anos de estudo em dois picos de intensidades diferentes. O primeiro, mais intenso e duradouro, observado durante o primeiro semestre, apresentou correlação positiva com a ocorrência de chuvas e com os períodos epidêmicos de VSRh. O segundo de menor intensidade era observado entre a 35^a e 42^a semanas. A distribuição semanal acumulada nos cinco anos de estudo das IRA conforme resultado da IFI para pesquisa viral é apresentada na figura 08.

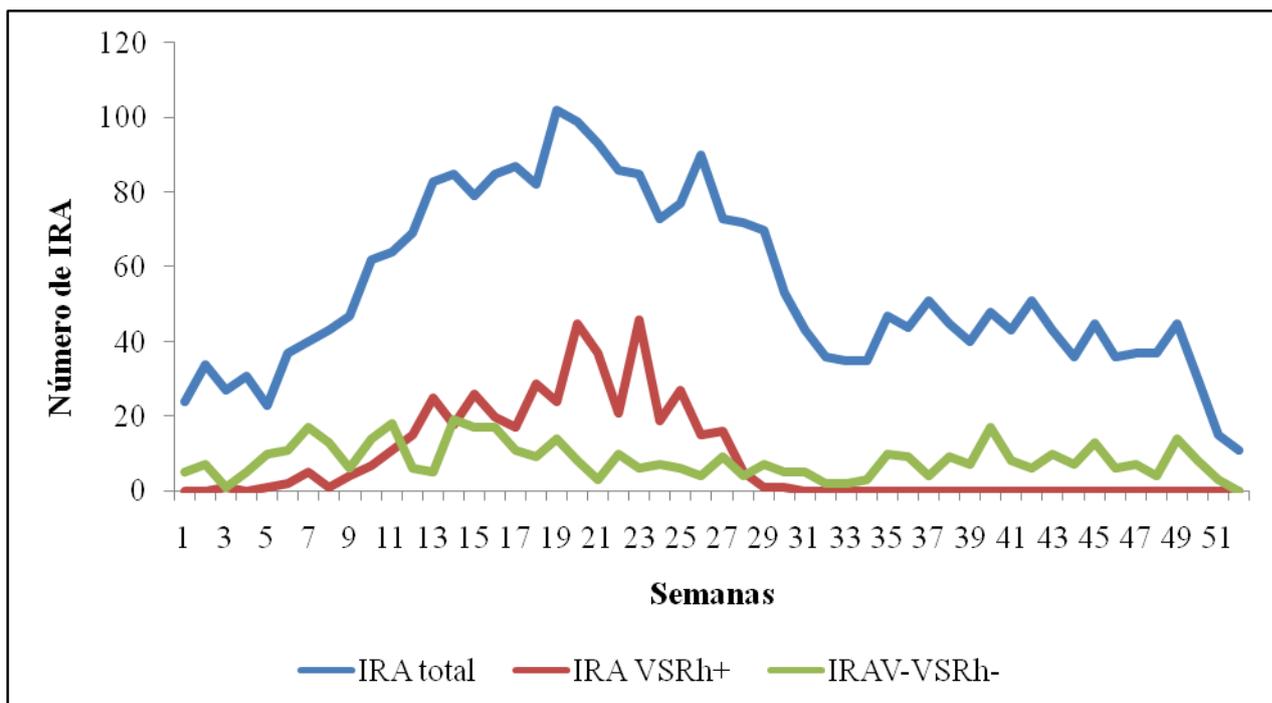


Figura 08- Distribuição semanal acumulada nos diversos anos de estudo de todos os casos de infecções respiratórias agudas analisadas, dos casos de infecções respiratórias agudas causadas pelo vírus sincicial respiratório humano e de infecções respiratórias agudas causadas por outros vírus pesquisados.

4.3 Sazonalidade do VSRh em Fortaleza

O VSRh apresentou um padrão regular de ocorrência anual, caracterizado pela verificação do maior número de casos no primeiro semestre de cada ano. Observou-se uma variação no que se refere ao início, fim e duração dos períodos epidêmicos de VSRh. Os primeiros casos foram observados em meses diferentes, janeiro (2008), fevereiro (2004 e 2007) e março (2005 e 2006), mas o final de cada período epidêmico ocorreu sempre no mês de julho, sem que qualquer outro caso de IRA pelo VSRh fosse observado depois desse mês. O VSRh esteve ativamente presente desde a 6ª semana em 2007 e na 13ª semana em 2005, mas o estabelecimento do período epidêmico de VSRh ocorreu três e quatro semanas após, respectivamente. Nos outros anos de estudo o início da atividade do VSRh coincidiu com o estabelecimento do seu período epidêmico. O percentual de amostras positivas para o VSRh foi $\geq 10\%$ por 13 semanas consecutivas nos anos de 2005 e 2006, e por 16 e 10 semanas consecutivas em 2007 e 2008, respectivamente. Em 2004, observou-se o período epidêmico mais extenso com 24 semanas de duração. A distribuição semanal dos casos de IRA por VSRh nos diferentes períodos epidêmicos é apresentada na figura 09. Nessa figura foram

somente apresentadas as semanas onde algum caso de VSRh foi detectado, isto é, da 3^a até a 31^a semana.

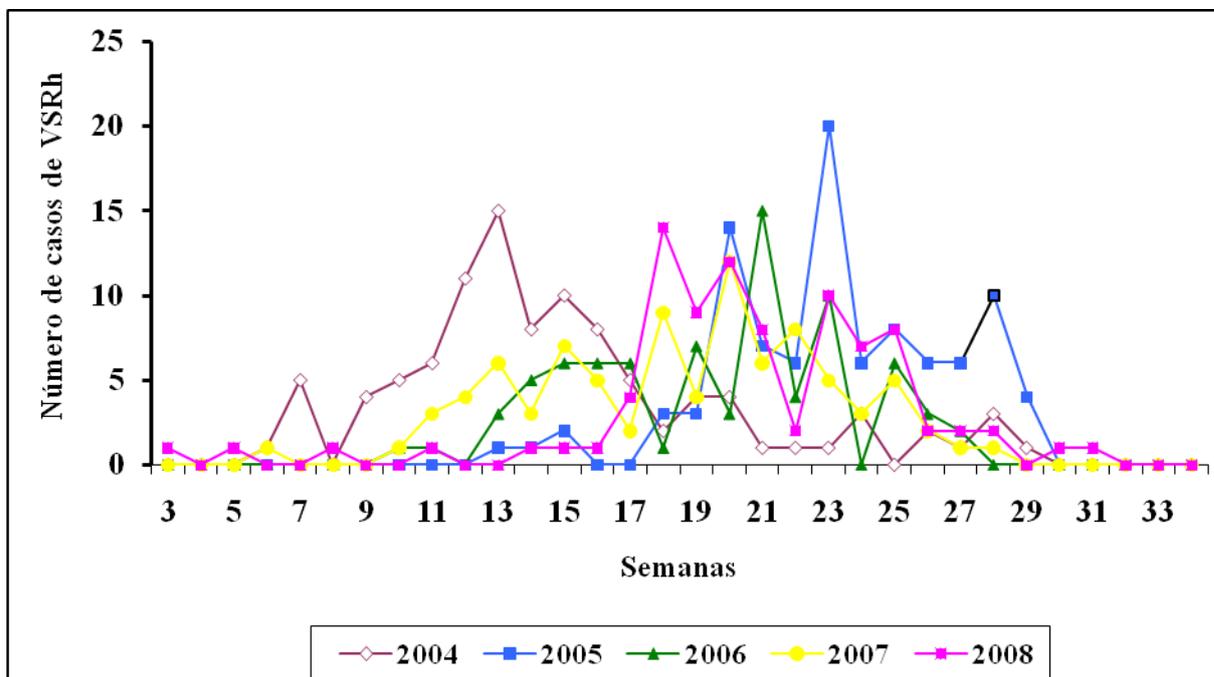


Figura 09 - Distribuição semanal de infecções respiratórias agudas causadas pelo vírus sincicial respiratório humano durante os períodos epidêmicos ocorridos de 2004 a 2008 em Fortaleza.

4.4 Caracterização Antigênica em Grupos A e B do VSRh

Das 456 amostras positivas para o VSRh, 282 (62,1%) foram caracterizadas antigenicamente pelo método de IFI. Dessas, 170 (60,3%) pertenciam ao VSRhA e 112 (39,7%) ao VSRhB. Das amostras não caracterizadas antigenicamente, 122 (70,1%) não possuíam lâminas reservas para a realização da IFI e 52 (29,2%) não puderam ser classificadas em nenhum dos grupos por não mostrarem fluorescência característica.

A co-circulação dos VSRhA e VSRhB e a predominância do VSRhA sobre o VSRhB foram observadas nos cinco anos de estudo. A caracterização antigênica realizada por IFI dos VSRh detectados no período de estudo é apresentada na tabela 03.

Tabela 03 – Distribuição em grupos antigênicos dos vírus sincicial respiratório humano detectados no estudo e analisados por imunofluorescência indireta.

Ano	Amostras Coletadas	VSRh + N(%)	VSRh + Caracterizadas N(%)	Grupo A N(%)	Grupo B N(%)
2004	411	102 (24,8%)	71 (69,6%)	45 (63,4%)	26 (36,6%)
2005	492	97 (19,7%)	54 (55,7%)	31 (57,4%)	23 (42,6%)
2006	653	79 (12,1%)	35 (44,3%)	20 (57,1%)	15 (42,9%)
2007	623	89 (14,3%)	63 (70,7%)	41 (65,1%)	22 (34,9%)
2008	706	89 (12,6%)	59 (66,3%)	33 (55,9%)	26 (44,1%)
Total	2885	456	282	170	112

4.5 Amplificação do ácido nucléico dos VSRh por *nested* PCR

Das 250 amostras selecionadas para análise molecular, 133 (53,25%) foram amplificadas após o *nested* PCR. Na figura 10 pode-se visualizar o resultado da amplificação do ácido nucléico de alguns VSRh analisados.

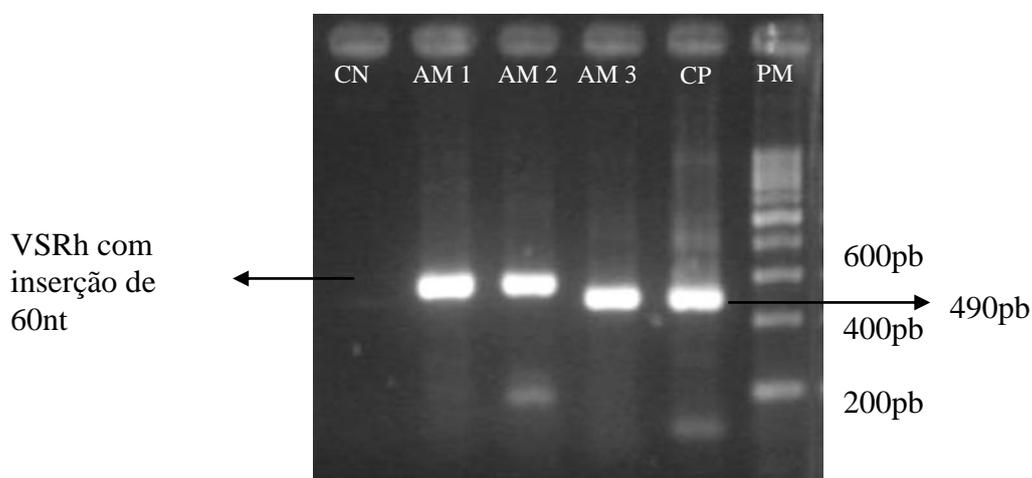


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio para visualização do produto do *Nested*-PCR da região G2 amplificada gene G (490pb). Colunas: CN – controle negativo (água), AM 1- BR_CE_214_2007, AM 2 - BR_CE_305_2008, AM 3 - BR_CE_82_2007 (grupo A), CP – controle positivo A2 isolado de células HEp-2, PM - Marcador de peso molecular – 200pb DNA *ladder* . As amostras AM-1 e AM-2 representam cepas de VSRh que apresentam inserção de 60nt na região amplificada.

4.5.1 Viabilidade das Amostras

Das 250 amostras analisadas por técnicas moleculares, 117 (46,8%) não amplificaram e tiveram sua viabilidade testada com os *primers* 16S. Dessas, somente 27 (23,1%) foram amplificadas com esses *primers*. Ao serem submetidas a uma nova reação de *nested* PCR para o VSRh, nenhuma dessas amostras resultou em amplificação.

4.6 Seqüenciamento da Região G2 do gene G

Todas as amostras amplificadas (133) foram submetidas à reação de seqüenciamento. Dessas, 86 (64,66%) tiveram a região G2 do VSRh seqüenciada, o que permitiu a genotipagem das mesmas. Do total das amostras seqüenciadas, 58 (67,44%) foram caracterizadas como sendo VSRhA e 28 (32,55%) VSRhB. A distribuição das amostras seqüenciadas, separadas em grupos A e B, nos anos de estudo está representada na tabela 04.

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondentes à região G2 do gene G do VSRh, grupos A e B, está representado, respectivamente, nos anexos quatro e cinco. No VSRhA foram identificados 15 conjuntos de seqüências idênticas e no VSRhB seis. Os alinhamentos do VSRhA e VSRhB foram compostos por 25 e 20 seqüências distintas, respectivamente.

Tabela 04 – Distribuição em grupos antigênicos dos vírus sincicial respiratório humano detectados no estudo e analisados por seqüenciamento de nucleotídeos.

Ano	Produtos gerados pelo <i>nested</i> PCR	Produtos Seqüenciados	Grupo A	Grupo B
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
2004	18 (36%)	12 (66,7%)	8 (66,7%)	4 (33,3%)
2005	30 (60%)	27 (90%)	22 (81,5%)	5 (18,5%)
2006	26 (52%)	17 (65,4%)	10 (58,9%)	7 (41,2%)
2007	29 (58%)	17 (58,6%)	10 (58,8%)	7 (41,2%)
2008	30 (60%)	13 (43,4%)	8 (61,5%)	5 (38,5%)
Total	133 (53,2%)	86 (64,67%)	58 (67,44%)	28 (32,55%)

4.7 Análises Filogenéticas

A análise pelo critério da MP das 25 seqüências representativas do grupo A gerou uma árvore consenso representada na figura 11. Os valores de *bootstrap* revelaram-se satisfatoriamente altos, refletindo a boa sustentação dos ramos em que se verifica uma separação das amostras em subgrupos específicos. O índice de consistência obtido foi de 0,780.

A árvore consenso obtida pelo critério da MP para as 20 seqüências representativas do grupo B está representada na figura 12. Os valores de *bootstrap* foram satisfatórios e o índice de consistência obtido foi de 0,830.



Figura 11 – Filograma representativo da topologia da árvore de consenso estrito, obtida pelo método da Máxima Parcimônia para as cepas de VSRhA circulantes em Fortaleza nos anos de 2004 a 2008. Os valores de *bootstrap* estão representados sobre os ramos. A seqüência protótipo CH18537 foi incluída. Índice de consistência = 0,780

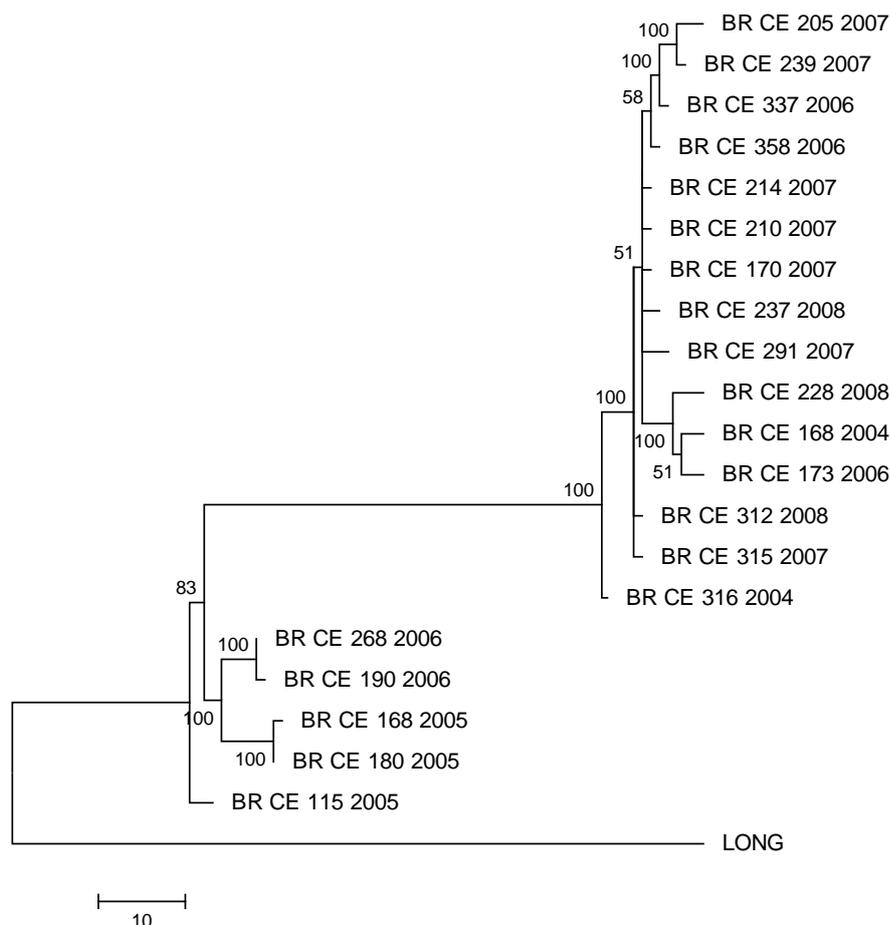


Figura 12 – Filograma representativo da topologia da árvore de consenso estrito, obtida pelo método da Máxima Parcimônia para as cepas de VSRhB circulantes em Fortaleza nos anos de 2004 a 2008. Os valores de *bootstrap* estão representados sobre os ramos. A seqüência protótipo Long foi incluída. Índice de consistência = 0,830.

A análise pelo critério da MV das seqüências representativas de A e de B utilizou como método de distância evolutiva o modelo Tamura Nei com distribuição gama (TrN+G) escolhido pelo ModelTest. A árvore consenso estrito obtida ao comparar essas seqüências com outras do *genebank* para o grupo A está representada na figura 13, demonstrando a divisão dos VSRh analisados nos subgrupos GA2 e GA5. A árvore obtida pela análise das seqüências do grupo B está representada na figura 14, com a divisão dos subgrupos GB3 e BA, caracterizado pela presença da duplicação de 60nt na posição 781-840. Os valores *bootstrap* foram satisfatórios e estão representados sobre os ramos. A seqüência protótipo Long foi incluída na análise do grupo A e a CH18537 na análise do grupo B.

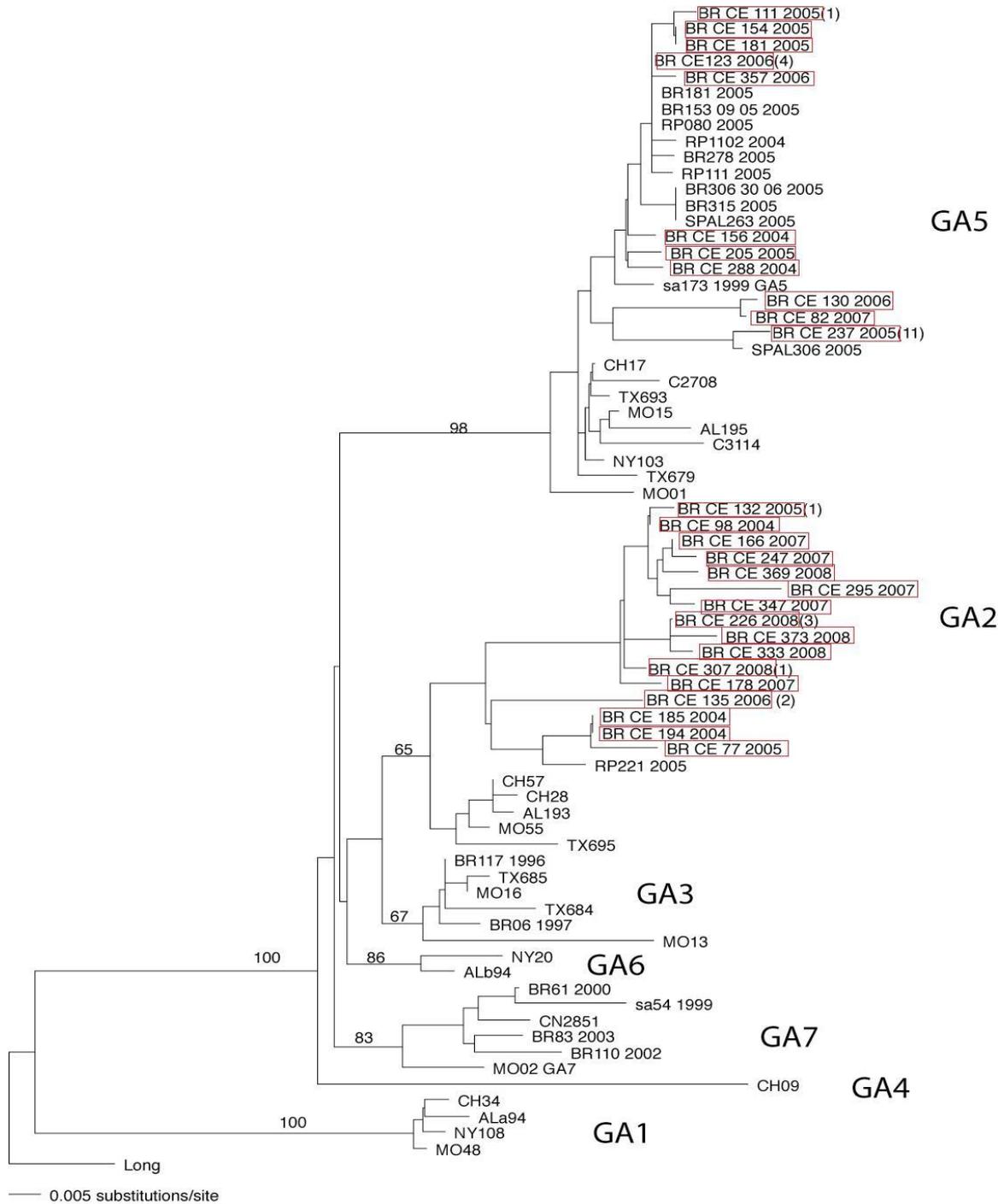
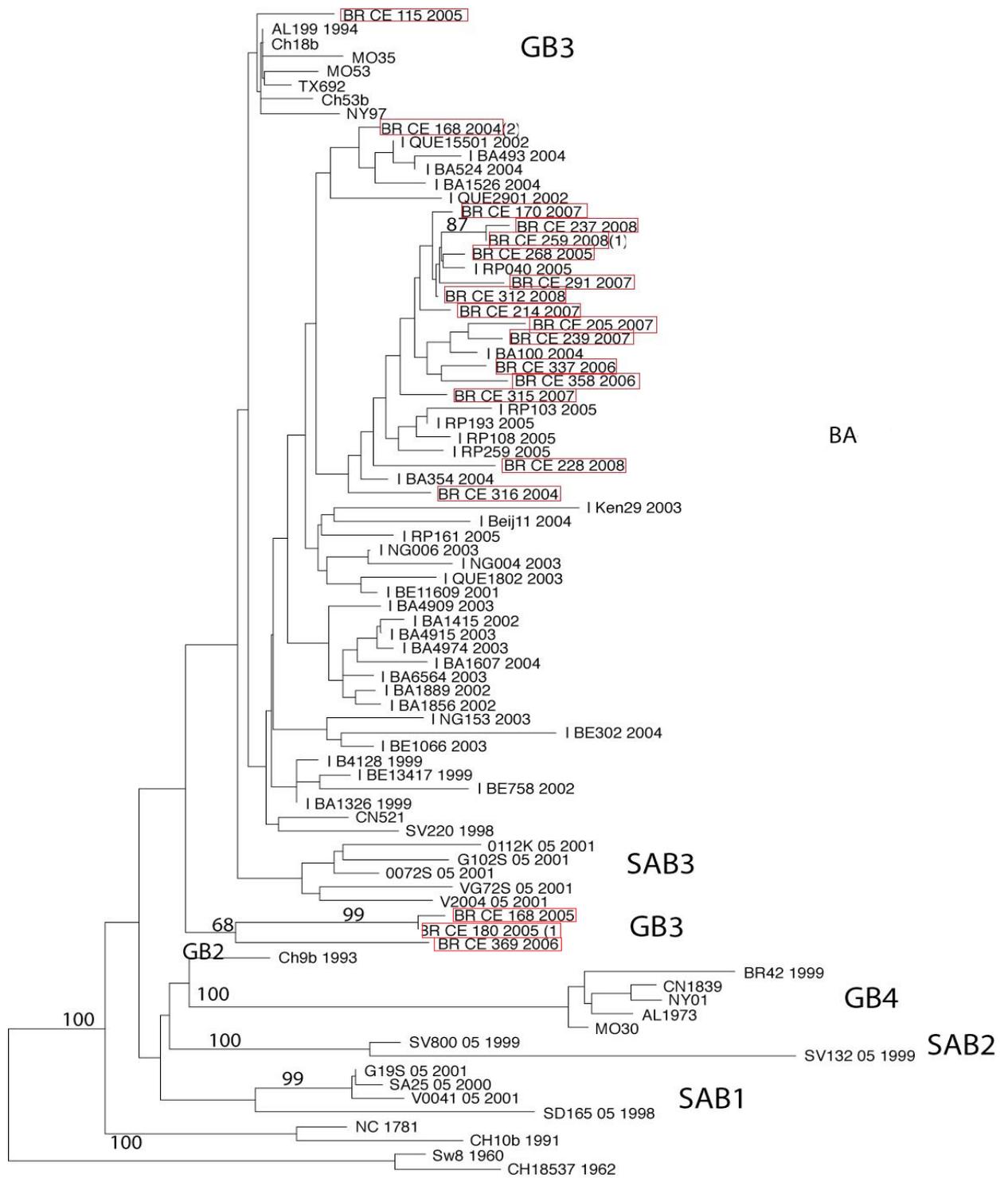


Figura 13 – Filograma representativo da topologia da árvore consenso estrito obtida pelo método da distância evolutiva, das cepas de VSRhA circulantes em Fortaleza nos anos de 2004 a 2008. Os números de acesso das seqüências utilizadas estão disponíveis no anexo III.



— 0.005 substitutions/site

Figura 14 – Filograma representativo da topologia da árvore consenso estrito obtida pelo método da distância evolutiva, para as cepas de VSRh do grupo B circulantes em Fortaleza nos anos de 2004 a 2008. Os números de acesso das seqüências utilizadas estão disponíveis no anexo III.

4.8 Caracterização da Circulação dos Subgrupos dos VSRh

Nos VSRh A, o subgrupo GA2 circulou durante todo o período analisado, enquanto o subgrupo GA5 circulou na maioria dos anos de estudo, exceto em 2008 quando sua circulação não foi detectada. Contudo, houve um predomínio do GA5 sobre o GA2 nos anos de 2004, 2005 e 2006. Somente no ano de 2007 o GA2 prevaleceu sobre o GA5.

Nos VSRhB, o subgrupo BA predominou em todos os anos de estudo, exceto no ano de 2005 quando não foi detectada a sua circulação. A circulação do subgrupo GB3 foi detectada nos anos de 2005 e 2006.

A distribuição dos subgrupos do VSRh em cada ano de estudo está representada na tabela 05.

Tabela 05 – Distribuição dos subgrupos dos vírus sincicial respiratório humano circulantes em Fortaleza durante o período de estudo.

Ano	GA2 N(%)	GA5 N(%)	GB3 N(%)	BA N(%)
2004	03 (37,5%)	05 (62,5%)	-	04 (100%)
2005	02 (10%)	20 (90%)	05 (100%)	-
2006	03 (30%)	07 (70%)	03 (42,8%)	04 (57,2%)
2007	06 (60%)	04 (40%)	-	07 (100%)
2008	08 (100%)	-	-	05 (100%)

4.9 Análise da Variabilidade de Nucleotídeos e Aminoácidos Inter e intra-grupos

Entre seqüências do grupo A, o percentual de similaridade, calculado par a par, variou entre 88,1% e 99,6%. Quando comparado com a cepa protótipo Long, esse percentual variou entre 87,8% e 88,1%. Nas seqüências do grupo B, esse percentual variou entre 91,5% e 99,6%. Quando comparado com a cepa protótipo CH18537, a variação observada foi de 87% a 89,3%. Foi verificado que os menores percentuais de similaridade ocorreram quando as seqüências das cepas de ambos os grupos foram comparadas com àquelas das cepas protótipos para cada grupo.

Nos VSRh pertencentes ao grupo A, não foi observada qualquer inserção ou deleção de nucleotídeos, porém, nos VSRh do grupo B, foi observada a duplicação de 60 nt na região C-terminal do gene da proteína G, em 15 das 20 seqüências distintas analisadas.

As seqüências de nucleotídeos caracterizadas como subgrupo GA2, quando comparadas entre si, mostraram uma similaridade que variou entre 93,7% e 99,6%. As seqüências do

subgrupo GA5 mostraram um percentual de identidade superior a 95,2%. Dentre as amostras do grupo B, as seqüências pertencentes ao subgrupo GB3 mostraram uma similaridade variando de 94,4% a 99,6%, enquanto a similaridade entre as seqüências do subgrupo BA foi superior a 96,4%.

Quando analisada a variabilidade de nucleotídeos entre os subgrupos circulantes foi observada uma similaridade de 90% entre as seqüências consensos dos subgrupos GA2 e GA5 e uma similaridade de 95,2% entre as seqüências consensos dos subgrupos BA e GB3.

O valor p-distância entre as seqüências de Fortaleza dentro de cada subgrupo foi comparado com seqüências de cepas circulantes em Salvador, São Paulo (capital), Campinas, Uruguai, Argentina, EUA, Índia e África do Sul, conforme apresentado na tabela 06. Esses valores mostram, que dentro do subgrupo GA2, os VSRh analisados nesse estudo apresentam mais semelhanças aos que circularam em outras cidades brasileiras em anos anteriores ou durante o período analisado.

Tabela 06 – Correlação genética entre seqüências dos vírus sincicial respiratório de cada subgrupo.

Subgrupo	Seqüências Comparadas	p-distância (variando entre)	Média
GA2	Salvador	0,01 – 0,08	0,04
	Campinas e São Paulo	0,01 - 0,05	0,02
	Argentina e Uruguai	0,01 – 0,07	0,04
	Outros países*	0,05 – 0,10	0,05
GA5	Salvador	0,01 – 0,05	0,02
	Campinas e São Paulo	0,01 - 0,05	0,02
	Argentina e Uruguai	0,01 – 0,07	0,03
	Outros países*	0,01 – 0,07	0,03
GB3	Salvador	0,02 – 0,07	0,05
	Campinas e São Paulo	0,01 – 0,06	0,03
	Argentina e Uruguai	0,02 – 0,07	0,05
	Outros países*	0,01 – 0,07	0,03
BA	Salvador	-	
	Campinas e São Paulo	0,01 – 0,04	0,02
	Argentina e Uruguai	0,02 – 0,06	0,03
	Outros países*	0,01 – 0,07	0,03

(*) EUA, Índia e África do Sul

A média $dN/dS > 1$ revela que muitas das mudanças de nucleotídeos observadas no gene G resultam em mudanças de aminoácidos. Em média, a taxa de mutações não sinônimas/sinônimas (dN/dS) para as seqüências do grupo A foi de 0,9899 e a taxa de mutações sinônimas/não sinônimas (dS/dN) foi de 1,5. Para o grupo B, a média dN/dS foi de 0,5.

O número de resíduos de aminoácidos baseados na região G2, nas seqüências dos VSRhA variou de 86 (subgrupo GA2) a 87 (subgrupo GA5). Foram detectadas três seqüências de GA2 que codificaram para 87 resíduos de aminoácidos.

Nos VSRhB, o número de resíduos de aminoácidos produzidos foi de 83 para o subgrupo GB3 e 100 para o subgrupo BA. Dentro do subgrupo BA foram detectadas três seqüências codificando 107 resíduos de aminoácidos. O alinhamento das seqüências de aminoácidos dos VSRh A e B estão representados nos anexos VI e VII, respectivamente.

A presença de quatro sítios de N-glicosilação (aminoácido ...N-X-S/T..) foi verificada entre as amostras do grupo A, sendo o terceiro e quarto sítio conservados em todas as seqüências. O segundo sítio foi subgrupo específico, estando presente apenas no subgrupo GA5, e o primeiro sítio esteve presente nas seqüências GA5 e em duas seqüências GA2.

No grupo B, foram observados dois sítios de N-glicosilação que foram conservados em todas as seqüências dos subgrupos BA e GB3.

Nas seqüências do VSRhA foram detectadas três repetições do tipo ...TTKX.....KPX..., não conservadas, entre as seqüências analisadas. Nos VSRhB, não foram encontradas repetições dessas seqüências.

5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados nesse estudo representam a continuidade de uma série de pesquisas sobre viroses respiratórias em Fortaleza realizadas desde 2001, de onde já se têm informações publicadas sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e clínicos das infecções infantis pelo VSRh (NUNES, 2004; NUNES; MOURA 2006; MOURA et al., 2006). Assim, nesta seção serão discutidos com maior profundidade a taxa de detecção do VSRh como agente de IRA na população de estudo, a caracterização do padrão de atividade do VSRh e a diversidade antigênica e genômica do VSRh em Fortaleza durante os cinco anos estudados.

Em relação aos estudos brasileiros publicados sobre VSRh, esse estudo pode ser considerado um estudo de longa duração (NASCIMENTO et al., 1991; MOURA et al., 2003; BOSSO et al., 2004; COSTA et al., 2006; MOURA et al., 2006; PECCHINI et al., 2008). Uma série maior de anos foi apresentada apenas em um estudo realizado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, onde a atividade do VSRh foi observada por sete anos, sendo seis consecutivos (STRALIOTTO et al., 2001). No outro extremo, podem ser citados dois estudos realizados com crianças de Aracaju onde a atividade do VSRh foi observada somente durante o período associado a maior ocorrência de IRA e mais especificamente de bronquiolites (CUEVAS et al., 2003; SERAFINO et al., 2004).

A taxa de detecção do VSRh encontrada nesse estudo situa-se entre os extremos de 0 e 85,6%, citados em diversos estudos (ARRUDA et al., 1991; TSAI et al., 2001; CHECON et al., 2002 ; AVEDAÑO et al., 2003 ; MOURA et al., 2003 ; BOSSO et al., 2004 ; NOYOLA et al., 2004 ; RODRIGUES et al., 2004 ; STRALIOTTO et al., 2004 ; VIEGAS et al., 2004 ; CALEGARI et al., 2005 ; D'ELIA et al., 2005 ; LOURENÇÃO et al., 2005 ; MOURA et al., 2006 ; THOMAZELLI et al., 2007 ; BORON et al., 2008 ; BANERJI et al., 2009 ; BERGER et al., 2009 ; DICARLO et al., 2009). O VSRh foi o vírus mais detectado entre os pesquisados por imunofluorescência. Devido à existência de um banco de dados extenso sobre IRA virais no nosso laboratório e pela carência de publicações sobre a sazonalidade de influenza em Fortaleza utilizamos as informações necessárias para redação de um artigo sobre o tema que já foi publicado (Artigo Publicado).

Inúmeros fatores podem influenciar na detecção de VSRh. Entre eles podem ser citados: a idade da população de estudo, a(s) síndrome(s) clínica(s) analisada(s), o local de atendimento dos pacientes, a duração do estudo, além do material clínico e metodologia(s) utilizada(s) para detecção viral.

Ao analisar os vários fatores citados como responsáveis por taxas tão variáveis, podemos comentar alguns aspectos característicos do nosso estudo e como eles podem ter influenciado na taxa de detecção de VSRh encontrada.

O primeiro deles é a idade da população geral do estudo que variou de zero a 16 anos, o que representa a faixa etária dos pacientes atendidos no HIAS. As maiores taxas de detecção do VSRh são encontradas em estudos com crianças até dois anos de idade (CINTRA et al., 2001; AVEDAÑO et al., 2003; MOURA et al., 2006; BOSSO et al., 2004; LEE et al., 2007; DICARLO et al., 2009), embora também cause infecções em crianças pré-escolares (SOUZA et al., 2003; LOURENÇÃO, 2006). Crianças de até dois de idade representaram 83,7% da população deste estudo. A faixa etária ampla da população de estudo, isto é, de zero a 16 anos, que representa a população atendida no HIAS, não parece ter influenciado na taxa de detecção do VSRh, uma vez que apenas 2,2% dessa população tinha mais de cinco anos. (VIEIRA et al., 2001; NOYOLA et al., 2004; MOURA et al., 2006). É oportuno ressaltar que o VSRh vem sendo citado também como importante agente de IRA em adultos (FALSEY; WALSH, 2005; RAMIREZ, 2008).

Um segundo fator a ser analisado é o setor de atendimento dos pacientes. As maiores taxas de detecção de IRA por VSRh são relatadas em estudos cuja população analisada é composta de crianças hospitalizadas (CHAN et al., 2002; CALEGARI et al., 2005; RICETTO et al., 2006; PECCHINI et al., 2008; BERGER et al., 2009). Pela revisão bibliográfica realizada nesse estudo vimos que a maior taxa de detecção do VSRh, 85,4%, foi citada em um estudo realizado no México com crianças hospitalizadas por IRA (NOYOLA et al., 2004). Apenas 11% da população do presente estudo eram de pacientes internados. Isso reflete a população de pacientes internados no HIAS que é um hospital de nível terciário e de ensino. Dessa forma a maioria dos pacientes atendidos no setor de emergência por IRA recebe tratamento em casa, um número menor de pacientes, aqueles com IRA mais grave é encaminhado para internação em hospitais de nível secundário ou terciário dependendo da existência de leitos, e uma fração muito pequena é internada no próprio HIAS. Embora a maioria da população geral e dos pacientes VSRh(+) do presente estudo tenha sido atendida na emergência do HIAS, proporcionalmente, a taxa de detecção de VSRh em paciente internados (~22,8%) foi maior do que a observada em pacientes atendidos na emergência(~15%), o que confirma as maiores taxas de detecção de VSRh em pacientes hospitalizados (SHAY et al., 2001; CHAN et al., 2002; STRALIOTTO et al., 2004; BERGER et al.; 2009).

Os serviços de emergência de hospitais infantis são considerados bons locais para vigilância ativa de casos de IRA por VSRh. A taxa de detecção apresentada nesse estudo é

superior àquelas relatadas em estudos brasileiros realizados com crianças atendidas a nível ambulatorial ou em creches. Um estudo realizado em Fortaleza na década de 80 mostrou que nenhum VSRh foi detectado em 175 crianças com IRA, menores de cinco anos de idade, visitadas em seus domicílios, mesmo que 35% dos casos de IRA tenham sido confirmados laboratorialmente como de etiologia viral (ARRUDA et al.1991). Em dois estudos brasileiros sobre IRA virais em crianças que freqüentavam creches, o VSRh foi detectado em 4% e 10,5% dos casos (SOUZA et al., 2003; LOURENÇÃO, 2006).

A taxa de detecção viral também é dependente do tipo de material clínico analisado e do(s) método(s) utilizado(s) para pesquisa de vírus. Neste estudo, o ANF foi utilizado como espécime clínico e a técnica de triagem empregada para detecção do antígeno viral foi a IFI por se tratar de uma técnica de diagnóstico rápido e de baixo custo. Essa técnica exige uma amostra rica em células íntegras e, diferente do isolamento viral em cultura de células, não depende da capacidade infectante do vírus presente na amostra. Além disso, os nove anos da utilização dessa técnica no nosso laboratório garantem a experiência necessária para a execução e interpretação dos resultados da mesma. A IFI apresenta sensibilidade e especificidade que variam de 80% a 95% para detecção de VSRh em amostras respiratórias (COLLINS et al., 2007). O *National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System* (NREVSS) dos EUA, utiliza esse método para detecção de VSRh nas amostras analisadas (CDC, 2008). O emprego de métodos de detecção de antígenos é muito útil para análise de um grande número de amostras, como é realizada pelo NREVSS, que apenas no período de julho de 2007 a Dezembro de 2008, pesquisou o VSRh por esse método em 369.944 amostras clínicas, com uma taxa de detecção de 15.9% (CDC, 2008).

Apesar da RT-PCR apresentar sensibilidade superior à IFI e ao isolamento do VSRh em cultura de células, os altos custos desse método foram determinantes para que optássemos pela não utilização dessa técnica na triagem de amostras positivas para VSRh e os outros seis vírus entre as coletadas (VAN ELDEN et al., 2002; ROVIDA et al., 2005; REIS et al., 2008). Sua utilização em nosso estudo ficou restrita às análises de variabilidade antigênica e genômica. Contudo nota-se o emprego crescente da RT-PCR como único método de identificação de VSRh e outros vírus respiratórios em amostras clínicas, a ponto de técnicas clássicas de detecção viral, como o isolamento viral em cultura de células, ter sua utilização limitada (LELAND; GINOCCHIO, 2007).

Neste estudo foram incluídos pacientes que apresentavam infecção de vias aéreas altas ou baixas, porém as maiores taxas de detecção do VSRh foram observadas em pacientes com IRA baixa, o que ressalta ainda mais a importância do VSRh na etiologia de IRA infantis. Se

nesse estudo tivéssemos colocado como critério de inclusão apenas o diagnóstico de IRA baixa certamente teríamos obtido uma taxa maior de detecção de VSRh, já que as maiores taxas de detecção desse vírus são relatadas em estudos que utilizam esse critério de seleção (SHAY et al., 2001; CHAN et al., 2002; STRALIOTTO et al., 2004; D'ELIA et al., 2005; SUDBRACK et al., 2007). Contudo, o percentual de detecção de VSRh em casos de IRA altas encontrado neste estudo não pode ser subestimado. Estudos que analisam a participação de diversos vírus na etiologia de síndrome gripal, destacam o papel do VSRh na etiologia dessas infecções (ZAMBON et al., 2001; FLEMING et al., 2007; GASPARINI et al., 2007; AJAYI-OBE et al., 2008). Destacando a participação do VSRh em casos de IRA altas, podemos citar os resultados do sistema de vigilância de influenza brasileiro que utiliza também a IFI para a detecção de VSRh, influenza A e B e parainfluenza 1, 2 e 3. Em 2887 casos de síndrome gripal analisados no período de 2000 a 2003, o VSRh foi detectado em 26,7% dos casos (BRASIL, 2004).

Quanto à caracterização dos períodos epidêmicos de VSRh em Fortaleza, este estudo, apresenta dados que confirmam o que já havia sido descrito em um estudo que analisou a atividade de VSRh de janeiro de 2001 a julho de 2004 (MOURA et al., 2006). A regularidade da ocorrência anual dos períodos epidêmicos e a associação desses às estações chuvosas são observações semelhantes nos dois estudos. Em Fortaleza, a principal variável climática é a ocorrência de chuvas, que ocorre sempre no primeiro semestre do ano, geralmente de março a junho, período denominado de “quadra invernososa”. Relação semelhante entre a ocorrência de chuvas e os períodos epidêmicos de VSRh tem sido relatada em estudos realizados na Índia, Nova Guiné, Colômbia, Quênia e Gâmbia. (SHEK; LEE, 2003; SANDE et al., 2004). Outros estudos realizados na região nordeste do Brasil também mostram a mesma associação entre ocorrência de chuvas e períodos epidêmicos de VSRh (CUEVAS et al., 2003; MOURA et al., 2003; SERAFINO et al., 2004). Um estudo realizado em Maceió, durante novembro de 2000 a abril de 2002, apresenta resultados bem diferentes dos já descritos em Salvador e Fortaleza. Em Maceió, a circulação do VSRh foi detectada durante os meses de junho a dezembro, com pico de atividade viral durante os meses de julho e outubro, diminuindo a intensidade nos meses de novembro e dezembro (OLIVEIRA et al., 2004). Na região norte do Brasil, por se tratar de uma região com clima tipicamente equatorial com chuvas distribuídas ao longo do ano, torna difícil avaliar a relação entre chuvas e a atividade do VSRh. No entanto, um estudo realizado em Belém mostrou que essa atividade é observada predominantemente nos

primeiros seis meses do ano e mais especificamente no período de troca da estação chuvosa para um período de menor pluviosidade (BARBAGELATA et al., 2007).

Além da chuva alguns outros fatores climáticos como temperatura, umidade relativa do ar, radiação ultravioleta (UVB) mostram relação com a ocorrência dos períodos epidêmicos de VSRh em alguns locais (YUSUF et al., 2007; NOYOLA; MANDEVILLE, 2008, OMER et al., 2008, WELLIVER, 2009).

Em países de clima temperado, tanto no hemisfério norte como no sul, a circulação do VSRh tem sido associada ao período de temperaturas mais baixas, que ocorrem durante os meses de inverno, não sendo detectado nos meses de verão, como observado na Europa Ocidental e na América do Norte (MULLINS et al., 2003; STENSBALLE et al., 2003; YUSUF et al., 2007; OMER et al., 2008). Em Taiwan, durante cinco anos de análise (2001-2005), a circulação do VSRh indicou um padrão bienal com dois picos de atividade viral, um no outono e outro na primavera, associado a temperaturas baixas (LEE et al., 2007). A maior atividade do VSRh na Malásia foi associada aos meses de novembro, dezembro e janeiro, correspondendo ao período chuvoso e de baixas temperaturas (CHAN et al., 2002).

No que se refere ao Brasil, em São Paulo e no Rio de Janeiro, na região sudeste e em Curitiba e Porto Alegre, na região sul, os períodos epidêmicos de VSRh têm sido associados também aos meses de temperaturas mais baixas (NASCIMENTO et al., 1991; STRALIOTTO et al., 2001; BOSSO et al., 2004; STRALIOTTO et al., 2004; D'ELIA et al., 2005; TSUCHIYA et al., 2005; RICCETTO et al., 2006).

A radiação solar do tipo UVB é um fator ambiental cuja taxa de detecção varia de acordo com as estações do ano. Tem sido sugerida uma associação entre as taxas de UVB e a absorção da vitamina D. Nos meses de inverno, os baixos níveis de vitamina D em crianças estão associados com as baixas taxas de UVB, aumentando a suscetibilidade a infecções respiratórias. Essa associação pode ser explicada pelo efeito modulador da vitamina D no sistema imunológico, regulando a expressão de peptídeos antimicrobianos. A vitamina D é um fator de proteção contra infecção respiratória, pois ela participa da imunidade inata do trato respiratório inativando os vírus e outros patógenos respiratórios (CANNELL et al., 2006). Pelo fato do VSRh ser um vírus bastante lábil, sua infectividade pode ser diminuída em ambientes que recebem uma alta taxa de radiação solar do tipo UVB. A associação da circulação do VSRh com baixa taxa de radiação UVB foi relatada na Argentina, México e

EUA (VIEGAS et al., 2004; YUSUF et al., 2007; NOYOLA; MANDEVILLE, 2008; WELLIVER et al., 2009).

No presente estudo utilizamos a definição do *Centers of Diseases Control* dos EUA para descrever a atividade do VSRh (CDC, 2008). Na maioria dos estudos publicados o que se observa é análise da distribuição mensal dos casos de IRA por VSRh em vez da semanal apresentada nesse estudo (CHAN et al., 2002; AVEDAÑO et al., 2003; ARBIZA et al., 2005; MOURA et al., 2006). A distribuição semanal de casos de VSRh mostra mais detalhes da atividade desse vírus. Ao considerar atividade significativa do VSRh somente aquela na qual a taxa de detecção do vírus é $\geq 10\%$ do total de amostras coletadas pode-se observar com precisão a variação na atividade do vírus e ao mesmo tempo verificar a regularidade da coleta de amostras no sistema de vigilância. Em relação a estudos que verificam a distribuição mensal de casos de VSRh o sistema de distribuição semanal mostra com maior precisão o início, o fim e conseqüentemente, a duração do período epidêmico.

Desse modo, a análise desses cinco períodos epidêmicos mostrou a variabilidade do número de casos VSRh (+), do início, do término e da duração de cada período epidêmico. Como visto nesse estudo, o número de infecções por VSRh em cada ano variou entre o mínimo de 79 em 2006 e o máximo de 102 em 2004, resultando em taxas de detecção que variaram entre 12% e 24,8%. Pelo NREVSS a variabilidade no número de casos VSRh e nas taxas de detecção de VSRh entre o total de amostras coletadas também ocorreu, no entanto a variação não foi tão grande como a encontrada nesse estudo. Entre as estações de VSRh de 2004-2005 até a de 2007-2008 as taxas de detecção do VSRh no NREVSS variaram entre 12% e 17% (CDC, 2004; CDC, 2005; CDC, 2006; CDC, 2007; CDC, 2008). Nesse estudo, as taxas de detecção de VSRh foram maiores nos anos de 2004 e 2005 onde o número de amostras coletadas foi menor. A explicação para o fato é a significativa queda no número de amostras coletadas no segundo semestre daqueles anos, pela redução da equipe de coleta devido à conclusão do período de bolsa de iniciação científica e de curso de mestrado. Nos anos de 2006 a 2008, com a solução desse problema, a coleta de amostra se tornou mais regular, o número de coleta aumentou significativamente, e as taxas de detecção do VSRh variaram menos (14.2% em 2007 e 12% em 2006), refletindo melhor a atividade do VSRh.

A atividade significativa do VSRh fora do período epidêmico foi observada apenas nos anos de 2005 e 2007, antes do período epidêmico. Os últimos casos de cada período epidêmico foram observados sempre no mês de julho, no início (2006), meio (2004, 2005 e 2007) ou fim (2008). Isso contrasta com o estudo prévio de VSRh em Fortaleza, onde casos

de VSRh foram observados no mês de agosto de 2001 e 2003 (MOURA et al., 2006). Em algumas cidades brasileiras a atividade do VSRh ocorre antes e depois do período epidêmico. No Espírito Santo, a circulação do VSRh foi analisada durante um ano e embora o pico tenha ocorrido do final do verão (fevereiro) e no outono (março a maio) o vírus também circulou na maioria dos outros meses, exceto em agosto e dezembro (CHECON et al., 2002). Em Uberlândia, Minas Gerais, a atividade do VSRh inicia-se em meados do verão e estende-se até fim do outono, com pico de incidência nos meses de março, abril e maio (CALEGARI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008). Em Porto Alegre a circulação do VSRh ocorre nos meses de maio a setembro com o pico nos meses de inverno (julho e agosto). No verão (janeiro a abril) a atividade do VSRh também é detectada (STRALIOTTO et al., 2001, STRALIOTTO et al., 2004).

Uma descrição mais detalhada dos períodos epidêmicos de VSRh é apresentada em um artigo já submetido para publicação (Artigo Submetido).

Estudos sobre a caracterização antigênica e genômica dos VSRh circulantes em uma determinada região fornecem informações importantes para o entendimento da epidemiologia e patogênese do VSRh, uma vez que essas variabilidades têm sido sugeridas como fatores implicados na gravidade das infecções, na ocorrência de re-infecções e no padrão de circulação anual do VSRh (SULLENDER, 2000).

Devemos ressaltar que nem todos os VSRh detectados nesse estudo foram submetidos à caracterização antigênica e genômica. No que se refere à caracterização antigênica isso ocorreu devido à inexistência das lâminas de algumas amostras, pela escassez de células em outras e pelo fato de que para algumas amostras consideradas VSRh(+) não houve reação a nenhum dos AcM utilizados na caracterização antigênica.

A co-circulação dos dois grupos antigênicos com predomínio do VSRhA observada em todos os períodos epidêmicos analisados nesse estudo é o padrão predominante que ocorre mundialmente (LUKIC-GRILIC et al., 1998; PERET et al., 1998; VENTER et al., 2001; ARBIZA et al., 2005; MOURA et al., 2003; KUROIWA et al., 2005). Nesse aspecto os resultados desse estudo diferem do que foi relatado em um estudo prévio realizado em Fortaleza, onde foi demonstrada que em um mesmo período epidêmico houve co-circulação dos dois grupos antigênicos, sem que houvesse predomínio significativo de um sobre o outro (NUNES, 2004).

A alternância do predomínio entre os grupos tem sido relatada. Períodos de dois a quatro anos com predomínio do VSRhA podem ser seguidos por um período com predominância de VSRhB. No Uruguai, ao se analisar 17 períodos epidêmicos consecutivos do VSRh (1985-2001) evidenciou-se a co-circulação dos grupos com o predomínio de VSRhA na maiorias dos anos. No entanto, a ocorrência exclusiva de VSRhA foi observada em 1993, 1998 e 2000, e de VSRhB em 1999 (ARBIZA et al., 2005). A predominância do VSRhA pode ser atribuída a uma maior variabilidade entre os VSRh isolados pertencentes a esse grupo em relação ao B (PERET et al., 1998, VENTER et al., 2001). Estudos realizados na Argentina, Bélgica, Quênia e Suécia também evidenciaram períodos com a circulação exclusiva de um dos grupos ou a predominância de VSRhB durante um ou mais períodos analisados, mesmo quando se analisou períodos menores (GALIANO et al., 2005, ZLATEVA et al., 2007, SCOTT et al., 2004, ÖSTLUND et al., 2008).

Estudos realizados nas cidades de São Paulo, Ribeirão Preto, Rio de Janeiro, Uberlândia e Salvador mostram a co-circulação dos grupos antigênicos de VSRh, com predomínio de A sobre B na maioria dos períodos epidêmicos analisados (SIQUEIRA et al., 1991; CINTRA et al., 2001; MOURA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto em Uberlândia, houve anos com a circulação exclusiva de VSRhA e anos com predominância de VSRhB (OLIVEIRA et al., 2008). Em Porto Alegre, durante os anos de 1990 a 1998, observou-se a co-circulação dos grupos de uma forma “equilibrada” na maioria dos anos e somente em um deles houve o predomínio de VSRhA (STRALIOTTO et al., 2001).

No presente estudo, não foi analisada a relação entre gravidade da IRA com o tipo antigênico de VSRh analisado, o que tem sido sugerido em alguns estudos, mas que permanece um tema bastante controverso. Um estudo realizado em Ribeirão Preto relatou uma maior tendência de VSRhB causar infecções mais graves, acometendo as vias aéreas inferiores principalmente em pacientes com fator de risco (CINTRA et al., 2001). Em Uberlândia, Minas Gerais, análise semelhante mostrou o contrário, com associação de IRA de menor gravidade com VSRh do grupo B (OLIVEIRA et al., 2008). A maior gravidade da infecção por VSRhA foi relatada em um estudos argentinos (IMAZ et al., 2000, CARBALLAL et al., 2000).

As infecções pelo VSRh podem ocorrer na presença de imunidade pré-existente, como ocorre em lactentes na presença de anticorpos maternos e nas re-infecções que são comuns no decorrer da vida (VIEIRA et al., 2007). As re-infecções podem ocorrer após exposição repetida ao mesmo vírus, de forma que a variação antigênica não é

estritamente necessária para que elas ocorram (HALL et al., 1991). Entretanto algumas pesquisas sugerem que a variação antigênica pode desempenhar papel importante na capacidade do VSRh de escapar da resposta imune, estabelecendo infecções. Em relação à ocorrência das reinfecções pelo vírus, já foram identificados sítios sob pressão seletiva positiva na porção C-terminal da proteína G, do VSRh dos grupos A e B, sugerindo pressão imune sobre esses códons. As alterações desses sítios podem causar o escape da imunidade preexistente e, conseqüentemente, algumas pessoas serão re-infectadas por VSRh do mesmo grupo ou não (ZLATEVA et al., 2004; ZLATEVA et al., 2007; BOTOSSO et al., 2009).

Os estudos sobre variabilidade antigênica do VSRh foram complementados por estudos sobre a sua variabilidade genômica. Durante cada período epidêmico do VSRh verifica-se a co-circulação de vários subgrupos, com a predominância de um ou dois, que podem tanto persistir no decorrer dos anos, como ter a circulação diminuída até não ser mais detectado. Essa dinâmica da circulação dos subgrupos dos VSRh pode ser influenciada pela seleção natural, devido a imunidade adquirida pela população (SULLENDER, 2000; ZLATEVA et al., 2005; BOTOSSO et al., 2009).

Para realização da análise da diversidade genômica dos VSRh circulantes em Fortaleza de 2004 a 2008, optou-se por amplificar e seqüenciar a região G2 do gene G por se tratar de uma região variável desse gene. Já foi demonstrado que em termos de análise filogenética a análise apenas da região G2 apresenta resultados semelhantes aos da análise do gene G completo (PERET et al., 1998; CAMPOS et al., 2007).

Vários cuidados foram tomados para a validação desse trabalho bem como para descartar a hipótese de contaminação das amostras analisadas. A reação de *nested* PCR aumenta o limite de detecção viral e a chance de contaminação durante os procedimentos para sua realização (BELÁK; THOREN, 2001; HAKHVERDYAN et al., 2004). A contaminação intralaboratorial foi descartada pelo fato de haver uma barreira física entre as salas do pré e pós-amplificado, ou seja, as salas eram separadas e distantes. Alguns cuidados foram adotados durante os procedimentos, como o uso de aventais e propés descartáveis próprios em cada sala. A reação de *nested* PCR era realizada na sala do pós amplificado dentro da capela de fluxo laminar. A contaminação das amostras pelas cepas protótipos utilizadas como controle positivo, também foi descartada porque os VSRh seqüenciados diferiram dessas cepas.

O total das amostras seqüenciadas nesse estudo correspondeu a 64,7% (86/133) dos VSRh amplificados pela técnica de *nested* PCR. A literatura revista mostra uma taxa de seqüenciamento variando entre 21,2% e 77% dos VSRh amplificados (CAMPOS et al., 2007, MOURA et al., 2004, KUROIWA et al., 2005, ZLATEVA et al., 2007 BOTOSSO, 2002, ANTONIASSI et al., 2008, PARVEEN et al., 2006).

Os critérios utilizados para a análise filogenética foram os critérios de MP e MV que são aplicados para estudo sobre epidemiologia molecular dos vírus (HUNGENES et al., 2000). O método da MP procura por uma topologia de árvore filogenética que acomode o menor número de mudanças de nucleotídeos ou aminoácidos que ocupam uma determinada posição na seqüência, para explicar a história evolutiva das unidades taxonômicas comparadas (MIYAKI et al., 2001). Já o método da MV requer um modelo probabilístico para o processo evolutivo de substituição de nucleotídeos. Fundamenta-se no princípio de que o processo de substituição de cada nucleotídeo ocorre com uma razão esperada, que pode ser estimada de acordo com o modelo evolutivo adotado (YANG, 1997). Ressalta-se aqui o modelo evolutivo que apresentou melhor valor de verossimilhança entre os isolados do VSRhA e B, neste estudo, foi o modelo Tamura Nei com distribuição gama (TAMURA; NEI, 1993).

A topologia das árvores obtidas pelos dois métodos indicou claramente a distinção em dois subgrupos diferentes entre as seqüências de VSRhA e VSRhB. As amostras foram agrupadas sem uma ordem cronológica específica, ou seja, amostras pertencentes a anos diferentes foram agrupadas em um mesmo subgrupo ou em subgrupos diferentes. Esses subgrupos co-circularam aleatoriamente durante todo o período de estudo. Em cada ano houve a predominância de um ou dois subgrupos, como o GA5 e BA em 2004 e 2006 e o GA2 em 2007 e 2008. O subgrupo GA2 circulou durante todos os anos analisados, sendo detectado em baixos níveis durante os três primeiros anos, passando a ser o subgrupo predominante, dentro do VSRh A, durante os anos subseqüentes. O subgrupo GB3 foi detectado em baixos níveis durante os anos de 2005 e 2006. O GA5 foi predominante nos anos de 2004, 2005 e 2006, com declínio a partir de 2007 a ponto de não ser detectado em 2008. Essa alternância de subgrupos no decorrer dos anos pode proporcionar uma evasão da resposta imune previamente existente e, conseqüentemente, facilitar a transmissão viral e re-infecções (BOTOSSO et al., 2009).

Os resultados da circulação de subgrupos de VSRhA e VSRhB observados neste trabalho estão de acordo com os relatos da literatura apresentados em diversos países nos últimos anos. Estudos realizados na Argentina, Uruguai, Quênia, Índia, China, Japão, Suécia, Estados Unidos e Bélgica descrevem que os subgrupos GA2 e GA5, os únicos circulantes em Fortaleza, são os predominantes dentro do VSRhA (PERET et al., 1998,2000; SCOTT et al., 2004; ARBIZA et al., 2005; GALIANO et al., 2005; VIEGAS; MISTCHENKO, 2005; KUROIWA et al., 2005; PARVEEN et al., 2006; ZHANG et al., 2007; ZLATEVA et al., 2007; RAFIEFARD et al., 2008)

Na África do Sul foi bem demonstrado o processo de predominância de um subgrupo num determinado período que foi seguido pela crescente detecção de outro subgrupo até sua completa predominância. No ano de sua detecção inicial na África do Sul, o SAA1 já era predominante, contudo o GA2 que já circulara em 2008, tornou-se dominante em 1999 e 2000 (VENTER et al., 2001). O mesmo foi observado em Fortaleza, com o GA2 que gradualmente substituiu o subgrupo GA5, subgrupo predominante de 2004 a 2006. Nos anos de 2007 e 2008, o percentual de detecção do GA2 passou de 60% para 100%.

No Brasil, antes dessa dissertação, foram publicados dados de quatro estudos sobre a epidemiologia molecular do VSRh. O primeiro deles analisou cepas de VSRh circulantes em um único período epidêmico (1999) na cidade de Salvador (MOURA et al., 2004). Os outros são procedentes de São Paulo (capital) e Campinas (BOTOSSO, 2002; CAMPOS et al., 2007; ANTONIASSI et al., 2008).

Apesar do grande número de seqüências analisadas de VSRh de Fortaleza foram identificados apenas dois subgrupos de VSRhA e dois subgrupos de VSRhB. Em Salvador, por sua vez, apesar dessa análise ter sido realizada em apenas 13 isolados de VSRhA e quatro de VSRhB, foi verificada uma maior diversidade de subgrupos de VSRhA (GA2, GA5 e GA7) e um número igual de subgrupos de VSRhB (GB3 e SAB3). O estudo de Salvador mostrou pela primeira vez na América do Sul a circulação dos subgrupos GA7 e SAB3, não identificados entre os subgrupos circulantes em Fortaleza. O subgrupo SAB3 foi inicialmente detectado na África do Sul entre os anos de 1997 e 2001 juntamente com os subgrupos SAA1 (VSRhA) e SAB1 e SAB2 (VSRh B) (VENTER et al., 2001). Estudo publicado posteriormente ao de Salvador mostrou que o subgrupo SAB3 também circulou no Uruguai durante os anos de 1985 e 2001 (ARBIZA et al., 2005). No Brasil a circulação dos subgrupos SAB1 e SAB3 foi observada em São Paulo no ano de 2004 (CAMPOS et al., 2007).

Contrastando, com a pequena diversidade de subgrupos de VSRhA observada em Fortaleza, os resultados de um estudo de São Paulo mostram uma maior diversidade nesse grupo. A análise de 70 seqüências de VSRh circulantes em São Paulo de 1995 a 1998 identificou a circulação de cinco subgrupos de VSRhA (GA1, GA2, GA3, GA5 e GA7). Em relação aos subgrupos de VSRhB em São Paulo, apenas o GB3 circulou nesse mesmo período (BOTOSSO, 2002).

Alguns subgrupos de VSRhA e VSRhB têm sido detectados continuamente nos estudos brasileiros. Nessa situação encontram-se GA2, GA5 e GA7 para os VSRhA e o GB3, SAB3 e o BA (BOTOSSO, 2002; MOURA et al., 2004; CAMPOS et al., 2007; ANTONIASSI et al., 2009). Outros por sua vez, foram detectados em algum ano em um determinado local e sua circulação não foi relatada posteriormente. É o caso do GA1 e do SAB1, que circularam apenas em São Paulo em 1996 e 2004, respectivamente (BOTOSSO, 2002; CAMPOS et al., 2007).

O subgrupo BA, também denominado BA *like* e B com inserção, é caracterizado por possuir uma duplicação de 60nt na posição de 781-840 na porção C-terminal do gene G. Ele foi inicialmente identificado em VSRh circulantes em Buenos Aires, Argentina, durante o ano de 1999 (TRENTO et al., 2003). A observação da circulação desse subgrupo já é descrita em países como Uruguai, Japão, Quênia, Índia, Bélgica e Brasil (NAGAI et al., 2004; SCOTT et al., 2004; BLANC et al., 2005; KUROIWA et al., 2005; SATO et al., 2005; ZLATEVA et al., 2005; PARVEEN et al., 2006; ANTONIASSI et al., 2008). A rápida disseminação desse subgrupo a nível mundial sugere uma vantagem seletiva em relação aos outros subgrupos de VSRhB circulantes, que pode estar relacionada à capacidade de evasão desse subgrupo aos mecanismos de defesa do sistema imune. Sugere-se que os VSRh do subgrupo BA tenham sido originados de um ancestral comum a partir de um ou múltiplos eventos de duplicação que resultaram na inserção desses 60 nucleotídeos (TRENTO et al., 2006).

Um achado interessante nesse estudo foi a quantidade de VSRhB pertencentes ao subgrupo BA. No Brasil, a circulação do subgrupo BA foi relatada a partir de 2004 em São Paulo e Campinas, mas em nenhum desses dois estudos foi observada a predominância desse subgrupo como observado em Fortaleza (CAMPOS et al., 2007; ANTONIASSI et al., 2008). Além da predominância do subgrupo BA sobre o GB3 nos anos de 2004, 2007 e 2008, observou-se a detecção exclusiva do subgrupo BA em 2006. Esse subgrupo não foi detectado apenas entre os VSRh circulantes e analisados de 2005.

A predominância do subgrupo BA descrita neste estudo, também foi observada em outros relatos de estudos da Bélgica, Argentina, Índia (PARVEEN et al., 2006; TRENTO et al., 2006; ZLATEVA et al., 2007). Na Bélgica, a análise genômica de VSRh circulantes em dez períodos epidêmicos consecutivos (1996-2006) mostrou a circulação do subgrupo BA em seis dos dez anos. Esse mesmo estudo mostrou que o subgrupo BA foi o único subgrupo de VSRhB circulante durante os anos de 2003-2004, 2004-2005 e 2005-2006, e o grupo predominante nos anos de 2001-2002 e 2002-2003, embora tivesse circulado também no período de 2000-2001 (ZLATEVA et al., 2007). Na Argentina, foi demonstrado que o domínio de GB3 no período de 1995 a 2001 foi substituído pelo domínio de BA de 2002 a 2004 (GALIANO et al., 2005; TRENTO et al., 2006). Na Índia, durante os anos de 2001 a 2005, o BA foi o único subgrupo de VSRhB circulante. Sua detecção ocorreu nos períodos epidêmicos de 2001-2002, 2003-2004 e 2004-2005, não sendo detectado durante os anos de 2002-2003, pois nesse ano apenas o VSRhA circulou (PARVEEN et al., 2006).

Nesse estudo não foi verificado o surgimento de novos subgrupos, como observado em estudos realizados na Argentina, Uruguai, Bélgica, Japão e África do Sul (VENTER et al., 2001; TRENTO et al., 2003; BLANC et al., 2005; KUROIWA et al., 2005; ZLATEVA et al., 2007). No Uruguai, a análise de seqüências de 76 VSRh do grupo B que circularam de 1985 a 2001, detectou a circulação de cinco subgrupos de B: SAB2, SAB3, GB1, GB3, GB4 e de dois novos subgrupos identificados, como URU1 e o URU2, cujas características de distinção de outros subgrupos eram a duplicação de seis nucleotídeos. A circulação desses novos subgrupos foi confirmada em outro estudo uruguaio, após análise de novas seqüências de VSRh que circularam entre 1999 e 2001 (ARBIZA et al., 2005; BLANC et al., 2005). A presença desses subgrupos não foi relatada ainda em nenhum outro estudo.

As maiores taxas de variabilidade de nucleotídeos dos VSRhA e VSRhB foram encontradas quando se comparou os VSRh circulantes em Fortaleza com as cepas protótipos respectivas. Os VSRhA e VSRhB de Fortaleza divergiram acima de 12,2% e 13% em relação à Long e CH18537, respectivamente. Um estudo realizado com VSRhA circulantes em Havana nos anos de 1994 e 1995 mostrou uma divergência de apenas quatro nucleotídeos entre as seqüências de VSRh daquela cidade e a cepa protótipo Long (VALDÉS et al., 1998). Em relação a esse aspecto, estudos realizados em outros países mostram percentuais de variabilidade entre VSRhA que circularam mais recentemente e a cepa Long mais próximos aos descritos para as cepas de VSRhA de Fortaleza (COGGINS et al., 1998; PERET et al.,

1998; PARVEEN et al., 2006). O isolamento político de Cuba, é sugerido como um fator que justifica essa pequena variação.

Quanto a variação intragrupos observou-se que nas seqüências analisadas de VSRh circulantes em Fortaleza, as maiores taxas de variação de nucleotídeos foram observadas para os subgrupos GA2 e GB3, o que contrasta com o observado em outros estudos onde as maiores variações são relatadas para os subgrupos GA5 e BA (PERRET et al., 1998; BOTOSSO, 2002; PARVEEN et al., 2006).

A correlação genética entre os VSRh circulantes em Fortaleza é maior com os VSRh circulantes no Brasil. Quando da publicação do primeiro estudo sobre epidemiologia molecular de VSRh circulantes no Brasil, verificou-se que a maior correlação genética entre os VSRh de Salvador e os VSRh circulantes no Uruguai e Argentina nos anos anteriores (1989 a 2001) (MOURA et al., 2004). Isso mostra a maior correlação entre VSRh circulantes em áreas geográficas mais próximas e sugere que a disseminação do vírus pode ter se originado em qualquer um dos locais de estudo. Com as informações sobre a sazonalidade do VSRh apresentadas nesse estudo, através das quais fica bem caracterizado que os períodos epidêmicos de VSRh ocorrem mais cedo em Fortaleza que nas regiões sudeste do Brasil e nos países do Cone Sul da América do Sul, pode-se sugerir que os VSRh disseminem-se a partir de Fortaleza. Para que isso possa ser comprovado é essencial que se realizem estudos com VSRh circulantes nesses diferentes locais durante os períodos epidêmicos de um mesmo ano.

Quando analisadas as taxas de substituições sinônimas e não sinônimas neste estudo, observou-se que média das taxas de mutações não sinônima e sinônimas (dN/dS) dos VSRhA foi próximo a 1 (0,9899) sugerindo uma pressão seletiva favorável a mudanças de aminoácidos. Porém, os VSRhB apresentaram uma baixa taxa de dN/dS sugerindo que estes vírus estão estreitamente relacionados e a pressão seletiva, neste caso, é negativa ou neutra, no que se refere a substituições de aminoácidos. Essa mudança na seqüência nucleotídica gerando mudanças de aminoácidos pode ser utilizada como fator adaptativo para o vírus, ou seja, a progênie viral poderá preservar tal mudança e disseminar-se mais facilmente (CANE; PRINGLE, 1995; YANG, 1997). A alterações que vão ocorrendo simultaneamente ou progressivamente nas seqüências do VSRh permitirão o escape desse vírus aos mecanismos do sistema imune do hospedeiro (VENTER et al., 2001; PARVEEN et al., 2006; BOTOSSO et al., 2009).

Os sítios de glicosilação tipo N e O podem afetar a ligação dos anticorpos à proteína G, relacionada à proteção do vírus ao sistema imune do hospedeiro (CANE et al., 1991; ROCA et al., 2001). Esses sítios de glicosilação vêm sendo descritos para ambos os grupos de VSRh (JOHNSON et al., 1987; ROCA et al., 2001; PARVEEN et al., 2006). A frequência e o padrão de identificação desses sítios diferem entre esses dois grupos antigênicos.

Neste estudo, o VSRhA apresentou quatro sítios de glicosilação tipo N, sendo dois deles conservados em todas as seqüências analisadas. Em Moçambique, também foi observada a conservação de dois sítios de glicosilação tipo N nos VSRhA analisados, sugerindo a maior variabilidade desse grupo devido a presença desses sítios (ROCA et al., 2001).

Nos VSRhA analisados nesse estudo, foram observadas três repetições de aminoácidos conservados entre todas as seqüências analisadas, possivelmente associadas a ligações O-glicosídicas, porém nenhuma dessas repetições ocorreu entre os VSRhB. As diferenças entre os VSRh, a nível de aminoácido, podem ser amplificadas pelas mudanças ocorridas nesses sítios de glicosilação, sugerindo uma vantagem evolutiva para o vírus através da adição de novos sítios (ROCA et al., 2001; ZLATEVA et al., 2004; ZLATEVA et al., 2005; PARVEEN et al., 2006).

Em estudo recente foi demonstrado que variações nas seqüências de aminoácidos da proteína G do VSRh, por exemplo a substituição de uma prolina por uma leucina em uma determinada posição, pode levar à persistência daquela “variante” viral, através de sua progênie, na população que será susceptível a infecções por esse vírus que apresenta novas características. O sistema imune de indivíduos daquela população vai respondendo gradativamente de forma mais eficaz até que o vírus retorna ao que era antes da variação de aminoácidos. Esse mecanismo de escape ou mecanismo evolutivo foi denominado nesse estudo como *flip-flop*, o que mostra que para infectar o vírus sofre alterações genéticas e para ser selecionado e continuar circulando ele deve retornar às suas características iniciais ou adquirir novas mudanças (BOTOSSO et al., 2009).

O presente estudo gerou os primeiros dados sobre a epidemiologia molecular dos VSRh circulantes em Fortaleza e permitiu caracterizar de forma mais clara aspectos sobre a sazonalidade desse vírus que são essenciais para o estabelecimento de diretrizes relacionadas ao uso do único agente disponível para prevenção de infecções respiratórias graves causadas pelo VSRh em crianças de risco.

6. CONCLUSÕES

- O VSRh foi o vírus mais frequentemente detectado em IRA na população de estudo o que confirma a importância desse vírus como agente etiológico dessas infecções em crianças de Fortaleza;
- Os períodos epidêmicos de VSRh apresentaram ocorrência anual relacionada à estação chuvosa;
- Observou-se uma variação no número de IRA causadas pelo VSRh em cada período epidêmico;
- O início, o fim e a duração de cada período epidêmico de VSRh foi variável;
- Durante o período analisado houve a co-circulação dos grupos e subgrupos do VSRh com a predominância do VSRhA em todos os anos analisados;
- O subgrupo BA foi predominante nos VSRhB;
- Os subgrupos de VSRh circulantes em Fortaleza apresentam maior correlação genética com os VSRh que circularam em outras regiões brasileiras;
- Nas seqüências de VSRhA, algumas substituições de nucleotídeos geraram substituições não sinônimas demonstrando uma possível pressão seletiva positiva sobre os vírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAYI-OBE, E.K.; COEN, P.G.; HANDA, R.; HAWRAMI, K.; AITKEN, C.; McINTOSH, E.D.G.; BOOY, R. Influenza A and respiratory syncytial virus hospital burden in young children in East London. **Epidemiol. Infect.**, v. 136, n. 8, p. 1046-1058, 2008.
- ANDERSON, L. J.; HIERHOLZER, J. C.; TSOU, C.; HENDRY, R. M.; FERNIE, B. F.; STONE, Y.; McINTOSH, K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **J. Infect. Dis.**, v. 151, n. 4, p. 626-633, 1985.
- ANDERSON, L.J.; BINGHAN, P.; HIERHOLZERV. J.C. Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixtures of F and G protein monoclonal antibodies. **J. Virol.**, v. 62, n. 11, p. 4232-4238, 1988.
- ANDERSON, L.J. Respiratory syncytial virus vaccines for otitis media. **Vaccine**, v. 19, supl. 1, p. 59-65, 2001.
- ANTONIASSI, L.H.; SPILKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.; BARACAT, E.C.E.; 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, 2008.
- ARBIZA, J.; DELFRARI, A.; FRABASILE, S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985 – 2001 – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 221-230, 2005.
- ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G.; McAULIFFE, J. F.; DE SOUSA, M. A.; MOTA, S. B.; McAULIFFE, M. I.; GEIST, F. C.; CARVALHO, E. P.; FERNANDES, M.C.; GUERRANT, R. L.; GWALTNEY JR., J. M. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, n. 2, p. 252-258, 1991.
- AVEDAÑO, L.F.; PALOMINO, M.A.; LARRAÑAGA, C. Surveillance for respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile (1989 to 2000). **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n. 10, p. 4879-4882, 2003.
- BARBAGELATA, L.S.; SANTOS, M.C.; FILIZOLLA, E.M.; SOUSA, R.C.M.; MELLO, W.A. Caracterização molecular de vírus respiratório sincicial isolados em belém no período de 1999 a 2006. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 59., 2007, Belém. Anais eletrônicos **Belém: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência.** São Paulo: SBPC/UFPA, 2007. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/59ra>>. Acesso em: 07 jul 2008.
- BANERJI, A.; LANCTÔT, K.L.; PAES, B.A.; MASOUD, S.T.; TAM, D.Y.; MACDONALD, W.A.; ROBERTS, A. Comparison of the cost of hospitalization for respiratory syncytial virus disease versus palivizumab prophylaxis in Canadian Inuit infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28 n.8, p.702-706, 2009.
- BELÁK, S.; THOREN, P. Molecular diagnosis of animal diseases some experiences over the past decade. **Expert. Rev. Mol. Diagn.**, v. 1, n. 4, p. 434-443, 2001.
- BERGER, T.M.; AEBI, C.; DUPPENTHALER, A.; STOCKER, M.; Swiss Pediatric Surveillance Unit. **Infection.**, v. 37, n. 2, p. 109-116, 2009.

BLANC, A.; DELFRARO, A.; FRABASILE, S.; ARBIZA, J. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. **Arch. Virol.**, v. 150, n. 3, p. 603-609, 2005.

BORON, M.L.; EDELMAN, L.; GROOTHUIS, J.R.; MALINOSKI, FJ. A novel active respiratory syncytial virus surveillance system in the United States: variability in the local and regional incidence of infection. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 27, n. 12, p. 1095-1098, 2008.

BOSSO, P.A.; CANDEIAS, J.M.G.; PADUAN, K.S.; RICCHETTI, M.Q.; MIRANDA, A.F.M. DE; RUGOLO, L.M.S.; DURIGON, E.L.; VENTURA, A.M. Human respiratory syncytial virus detection in children admitted at a community hospital in Botucatu, SP, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, n. 4, p. 348-352, 2004.

BOTOSSO, V.F. **Diversidade genética da glicoproteína G do vírus respiratório sincicial humano (HRSV) entre as amostras isoladas na cidade de São Paulo, 1995-1998.** Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédica. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

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, e1000254, 2009.

BRASIL, 2004. O desafio da influenza: Epidemiologia e organização da vigilância no Brasil. **Boletim Eletrônico**, ano 4, v. 1. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/svs>>. Acesso em: 19 nov 2009.

BRICKS, L.F. Prevention of respiratory syncytial virus infections. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo**, v. 56, n. 3, p. 79-90, 2001.

BUCKINGHAM, S.C.; BUSH, A.J.; DEVINCENZO. Nasal quantity of respiratory syncytial virus correlates with disease severity in hospitalized infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 19, n. 2, p. 113-117, 2000.

CALEGARI, T.; QUEIRÓZ, D.A.O.; YOKOSAWA, J.; SILVEIRA, H.L.; COSTA, L.F.; OLIVEIRA, T.F.M.; LUIZ, L.N.; OLIVEIRA, R.C.; DINIZ, F.C.; ROSSI, L.M.G.; 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, 2005.

CAMPOS, A.C.A.; DURIGON, E.L.; LEAL, A.L.; SILVA, T.S.; BOSSO, P.A.R.; MORAES, C.T.P.; OLIVEIRA, D.B.L.; LIMS, H.N.; VIEIRA, S.E.; BOTOSSO, V.F.; ZANOTTO, P.M.A.; STEWIEN, K.E. Comparison between ectodomain and G2 region of G glycoprotein for genotyping of HRSV. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 413-416, 2007.

CANDEIAS, J.A. Antibody complement fixation for respiratory syncytial virus and adenovirus and hemagglutination inhibition of parainfluenza viruses 1, 2 and 3 in a Brazilian children population. **Rev. Saúde Pública**, v. 2, n. 1, p. 44-67, 1968.

CANDEIAS, J.A.; CHRISTOVÃO, D.D.E.A. Detection of complement fixing antibodies against respiratory syncytial virus in group of the population of the Federal Territory of Amapá, Brazil. **Arq. Fac. Hig. Saúde Pública Univ. São Paulo**, v. 20, n. 1, p. 87-97, 1966.

CANDEIAS, J.A.; HIMELFARB, L. Detection of complement fixing antibodies against respiratory syncytial virus in habitants of the city of São Paulo. **Arq. Fac. Hig. Saúde Pública Univ. São Paulo**, v. 20, n. 2, p. 207-213, 1966.

CANE, P. A.; MATTHEWS, D. A., M.; PRINGLE, C. R. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 72, n. 12, p. 2091-2096, 1991.

CANE, P.A.; PRINGLE, C.R. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: rapid identification of subgroup A lineages. **J. Virol. Methods**, v. 40, n. 3, p. 297-306, 1992.

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, n. 1, p. 1-4, 1994.

CANE, P.A.; PRINGLE, C.R. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: Evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. **J. Virol.**, v. 69, n. 5, p. 2918-2925, 1995.

CANE P.A. Molecular Epidemiology of respiratory syncytial virus. **Rev. Med. Viral**, v. 11, n. 2, p. 103-116, 2001.

CANNELL, J.J.; VIETH, R.; UMHAU, J.C.; HOLICK, M.F.; GRANT, W.B.; MADRONICH, S.; GARLAND, C.F.; GIOVANNUCCI, E. Epidemic influenza and vitamin D. **Epidemiol. Infect.**, v. 134, n. 6, p. 1129-1140, 2006.

CARBALLAL, G.; VIDELA, C.; SEQUEIRA, M. D.; MISTCHENKO A.; REQUEIJO P. V.; ARBIZA J. Respiratory syncytial virus: changes in prevalence of subgroups A and B among Argentineans children, 1990 – 1996. **J. Med. Virol.**, v. 61, n. 2, p. 275-279, 2000.

CARTEE, T.L.; WERTZ, G.E. Respiratory syncytial virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection. **J. Virol.**, v. 75, n. 24, p. 12188-12197, 2001.

Centers for Disease Control and Prevention. Respiratory syncytial virus activity – United States, 2003-2004. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 53, n. 49 p. 1159, 2004.

Centers for Disease Control and Prevention. Respiratory syncytial virus activity – United States, 2004-2005. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 54, n. 49, p. 1259-1260, 2005.

Centers for Disease Control and Prevention. Respiratory syncytial virus activity – United States, 2005-2006. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 55, n. 47 p. 1277-1279, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention. Respiratory syncytial virus activity – United States, July 2006 – November 2007. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 56, n. 48, p. 1263-1265, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention. Respiratory syncytial virus activity – United States, July 2007 – December 2008. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 57, n. 50, p. 1355-1358, 2008.

CHAN, P.W.K.; CHEW, F.T.; TAN, T.N.; CHUA, K.B.; HOOI, P.S. Seasonal variation in respiratory syncytial virus chest infection in the tropics. **Pediatric. Pulmonology**, v. 34, p. 47-51, 2002.

CHANOCK, R.; ROIZMAN, B.; MYERS, R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA): I. isolation, properties and characterization. **Am. J. Epidemiol.**, v. 66, p. 281-290, 1957.

CHECON, R. E.; SIQUEIRA, M. M.; LUGON, A. K.; PORTES, S.; DIETZE, R. Short report: seasonal pattern of respiratory syncytial virus in a region with a tropical climate in southeastern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, n. 5, p. 490-491, 2002.

CHEN, M.D.; VAZQUEZ, M.; BUONOCORE, L.; KAHN, J.S. Conservation of the respiratory syncytial virus SH gene. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 4, p. 1228-1233, 2000.

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

CHEW, F. T.; DORAISINGHAM, S.; LING, A. E.; KUMARASINGHE, G.; LEE, B. W. Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. **Epidemiol. Infect.**, v. 121, n. 1, p. 121-128, 1998.

CHOI, E.H.; LEE, H.J. Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B of respiratory syncytial viruses isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1547-1556, 2000.

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 and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. **J. Med. Virol.**, v. 65, n. 2, p. 408-412, 2001.

COATES, H.V.; KENDRICK, L.; CHANOCK, R.M. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 112, n. 4, p. 958-964, 1963.

COATES, H.V.; ALLING, D.W.; CHANOCK, R.M. An antigenic analysis of respiratory syncytial virus by plaque reduction neutralization test. **Am. J. Epidemiol.**, v. 83, n. 2, p. 299-313, 1966.

COGGINS, W.B.; LEFKOWITZ, E.J.; SULLENDER, W.M. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in children's hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 12, p. 3552-3557, 1998.

COIRAS, M.T.; PÉREZ-BREÑA, 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. Med. Virol.**, v. 69, n. 1, p. 132-144, 2003.

COLLINS, P. L.; McINTOSH, K.; CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. In: FIELDS, B. N., **Fields virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott, v. 1, p. 1313-1351, 1996.

COLLINS, P. L.; McINTOSH, K.; CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. In: FIELDS, B. N. **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott, v. 1, p. 1443-1486, 2001.

COLLINS, P. L.; McINTOSH, K.; CHANOCK, R. M. Respiratory syncytial virus. In: FIELDS, B. N. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, v. 1, p. 1602-1645, 2007.

CROWE, J.E. Respiratory syncytial virus vaccine development. **Vaccine**, v. 20, supl. 1, p. 32-37, 2002.

CUEVAS, L.E.; NASSER, A.M.B.; DOVE, W.; GURGEL, R.Q.; GREENSILL, J.; HART, C.A. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 12, p. 1626-1628, 2003.

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. 91, p. 7-10, 2005.

DAYAN, P.; AHMAD, F.; URTECHO, J.; NOVICK, M.; DIXON, P.; LEVINE, D.; MILLER, S. Test characteristics of the respiratory syncytial virus enzyme-linked immunoabsorbent assay in febrile infants < or = 60 days of age. **Clin. Pediatr.**, v. 41, n. 5, p. 415-418, 2002.

DI CARLO P.; ROMANO, A.; SALSA, L.; GUELI, A.; POMA, A.; FUÇA, F.; DONES, P.; COLLURA, M.; PAMPINELLA, D.; MOTISI, D.; CORSELLO, G. Epidemiologic assessment of respiratory syncytial virus infection in hospitalized infants during the season 2005-2006 in Palermo, Italy. **Riv. Ital. Pediatr.**, v. 35, n. 1, p.11-16, 2009.

DUDAS, R.A.; KARRON, R.A. Respiratory syncytial virus vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 430-439, 1998.

ERDMAN, D.D.; WEINBERG, G.A.; EDWARDS, K.M.; WALKER, F.J.; ANDERSON, B.C.; WINTER, J.; GONZALEZ, 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, n. 9, p. 4298-42303, 2003.

FALSEY, A.R.; WALSH, E.E.; HAYDEN, F.G. Rhinovirus and coronavirus infection-associated hospitalizations among older adults. **J. Infect. Dis.**, v. 85, n. 9, p. 1338-1341, 2002.

FALSEY, A.R.; WALSH, E.E. Respiratory syncytial virus infection in elderly adults. **Drugs Aging**, v. 22, n. 7, p.577-587, 2005.

FELDMAN, S.A.; HENDRY, R.M.; BEELER, J.A. Identification of linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. **J. Virol.**, v. 73, n. 8, p. 6610-6617, 1999.

FELSENSTEIN, J. – Confidence limits on Phylogenies: an approach using Bootstrap. **Evolution.**, v. 39, p. 783-91, 1985.

FELSENSTEIN, J. – Evolutionary trees from DNA sequences a Maximun Likelihood approach. **J. Mol. Evol.**, v. 17, n. 6, p. 368-76, 1981.

FENTON, C.; SCOTT, L.J.; PLOSKER, G.L. Palivizumab: A review of its use as prophylaxis for serious respiratory syncytial virus infection. **Pediatr. Drugs**, v. 6, n. 3, p. 177-197, 2004.

FLEMING, D.M.; ELLIOT, A.J.; CROSS, K.W. Morbidity profiles of patients consulting during influenza and respiratory syncytial virus active periods. **Epidemiol. Infect.**, v. 135, n. 7, p. 1099-1108, 2007.

FODHA, I.; VABRET, A.; GHEDIRA, L.; SEBOUI, H.; CHOUCANE, S.; DEWAR, J.; GUEDDICHE, N.; TRABELSI, A.; BPOUJAFFAR, N.; FREYMUTH, F. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: association between viral load, virus subgroup, and disease severity. **J. Med. Virol.**, v. 79, n. 12, p. 1951-1958, 2008.

FRABASILE, S.; DELFRARO, A.; FACAL, L.; VIDELA, C.; 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 viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. **J. Med. Virol.**, v. 71, n. 2, p. 305-312, 2003.

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

GALIANO, M. C.; PALOMO, C.; VIDELA, C. M.; ARBIZA, J.; MELERO J. A.; CARBALLAL, G. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial (groups A and B) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 2266-2273, 2005.

GAN, S.W.; NG, L.; LIN, X.; GONG, X.; TORRES, J. Structure and ion channel activity of the human respiratory syncytial virus (hRSV) small hydrophobic protein transmembrane domain. **Protein Sci.**, v. 17, n. 5, p. 813-820, 2008.

GARDNER, P. S.; McQUILLIN, J. **Rapid virus diagnosis: application of immunofluorescence**. 2. ed. London: Butterworth, p. 317, 1980.

GASPARINI, R.; DURANDO, P.; ANSALDI, F.; STICCHI, L.; BANFI, F.; AMICIZIA, D.; PANATTO, S.; ESPOSITO, S.; PRINCIPI, N.; ICARDI, G.; CROVARI, P. Influenza and respiratory syncytial virus in infants and children: relationship with attendance at a pediatric emergency unit and characteristics of the circulating strains. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 26, n. 9, p. 619-628, 2007.

GILCA, R.; DE SERRES, G.; TREMBLAY, M.; VACHON, M.L.; LEBLANC, E.; BERGERON, M.G.; DERY, 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, n. 1, p. 54-58, 2006.

GIMENEZ, H.B.; CASH, P.; MELVIN, W.T. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use: comparison of different virus isolates. **J. Gen. Virol.**, v. 65, n. 5, p. 963-971, 1984.

GIRARD, M.P.; CHERIAN, T.; PERVIKOV, Y.; KIENY, M.P. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. **Vaccine**, v. 23, n. 50, p. 5708-5724, 2005.

GROOTHUIS, J.; BAUMAN, J.; MALINOSKI, F.; EGGLESTON, M. Strategies for prevention of RSV nosocomial infection. **J. Perinatol.**, v. 28, n. 5, p. 319-323, 2008.

HACKING, D.; HULL, J. Respiratory syncytial virus – viral biology and the host response. **J. Infect.**, v.45, n. 1, p. 18-24, 2002.

HAKHVERDYAN, M.; HAGGLUND, S.; LARSEN, L.; BELAK, S. Evolution of a single tube fluorogenic RT PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. **J. Virol. Methods**, v. 123, n. 2, p. 195-202, 2004.

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, n. 6, p. 1283-1290, 1990.

HALL, C.B.; WALSH, E.E.; LONG, C.E.; SCHANABEL, K.C. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. **J. Infect. Dis.**, v. 163, n. 4, p. 693-698, 1991.

HALL, C.B. Nosocomial respiratory syncytial viral infections: The “Cold War” has not ended. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, n. 2, p. 590-596, 2000.

HENDRY, R. M.; PIERIK, L. T.; McINTOSH, K. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. **J. Infect. Dis.**, v. 160, n. 2, p. 185-190, 1989.

HIERHOLZER, J. C.; TANNOCK, G. A.; HIERHOLZER, C. M.; COOMBS, R. A.; KENNETT, M. L.; PHILLIPS, P. A.; GUST, I. D. Subgrouping of respiratory syncytial virus strains from Australia and Papua New Guinea by biological and antigenic characteristics. **Arch. Virol.**, v. 136, n. 1-2, p. 133-147, 1994.

HILDYAL, 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, n. 4, p. 753-757, 2002.

HU, A.; COLELLA, M.; TAM, J.S.; RAPPAPORT, R.; CHENG, S.M. Simultaneous detection, subgroup, and quantization of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 149-154, 2003.

HUNGENES, O.; JONASSEN, T.O.; JONASSEN, C.M.; GRINDE, B. Molecular epidemiology of viral infections. **APMIS**, v. 108, n. 2, p. 81-97, 2000.

IMAZ, M. S.; SEQUEIRA, M. D.; VIDELA, C.; VERONESSI, I.; COCIGLIO, R.; ZERBINI, E.; CARBALLA, G. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. **J. Med. Virol.** v.61, n. 1, p.76–80, 2000.

JOHNSON JR., P. R.; OLMSTED, R. A.; PRINCE, G. A.; JOHANSEN, J.; HANSEN, K. S.; CHRISTENSEN, L. S.; LARSEN, L. B. Antigenic relatedness between glycoprotein's of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoprotein's to immunity. **J. Virol.**, v. 61, n. 10, p. 3163-3166, 1987.

KAMASAKI, H.; TSUTSUMI, H.; SEKI, K.; CHIBA, S. Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup B strain isolated during the last 20 years from the same region in Japan: existence of time-dependent linear genetic drifts. **Arch. Virol.**, v. 146, n. 3, p. 457-466, 2001.

KANEKO, M.; WATANABE, J.; KUWAHARA, M.; UENO E; HIDA M; KINOSHITA A; SONE T. Impact of respiratory syncytial virus infection as a cause of lower respiratory tract infection in children younger than 3 years of age in Japan. **J. Infect.**, v. 44, n. 4, p. 240-243, 2002.

KELLOGG, J.A. Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 115, n. 5, p. 451-8, 1991.

KREMPL, C.; MURPHY, B. R.; COLLINS, P. L. Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions. **J. Virol.**, v. 76, n. 23, p. 11931-11942, 2002.

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.

KUROIWA, Y.; NAGAI, K.; OKITA, L.; TSUTSUMI, H. Genetic variability and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus subgroup a strains in Japan determined by heteroduplex mobility assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 2048-2053, 2004.

KUROIWA, Y.; NAGAI, K.; OKITA, L.; YUI, I.; KASE, T.; NAKAYAMA, T.; TSUTSUMI, H. A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses groups A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002. **J. Med. Virol.**, v.76, n. 2, p. 241-247, 2005.

LANGLEY, J. M.; LeBLANC, J. C.; WANG, E. E. L.; LAW, B. J.; MacDONALD, N. E.; MITCHELL, I.; STEPHENS, D.; McDONALD, J.; BOUCHER, F. D.; DOBSON, S. Nosocomial respiratory syncytial virus infection in canadian pediatric hospitals: a pediatric investigators collaborative network on infections in Canada study. **Pediatrics**, v. 100, n. 6, p. 943-946, 1997.

LEE, J.T.; CHANG, L.Y.; WANG, L.C.; KAO, C.L.; SHAO, P.L.; LU, C.Y.; LEE, P.I.; CHEN, J.M.; LEE, C.Y.; HUANG, L.M. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in northern Taiwan, 2001-2005 -- seasonality, clinical characteristics, and disease burden. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 40, n. 4, p. 293-301, 2007.

LELAND, D.S.; GINOCCHIO, C.C. Role of culture cellular for virus detection in the age of technology. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 1, p. 49-78, 2007.

LEVINE, S.; KLAIBER, F.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.

LIM, C.S.; KUMARASINGHE, G.; CHOW, V.T. Sequence and phylogenetic analysis of SH, G and F genes and proteins of human respiratory syncytial virus isolates from Singapore. **Acta Virol.**, v. 47, n. 2, p. 97-104, 2003.

- LI, D.; JANS, D.A.; BARDIN, P.G.; MEANGER, J.; MILLS, J.; GHILDYAL, R. Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. **J. Virol.**, v. 82, n.17, p. 8863-8870, 2008.
- LINA, B.; VALETTE, M.; FORAY, S.; LUCIANI, J.; STAGNARA, J.; SEE, D. M.; AYMARD, M. Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during winter 1994 to 1995. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 12, p. 3007-3011, 1996.
- LO, S.M.; BRAZAS, R.M.; HOLTZMAN, M.J. Respiratory syncytial virus non structural proteins NS1 and NS2 mediate inhibition of stat 2 expression and alpha/beta interferon responsiveness. **J. Virol.**, v. 79, n. 14, p.9315-9319, 2005.
- LOURENÇÃO, L.G.; SALOMÃO, J.B.; RAHAL, P.; SOUZA, F.P.; ZANETTA, D. M. T. Infecções pelo vírus sincicial respiratório em crianças. **Pulmão (RJ)**, v. 14, n. 1, p. 59-68, 2005.
- LOURENÇÃO, L.G. **Infecções Respiratórias por Vírus Sincicial Respiratório em Crianças de Creche**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, 2006.
- LUKIC-GRILIC, A.; CANE, P.A.; BACE, A.; PRINGLE, C.R.; MLINARIC-GALINOVIC, G.; POPOW-KRAUPP, T.H. Antigenic and genomic diversity of Central European respiratory syncytial virus strains. **Arch. Virol.**, v. 143, n. 7, p. 1441-1447, 1998.
- MADDISON, W.P.; MADDISON, D.R. **MacClade** Sunderland, M.A: Sinauer, v. 3.0.3, 1992.
- MADHI, S. A.; VENTER, M.; ALEXANDRA, R.; LEWIS, H.; KARA, Y.; KARSHAGEN, W. F.; GREEF, M.; LASSEN, C. Respiratory syncytial virus associated illness in high-risk children and national characterization of the circulating virus genotype in South Africa. **J. Clin. Virol.**, v. 27, n. 2, p. 180-189, 2003.
- MELERO, J. A.; GARCÍA-BARRENO, B.; MARTÍNEZ, I.; PRINGLE, C. R.; CANE, P. A. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. **J. Gen. Virol.**, v. 78, n. 10, p. 2411-2418, 1997.
- MLINARIC-GALINOVIC, G.; VARDA-BRKIC, D. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 37, n. 4, p. 237-246, 2000.
- MORRIS, J. A.; BLOUNT JR., R. E.; SAVAGE, R. E. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 92, n. 3, p. 544-549, 1956.
- MOURA, F. E. A.; BORGES, L. C.; PORTES, S. A. R.; RAMOS, E. A. G.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 739-743, 2003.
- MOURA, F.E.A.; BLANC, A.; FRABASILE, S.; DELFRARO, A.; SIERRA, M.J.; TOMÉ, L.; RAMOS, E.A.G.; 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, 2004.

- MOURA, F. E. A.; NUNES, I. F. S.; SILVA JR., G. B.; SIQUEIRA, M. M. Short report: Respiratory syncytial virus infections in Northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 1, p. 165-167, 2006.
- MUFSON, M. A.; ÖRVELL, C.; RAFNAR, B.; NORRBY, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.**, v. 66, n. 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 infection among children hospitalized with acute respiratory illness. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, n. 4, p. 700-705, 2004.
- MULLINS, J.A.; LAMONTE, A.C.; BRESEE, J.S.; ANDERSON, L.I. Substantial variability in community respiratory syncytial virus season timing. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 22, n. 10, p. 857-862, 2003.
- MUNIR, S.; NOUEN, C.L.; LUONGO, C.; BUCHHOLZ, U.J.; COLLINS, P.L.; BUKREYEV, A. Nonstructural proteins 1 and 2 of respiratory syncytial virus suppress maturation of human dendritic cells. **J. Virol.**, v. 82, n. 17, p. 8780-8796, 2008.
- MIYAKY, C.Y.; RUSSO, C.A.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética. Introdução e método da Máxima Parcimônia. In: S.R. Mاتيoli (Ed). **Biologia Molecular e Evolução**, p. 97-107. Halos, Ribeirão Preto, Brasil, 2001.
- NAGAI, K.; KAMASAKI, H.; KUROIWA, Y.; OKITA, L.; TSUTSUMI, H. Nasocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides – duplicated G protein gene. **J. Med. Virol.** v. 74, n. 1, p. 191-165, 2004.
- NASCIMENTO, J. P.; SIQUEIRA, M. M.; SUTMOLLER, F.; KRAWCZUK, M. M.; FARIAS, V.; FERREIRA, V.; RODRIGUES, M. J. Longitudinal study of acute respiratory viruses during four consecutive years. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 287-296, 1991.
- NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Mol. Biol. Evol.**, v. 3, n. 5, p. 418-426, 1986.
- NOYOLA, D.E.; MANDEVILLE, P.B. Effect of climatologically factors on respiratory syncytial virus epidemics. **Epidemiol. Infect.**, v. 136, n. 10, p. 1328-1332, 2008.
- NOYOLA, D.E.; RODRÍGUEZ-MORENO, G.; SÁNCHEZ-ALVARADO, J.; MARTÍNEZ-WAGNER, R.; OCHOA-ZAVALA, J.R. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in Mexico. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 23, n. 2, p. 118-123, 2004.
- NUNES, I. F. S. **Perfil epidemiológico das infecções causadas por vírus sincicial respiratório em crianças atendidas em hospital de Fortaleza-CE.** 2004. 115p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- NUNES, I.F.; MOURA, F.E. Isolation of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates stored at 20 degrees C from one to fifteen months after collection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 101, n. 4, p. 451-453, 2006.

- OLIVEIRA, J.F.; DE SÁ, J.P.; CRUZ, M.E. Identificação e monitorização do vírus influenza A e B, na população de Maceió. **Ciência e saúde coletiva**, v. 9, n. 1, p. 241-46, 2004.
- OLIVEIRA, T.F.; FREITAS, G.R.; RIBEIRO, L.Z.; YOKOSAWA, J.; SIQUEIRA, M.M.; PORTES, S.A.; CALEGARI, T.; COSTA, L.F.; MANTESE, O.C.; QUEIRÓZ, D.A. Prevalence and clinical of respiratory syncytial virus A and B groups in children see at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 417-422, 2008.
- OMER, S.B.; SUTANTO, A.; SARWO, H.; LINEHAN, M.; DJELANTIK, I.G.; MERCER, D.; MONIAGA, V.; MOULTON, L.H.; WIDJAYA, A.; MULJATI, P.; GESSNER, B.D.; STEINHOFF, M.C. Climatic, temporal, and geographic characteristics of respiratory syncytial virus disease in a tropical island population. **Epidemiol. Infect.**, v. 136, n. 10, p. 1319-27, 2008.
- ÖSTLUND, 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. 150-167, 2008.
- PARVEEN, S.; SULLENDER, W.M.; FOWLER, K.; LEFKOWITZ, E.J.; KAPOOR, S.K.; BROOR, S. Genetic variability in the G protein gene of group A and B respiratory syncytial viruses from India. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 9, p. 3055-3064, 2006.
- PECCHINI, R.; BEREZIN, E.N.; CALAHANI, F.M.C.; PASSOS, S.D.; SOUZA, M.C.O.; LIMA, L.R.A.V.; 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.
- PEREIRA, M.S.; BRUNO-LOBO, G.; PEREIRA, H.G. Inquérito sorológico sobre incidência de certas viroses respiratórias no Rio de Janeiro. **Anais de Microbiologia**, v. 9 (pt C), p. 579-589, 1961.
- PERET, T.C.; HALL, C.B.; SCHNABEL, K.C.; GOLUB, J. A.; ANDERSON, L.J. Circulation pattern of genetically distinct groups A and B strain of human respiratory syncytial virus in community. **J. Gen. Virol.**, v. 79, n. 9, p. 2221-2229, 1998.
- PERET, T.C.; HALL, C.B.; HAMMOND, G.W.; PIEDRA, P.A.; STORCH, G.A.; SULLENDER, W.M.; TSOU, C.; ANDERSON, L.J. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. **J. Infect. Dis.**, v. 181, n. 6, p. 1891-1896, 2000.
- RAFIEFARD, F.; JOHANSSON, B.; TECLE, T.; ORVELL, C. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) of group A in Stockholm, Sweden, between 1965 and 2003. **Virus Res.**, v. 105, n. 2, p. 137-145, 2004.
- RAFIEFARD, F.; ORVELL, C.; BONDESON, K. Genotyping of respiratory syncytial virus (RSV) group A in Stockholm, Sweden, using PCR and two-dimensional melting curve analysis. **APMIS**, v. 116, n. 4, p. 317-322, 2008.
- RAMIREZ, J.A. RSV infection in the adult population. **Manag. Care**, v. 17, n.11 (Supl.12), p. 13-15, 2008.

REINA, J.; GONZALEZ GÁRDENAS, M.; GOPEGUI, E.; PADILHA, E.; BALLESTEROS, F.; MARI, M.; MUNAR, M. Prospective evaluation of a dot-blot enzyme immunoassay (Directigen RSV) for the antigenic detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates of paediatric patients. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n. 11, p. 967-971, 2004.

REIS, A.D.; FINK, M.C.; MACHADO, C.M.; PAZ, J.D.E.P.; OLIVEIRA, R.R.; TATENO, A.F.; MACHADO, A.F.; CARDOSO, M.R.; PANNUTI, C.S.; CHIADO e RDGV/FAPESP RESEARCH grupos. 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, 2008.

RIBEIRO, J.F.; MOURA, F.E.A. Detection of human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates of Brazilian children by immunofluorescence assay. **Virus Reviews and Research**, v. 13, p. 1-2, 2008.

RICCETTO, A.G.; RIBEIRO, J.D.; SILVA, M.T.; ALMEIDA, R.S.; ARNS, C.W.; BARACAT, E.C. Respiratory syncytial virus (RSV) in infants hospitalized for acute lower respiratory tract disease: incidence and associated risks. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 5, p.357-61, 2006.

RIXON, H.W.; BROW, G.; McDONAL, 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, n. 5, p. 1153-1165, 2004.

ROCA, A.; LOSCERTALES, M.; QUINTÓ, L.; PÉREZ-BREÑA, P.; VAZ, N.; ALONSO, P.L.; SAIZ, J.C. Genetic variability among group A and B respiratory syncytial virus in Mozambique: Identification of a new cluster of group B isolates. **J. Gen. Virol.**, v. 82, n. 1, p. 103-111, 2001.

RODRIGUES, O. G.; ROZOV, T.; SILVA, E. M. K.; KOPELMAN, B. I. Infecções virais em crianças portadoras de doenças respiratória aguda, atendidas em um centro de saúde escola, em Belém, Pará, Brasil. **Pediatria (São Paulo)**, v. 26, n. 1, p. 13-20, 2004.

ROVIDA, F.; PERCIVALLE, E.; ZAVATTONI, M.; TORSELLINI, M.; SARASINI, A.; CAMPANINI, G.; PAOLUCCI, S.; BALDANTI, F.; 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, n. 2, p. 336-347, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**, 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANDE, M.A.; VAN DER, G.T.; SANNEH, M.; WHITTLE, H.C.; WEBER, M.W. Seasonal variation in respiratory syncytial virus epidemics in the Gambia, West Africa. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 23, n. 1, p. 73-4, 2004.

SANZ, M. C.; KEW, O. M.; ANDERSON, L. J. Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein among group A respiratory syncytial viruses. **Virus Research**, v. 33, n. 3, p. 203-217, 1994.

SARMIENTO, R.E.; TIRADO, R.; GÓMEZ, B. Characteristics of a respiratory syncytial virus persistently infected macrophage-like culture. **Virus Research**, v. 84, n.1-2, p. 45-58, 2002.

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, 2005.

SCHLENDER, J.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; CONZELMANN, K.K. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. **J. Virol.**, v. 77, n. 8, p. 4609-4616, 2003.

SCOTT, P.D.; OCHOLA, R.; NGAMA, M.; OKIRO, E.A.; NOKES, D.J.; MEDLEY, G.F.; CANE, P.A. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilif District, Kenia. **J. Med. Virol.**, v. 74, n. 2, p. 344-354, 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 reinfections in infants from coastal Kenya. **J. Infect. Dis.**, v. 193, n. 1, p. 59-67, 2006.

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. Paediatr.**, v. 24, n. 3, p. 213-217, 2004.

SHAY, D.K.; HOLMAN, R.C.; ROOSEVELT, G.E.; CLARKE, M.J.; ANDERSON, L.J. Bronchiolitis associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus – associated deaths among US children 1979-1997. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 1, p. 16-22, 2001.

SHEK, L. P. C.; LEE, B. W. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. **Paediatr. Respir. Rev.**, v. 4, n. 2 p. 105-111, 2003.

SILVA, R. E. C. F. **Contribuição ao estudo epidemiológico do vírus sincicial respiratório na região metropolitana de Vitória – ES – Brasil.** 1999. Dissertação (Mestrado) – Núcleo de Doenças Infecciosas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 1999.

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, n. 3, p. 557-559, 1991.

SOUZA, L.S.; RAMOS, E.A.; CARVALHO, F.M.; GUEDES, V.M.; SOUZA, L.S., ROCHA, C.M.; SOARES, A.B.; VELLOSO, L.D.E.F.; MACEDO, I.S.; MOURA, F.E.; SIQUEIRA, M.; FORTES, S.; DE JESUS, C.C.; SANTIAGO, C.M.; CARVALHO, A.M.; ARRUDA, E. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. **Pediatr. Pulmonol.**, v. 35, n. 3, p. 184-91, 2003.

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

STRALIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MACHADO, V.; MARIA, T. M. R. Respiratory viruses in the pediatric intensive care unit: prevalence and clinical aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 883-887, 2004.

STRALIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MULLER, R. L.; FISCHER, G. B.; CUNHA, M. L. T.; NESTOR, S. M. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 4, p. 283-291, 2002.

STRALIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MULLER, R. L.; FISCHER, G. B., TECHAARPORNKUL, S.; BARRETO, N.; PEEPLES, M.E. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. **J. Virol.**, v. 75, n. 15, p. 6825-6834, 2001.

SUDBRACK, S.; PONZI, D.; MASSUCO, L.; CORAL, S.; STEIN, R.T.; PITREZ, P.M.C. Prevalence of respiratory syncytial virus in infants with acute bronchiolitis and recurrent wheezing in an emergency room in south Brazil. **Scientia Medica**, v. 17, n. 3, p. 134-139, 2007.

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

SULLENDER, W. M.; MUFSON, M. A.; PRINCE, G. A.; ANDERSON, L. J.; WERTZ, G. W. Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins of group A respiratory syncytial viruses that have caused repeat infections in children. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 4, p. 925-932, 1998.

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

SWOFFORD, D. L. PAUPI*. **Phylogenetic analysis using parsimony (*and others methods)**. 4. ed. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, 1998.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of base nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 39, p. 512-526, 1993.

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, n. 23, p. 11328-11335, 2001.

THE IMPACT RSV STUDY GROUP. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. **Pediatrics**, v. 102, n. 3, p. 531-537, 1998.

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

THOMAZELLI, L.M.; VIEIRA, S.; LEAL, A.L.; SOUSA, T.S.; OLIVEIRA, D.B.; GOLONO, M.A.; GILLIO, A.E.; STWIEN, K.E.; ERDMAN, D.D.; DURIGON, E.L. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. **J. Pediatr.**, v. 83, n. 5, p. 422-428, 2007.

THORBURN, K.; KERR, S.; TAYLOR, N.; VAN SAENE, H. K. F. RSV outbreak in a paediatric intensive care unit. **J. Hosp. Infect.**, v. 57, n. 3, p. 194-201, 2004.

TRENTO, A., M.; GALIANO, C.; VIDELA, C.; CARBALLAL, G.; GARCIA-BARRENO, M.; MELERO, J.A.; PALOMO, C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. **J. Gen. Virol.** v. 84, n. 11, 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. 975-84, 2006.

TRISTRAM, D.A.; WELLIVER, R.C. Respiratory syncytial virus. In: **Diagnostic Procedure for viral, rickettsial and chlamydial infections**. American Public Association, 7. ed. Washington: American Public Health., p. 539-552, 1996.

TSAI, H. P.; KUO, P. H.; LIU, C. C.; WANG, J. R. Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 111-118, 2001.

TSUCHIYA, L. R. R. V.; COSTA, L. M. D.; RABONI, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; PEREIRA, L. A.; ROTTA, I.; TAKAHASHI, G. R. A.; COELHO, M.; SIQUEIRA, M. M. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. **J. Infect.**, v. 51, n. 5, p. 401-407, 2005.

VALDÉS, O.; MARTÍNEZ, I.; VALDIVIA, A.; CANCIO, R.; SAVÓN, C.; GOYENECHEA, A.; MELERO, J.A. Unusual antigenic and genetic characteristics of human respiratory syncytial viruses isolated in Cuba. **J. Virol.**, v. 72, n. 9, p. 7589-7592, 1998.

VAN ELDEN, L.J.; VAN KRAAIJ, M.G.; NIJHUIS, M.; HENDRIKSEN, K.A.; DEKKER, A.W.; ROZENBERG-ARSKA, M.; VAN LOON, A.M. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, n. 2, p.177-183, 2002.

VARGA, S.M.; WANG, X.; WELSH, R.M.; BRACIALE, T.J. Immunopathology in RSV infection is mediated by a discrete oligoclonal subset of antigen-specific CD4(+) T cells. **Immunity**, v. 15, n. 4, p. 637–646, 2001.

VENTER, M.; MADHI, S.A.; TIEMESSEN, C. T.; SCHOUB, B. D. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. **J. Gen. Virol.** v. 82, n. 9, p. 2117–2124, 2001.

VIEGAS, M.; BARRERO, P.R.; MAFFEY, A.F.; MISTCHENKO, A.S. Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina: a five-year analysis. **J. Infect.**, v. 49, n. 3, p. 222-228, 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, n. 2, 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.
- VIEIRA, S.E.; GILIO, A.E.; DURIGON, E.L.; EJZENBERG, B. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus in infants: the role played by specific antibodies. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 709-716, 2007.
- WAHAB, A.A.; DAWOD, S.T.; RAMAN, H.M. Clinical characteristics of respiratory syncytial virus infection in hospitalized healthy infants and young children in Qatar. **J. Trop. Pediatr.**, v. 47, n. 6, 363-366, 2001.
- WALSH, E.E.; FALSEY, A.R.; SWINBURNE, I.A.; FORMICA, M.A. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults: use of a single-tube "hanging droplet" nested PCR. **J. Med. Virol.**, v. 63, n. 3, p. 259-263, 2001.
- WARIS, M.; MEURMAN, O.; MUFSON, M.A.; RUUSKANEN, O.; HALONEN, P. Shedding of infectious virus and virus antigen during acute infection with respiratory syncytial virus. **J. Med. Virol.**, v. 38, n. 2, p. 111-116, 1992.
- WEINBERG, G.A.; ERDMAN, D.D.; EDWARDS, K.M.; HALL, C.B.; WALKER, F.J.; GRIFFIN, M.R.; SCHWARTZ, B.; NEW VACCINE SURVEILLANCE 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, n. 4 p. 706-710, 2004.
- WELLIVER, R. The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 10, supl. 1, p. 6-8, 2009.
- WERTZ, G.W.; COLLINS, P.L.; HUANG, Y.; GRUBER, C.; LEVINE, S.; BALL, L.A. 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, n.12, p. 4075-4079, 1985.
- WILSON, S.D.; ROBERTS, K.; HAMMOND, K.; AYRES, J.G.; CANE, P.A. Estimation of incidence of respiratory syncytial virus infection in schoolchildren using salivary antibodies. **J. Med. Virol.**, v. 61, n. 1, p. 81-84, 2000.
- YANG, Z. **PALM** v. 13. Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood. Department of Integrative Biology, University of California at Berkeley, 1997.
- YUSUF, S.; PIEDIMONTE, G.; AUAIS, A.; DEMMLER, G.; KRISHNAN, S.; VAN CAESELE, P.; SINGLETON, R.; BROOR, S.; PARVEEN, S.; AVEDAÑO, L.; PARRA, J.; CHAVEZ-BUENO, S.; MURGUÍA, T.; WELLIVER, R. The relationship of meteorological

conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus. **Epidemiol. Infect.**, v. 135, n. 7, p. 1077-1090, 2007.

ZAMBON, M.C.; STOCKTON, J. D.; CLEWLEY, J.P.; FLEMING, D.M. Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. **The Lancet**, v. 358, n. 9291, p. 1410-1416, 2001.

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

ZLATEVA, K.T.; LEMEY, P.; VANDAME, 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. 74, n. 9, p. 4683-5675, 2004.

ZLATEVA, K. T.; LEMEY, P.; MOËS, E.; VANDAMME, A.; RANST, M. V. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. **J. Virol.**, v. 79, n. 14, p. 9157-9167, 2005.

ZLATEVA, K. T.; VIJGEN, L.; DEKEERSMAEKER, N.; NARANJO, C.; VAN RANST, M. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 9, p. 3022-3030, 2007.

ANEXOS

Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Perfil Epidemiológico das Infecções Por Vírus Sincicial Respiratório Humano em Crianças Atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin.

Estamos fazendo uma pesquisa para conhecer as características das viroses respiratórias em crianças com doenças respiratórias agudas (gripe, bronquite, pneumonia ou outras doenças semelhantes), atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin. Essas viroses causam, todos os anos, doenças em um grande número de crianças e adultos, e esta pesquisa busca saber mais sobre essas doenças, para tentar ajudar nas medidas de controle, como vacinações ou tratamentos. Para isso, estamos pedindo sua colaboração.

Neste estudo, colhemos o material para exame pela aspiração de uma pequena quantidade de secreção através das narinas da criança. Além disso, preenchemos uma ficha com as informações dadas pela mãe ou pelo responsável pela criança, e pelo médico que a atendeu. A mãe ou responsável fica na sala durante a coleta. Esse procedimento geralmente não dói, mas pode causar desconforto à criança, e ela pode chorar durante a coleta. Raramente, pode ocorrer aspiração de secreção com sangue por pequeno trauma (machucado) na mucosa nasal. O responsável pela criança ou o médico que a atendeu poderão ter acesso ao resultado do exame.

Em caso de dúvida ou solicitação do resultado, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com Anne Carolinne Bezerra Perdigão, telefone nº 86071332, ou 3366-8303.

Esclarecemos que a participação neste estudo é voluntária (ninguém é obrigado a participar), e que a pessoa pode desistir de participar a qualquer momento, sem prejudicar o atendimento no hospital. As informações obtidas na pesquisa são confidenciais e só serão divulgadas em eventos e publicações científicas da área da saúde, sem dizer o nome dos pacientes.

Eu, _____, declaro que, após ter sido esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em deixar o menor de idade _____ participar deste protocolo de pesquisa, sendo eu o seu responsável legal.

Fortaleza, _____ de _____ de 200____

Assinatura do Responsável pela Criança

Pesquisadora: Anne Carolinne Bezerra Perdigão – Rua Acapulco, 140, Itapery

Tel.: 34917785– End. Eletrônico: krolbio@hotmail.com

Orientadora: Dra. Fernanda Edna Araújo Moura –Tel. 41412487

End. Eletrônico: fernandaedna@terra.com.br

(1ª Via – Pesquisador; 2ª Via – Paciente)

Anexo II – Ficha Epidemiológica

Projeto: Perfil Epidemiológico das Infecções Respiratórias Agudas Causadas Vírus Sincicial Respiratório Humano em Crianças Atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin

DADOS PESSOAIS

Nome do Paciente: _____
 Bairro: _____ Telefone: _____ Pessoa p/ Contato: _____
 Data de nascimento: _____ Idade: _____ Sexo: ()Feminino ()Masculino
 Local de atendimento: ()Ambulatório () Emergência () Observação () Enfermaria
 Prontuário: _____ Leito: _____ Bloco: _____

HISTÓRICO DO PACIENTE

Não Mamou () Mamou < 6 Meses () Mamou > 6 meses () Ainda Mama ()
 Vacinação: Em Dia () Atrasada ()
 1ª Vez que Cansa: Sim () Não () Idade em que Cansou pela 1ª vez: _____
 Internação Anterior por Problema Respiratório: Sim () Não () Nº de vezes _____
 A criança está faltando aula pela doença atual? Sim () Não () Nº de dias _____
 Ausência no trabalho pela doença atual? Sim () Não () Nº de dias _____
 Doenças Associadas: Sim () Não () Qual _____

HISTÓRICO FAMILIAR

História de Cansaço na Família: () Sim () Não Identificar parentesco: _____
 Outro Familiar com IRA: Sim () Não () Quantas: _____

EXAME FÍSICO E ASPECTOS CLÍNICOS

Peso: _____ Temperatura: _____ FR: _____

Queixa Principal: _____

Tempo de Início dos Sintomas: _____

Coriza () Obstrução Nasal () Espirros () Tosse () Dor de garganta ()
 Febre () Dor no corpo () Rouquidão () Anorexia () Vômitos () Diarréia ()
 Convulsões () Estridor () Exantema () Conjuntivite () Dor de ouvido ()
 Cianose () Batimento da asa do nariz () Dispnéia ()
 Ausculta Pulmonar: Roncos () Sibilos () Estertores () Normal () Não realizada ()
 Tiragem Intercostal () Tiragem Supraesternal / subcostal ()
 Orofaringe: () Não examinada () Normal () Hiperemia () Hipertrofia de amígdalas ()
 Pontos purulentos na orofaringe () Vesículas

Raio X do tórax: Sim () Não ()

() Normal () Condensação () Infiltrado intersticial () Hiperinsuflação

Outros: _____

TRATAMENTO INSTITUÍDO PELO MÉDICO

Antitérmico () Antibiótico () Aerossol () Salbutamol () Corticóide () Sol. fisiológica nasal () Cateter de O₂ () Oxi-Hood () Ventilação Mecânica ()
 Adrenalina () Fisioterapia respiratória ()

Outros: _____

Criança encaminhada para internamento em outro hospital: () Sim () Não

Prescrição de medicação para tratamento em casa: () Sim () Não

Data de admissão: _____ **Data da alta:** _____ **Dias de internação:** _____

Hipótese diagnóstica: _____

Diagnóstico na folha da alta hospitalar: _____

Óbito: () Sim () Não

Anexo III – Número de acesso ao *GenBank* das amostras utilizadas para comparação e realização das análises filogenéticas do VSRh.

Grupo A

Amostra	Número de Acesso
Long	M17212
BE-369-90	AY343659
BE-191-90	AY343659
BE-138-90	AY343658
BE-8078-92	AY343657
BE-119-87	AY343656
BE-307-87	AY343655
BE-3785-87	AY343654
BE-305-89	AY343653
BE-6460-91	AY343652
BE-1440-92	AY343651
Mon1-87	Z33421
Mon-9-91	Z33431
Mon-7-91	Z33429
Mon-9-92	Z33432
Mon/8/92	Z33430
Mon-1-92	Z33423
Mad-1-89	Z33412
Mad-3-89	Z33415
Mad-4-90	Z33416
Ken/4/03	AY660679
Ken/16/03	AY660678
Ken/5/03	AY660677
Ken/19/03	AY660676
Ken/260/02	AY660675
Ken/44/03	AY660674
Ken/43/03	AY660673
Ken/262/02	AY660672
Ken/56/03	AY660671
Zhejiang/04/004	AY728170
Zhejiang/04/003	AY728169
Zhejiang/04/002	AY728168
Zhejiang/04/001	AY728167
sal/54/99	AY472102
sal/74/99	AY472097
sal/108/99	AY472096
sal/81/99	AY472095
sal/173/99	AY472094
sal/82/99	AY472093
sal/138/99	AY472092
Sal/154/99	AY472091
Sal/151/99	AY472090
sal/136/99	AY472089
sal/149/99	AY472088

sal/140/99	AY472087
sal/87/99	AY472086
CH28	AF065256
CH17	AF065255
CH09	AF065254
TX69564	AF233923
TX69343	AF233922
TX68532	AF233921
TX68841	AF233920
TX67951	AF233919
NY20	AF233918
NY108	AF233917
NY103	AF233916
MO55	AF233915
MO48	AF233914
MO16	AF233913
MO15	AF233912
Beijing/A/04/02	DQ289601.1
Beijing/A/04/01	DQ289600.1
Beijing/A/01/10	DQ289599.1
Beijing/A/01/05	DQ289598.1
Beijing/A/01/01	DQ289597.1
BA/6122/01	AY667096
BA/6091/01	AY667095
BA/5952/01	AY667094
BA/5948/01	AY667093
BA/5081/00	AY667092
BA/5066/00	AY667091
BA/5049/00	AY667090
BA/5046/00	AY667089
BA/5017/00	AY667088
ARG1711-02	AY910810
ARG1692-02	AY910809
ARG1628-02	AY910808
ARG1541-02	AY910807
ARG1296-02	AY910806
ARG1141-02	AY910805
ARG958-02	AY910804
ARG753-02	AY910803
ARG180-02	AY910802

Grupo B

Amostra	Número de Acesso
CH 18537	M17213
NG-062-03	AB175823
NG-016-02	AB175822
NG-153-03	AB175821
Ken/2/03	AY660684
Ken/23/03	AY660683
Ken/12/03	AY660682
Ken/29/03	AY660681
Ken/253/02	AY660680
Ken/9/00	AY524578

Ken/1/00	AY524577
Ken/4/00	AY660576
Ken/2/00	AY524575
Ken/1/99	AY524574
Ken/109/02	AY524573
Ken/259/00	AY773291
Ken/13/03	AY773292
Sal/122-99	AY472098
sal/83/99	AY472101
sal/141/99	AY472100
sal/84/99	AY472099
S0004	AB117522
VG72S01	AY226537
V2004K01	AY226536
V0041KS01	AY226535
G36S01	AY226534
193KS01	AY226533
1802737S01	AY226532
0227KS01	AY226531
0219KS01	AY226530
0216KS01	AY226529
0140KS01	AY226528
0137KS01	AY226527
0112KS01	AY226526
0072S01	AY226525
0064S01	AY226524
G31S01	AY226523
G19S01	AY226522
G94S01	AY226521
G7S01	AY226520
G102S1	AY226519
Ab3062C01	AY146444
Ab3064C01	AY146443
Ab5075P01	AY146442
Ab5078P01	AY146441
Ab27CT00	AY146440
Ab41CT00	AY146439
Ab17BL00	AY146438
SA98D1656	AF348826
SA0025	AF348825
SA98V602	AF348824
SA99V439	AF348823
SA99V1325	AF348822
SA99V800	AF348821
SA98V220	AF348820
SA98D941	AF348819
SA98V268	AF348818
SA97D934	AF348817
CH10b	AF065250
CH93-9b	AF065251
CH93-18b	AF065252
CH93-53b	AF065253
TX69208	AF233933
NY97	AF233932
NY01	AF233931
MO53	AF233930
MO35	AF233929

MO30	AF233928
CN3521	AF233927
CN1839	AF233926
BE/400/91	AY751275
BE/45/91	AY751274
BE/66/91	AY751273
BE/12308/96	AY751272
BE/12160/02	AY751271
BE/12031/99	AY751270
BE/975/02	AY751269
BE/11754/00	AY751268
BE/12228/98	AY751246
BE/14364/98	AY751245
BE/11712/93	AY751244
BE/7374/92	AY751243
BE/283/00	AY751242
BE/12252/96	AY751241
BE/12624/96	AY751240
BE/11900/96	AY751239
BE/2098/00	AY751238
BE/618/00	AY751237
BE/522/93	AY751236
BE/12817/03	AY751091
BE/788/04	AY751090
BE/12973/03	AY751089
BE/13058/03	AY751088
BE/13457/03	AY751087
BE/920/03	AY751086
BE/920/03	AY751085
BE/12358/02	AY751084
Moz/204/99	AF309684
Moz/267/99	AF309683
Moz/46/99	AF309682
Moz/26/99	AF309681
Moz/197/99	AF309680
Moz/211/99	AF309679
QUE/50/02-03	AY927404
QUE/43/02-03	AY927403
QUE/29/01-02	AY927402
QUE/18/02-03	AY927401
BeijingB/04/11	DQ289649
Beijing/B/04/66	DQ289648
BA/1526/04	DQ227408
BA/493/04	DQ227407
BA/354/04	DQ227406
BA/5021/03	DQ227405
BA/4909/03	DQ227404
BA/4852/03	DQ227403
BA/4830/03	DQ227402
BA/4825/03	DQ227401
BA/693/03	DQ227400
BA/1326/99	DQ227398
BA/1607/04	DQ227397
BA/524/04	DQ227396
BA/100/04	DQ227395
BA/6564/03	DQ227394
BA/5140/03	DQ227393

	80	90	100	110	120	130	140
Consenso	CCATCAACACCACCAAAACAAACATCAGAACTACACTGCTCACCTCCAACACCACAGGAAATCCAGAACA						
LONG			C		AA		A T
BR_CE_111_2005	T	C			AA GT	G	T
BR_CE_123_2006	T	C			AA GT		T
BR_CE_127_2004	T T	C		T	AA GT		
BR_CE_127_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_130_2006	T T	C		T	AA GT		
BR_CE_131_2005	T	C			AA GT	G	T
BR_CE_132_2005	G					T	
BR_CE_133_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_135_2006						T	A A
BR_CE_136_2004	T	C			AA GT		T
BR_CE_142_2006	T	C			AA GT		T
BR_CE_146_2007	T T	C		T	AA GT		
BR_CE_151_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_154_2005	T	C			AA GT	G	T
BR_CE_155_2006						T	A A
BR_CE_156_2004	T	C	CT		AA GT		T
BR_CE_159_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_161_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_161_2007	G					T	
BR_CE_166_2007	G					T	
BR_CE_167_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_178_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_178_2007	G						
BR_CE_181_2005	T	C			AA GT	G	T
BR_CE_185_2004			A			T	
BR_CE_194_2004			A			T	
BR_CE_196_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_198_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_205_2005	T	C	C		AA GT		
BR_CE_208_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_209_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_210_2008	G						
BR_CE_226_2008	G						
BR_CE_237_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_242_2005	T	C			AA GT	G	T
BR_CE_247_2007	G					T	
BR_CE_259_2007	T	C			AA GT		T
BR_CE_266_2007	T T	C		T	AA GT		
BR_CE_272_2005	T	C			AA GT		T
BR_CE_273_2006	T	C			AA GT		T
BR_CE_288_2004	T	C			AA G		C
BR_CE_295_2007	G		A			T	
BR_CE_307_2008	G						
BR_CE_325_2006	T T	C		T	AA GT		
BR_CE_326_2006	T	C			AA GT		T
BR_CE_333_2008	G						
BR_CE_339_2006						T	A A
BR_CE_341_2008	G						
BR_CE_347_2007	G					T	
BR_CE_357_2006	T	C			AA GT		T
BR_CE_369_2008	G					T	
BR_CE_373_2008	G						
BR_CE_403_2008	G						
BR_CE_74_2004	T T	C		T	AA GT		
BR_CE_77_2005			A	T		T	
BR_CE_81_2005		C	CA	C	AA G		T
BR_CE_82_2007	T T	C		T	AA GT		
BR_CE_98_2004	G					T	

	150	160	170	180	190	200	210
Consenso	CACAAGTCAAGAGGAAACCCCTCCACTCAACCACCTCCGAAGGCAATCCAAGCCCTTCACAAGTCTATACA						
LONGAT.....T.....T.....T.....T.....T.....CC.....						
BR_CE_111_2005G.....T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_123_2006T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_127_2004T.....TT.....CA.....A.....						
BR_CE_127_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_130_2006T.....TT.....CA.....A.....						
BR_CE_131_2005G.....T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_132_2005C.....T.....A.....						
BR_CE_133_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_135_2006A.....C.....C.....						
BR_CE_136_2004T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_142_2006T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_146_2007T.....TT.....CA.....A.....						
BR_CE_151_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_154_2005T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_155_2006A.....C.....C.....						
BR_CE_156_2004T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_159_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_161_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_161_2007C.....T.....A.....						
BR_CE_166_2007G.....T.....A.....						
BR_CE_167_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_178_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_178_2007A.....T.....A.....						
BR_CE_181_2005T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_185_2004A.....T.....C.....						
BR_CE_194_2004A.....T.....C.....						
BR_CE_196_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_198_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_205_2005T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_208_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_209_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_210_2008T.....T.....A.....						
BR_CE_226_2008T.....T.....A.....						
BR_CE_237_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_242_2005T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_247_2007TG.....T.....A.....						
BR_CE_259_2007T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_266_2007T.....TT.....CA.....A.....						
BR_CE_272_2005T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_273_2006T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_288_2004T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_295_2007G.....T.....A.....C.....						
BR_CE_307_2008T.....A.....C.....						
BR_CE_325_2006T.....TT.....CA.....A.....						
BR_CE_326_2006T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_333_2008T.....T.....A.....						
BR_CE_339_2006A.....C.....C.....						
BR_CE_341_2008T.....T.....A.....						
BR_CE_347_2007G.....T.....A.....C.....						
BR_CE_357_2006T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_369_2008G.....A.....T.....A.....						
BR_CE_373_2008T.....T.....A.....A.....						
BR_CE_403_2008T.....A.....A.....C.....						
BR_CE_74_2004T.....TT.....CA.....A.....						
BR_CE_77_2005A.....T.....C.T.....G.....						
BR_CE_81_2005T.....T.....CA.....A.....						
BR_CE_82_2007T.....TT.....CA.....A.....						
BR_CE_98_2004T.....A.....						

	220	230	240	250	260	270
Consenso	ACATCCGAGTACCTATCACAATCTCCATCTCCATCCAACACAACAAAATGGTAGTCATTA					
LONGC..C.....C.CT.....C.....CGCCA.....T....					
BR_CE_111_2005C.....C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_123_2006C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_127_2004C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_127_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_130_2006C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_131_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_132_2005T.....A.....					
BR_CE_133_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_135_2006T.....G.....					
BR_CE_136_2004C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_142_2006C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_146_2007C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_151_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_154_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_155_2006T.....G.....					
BR_CE_156_2004C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_159_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_161_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_161_2007T.....A.....					
BR_CE_166_2007T.....A.....					
BR_CE_167_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_178_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_178_2007T.....A.....					
BR_CE_181_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_185_2004T.....					
BR_CE_194_2004T.....					
BR_CE_196_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_198_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_205_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_208_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_209_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_210_2008T.....A.....					
BR_CE_226_2008T.....A.....					
BR_CE_237_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_242_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_247_2007T.....A.....					
BR_CE_259_2007C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_266_2007C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_272_2005T.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_273_2006C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_288_2004C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_295_2007T.....A.....					
BR_CE_307_2008T.....A.....					
BR_CE_325_2006C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_326_2006C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_333_2008T.....A.....					
BR_CE_339_2006T.....G.....					
BR_CE_341_2008T.....A.....					
BR_CE_347_2007T.....A.....					
BR_CE_357_2006C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_369_2008T.....A.....					
BR_CE_373_2008T.....A.....					
BR_CE_403_2008T.....A.....					
BR_CE_74_2004C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_77_2005T.....					
BR_CE_81_2005C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_82_2007C.....T.....G.CCA.....					
BR_CE_98_2004T.....A.....					

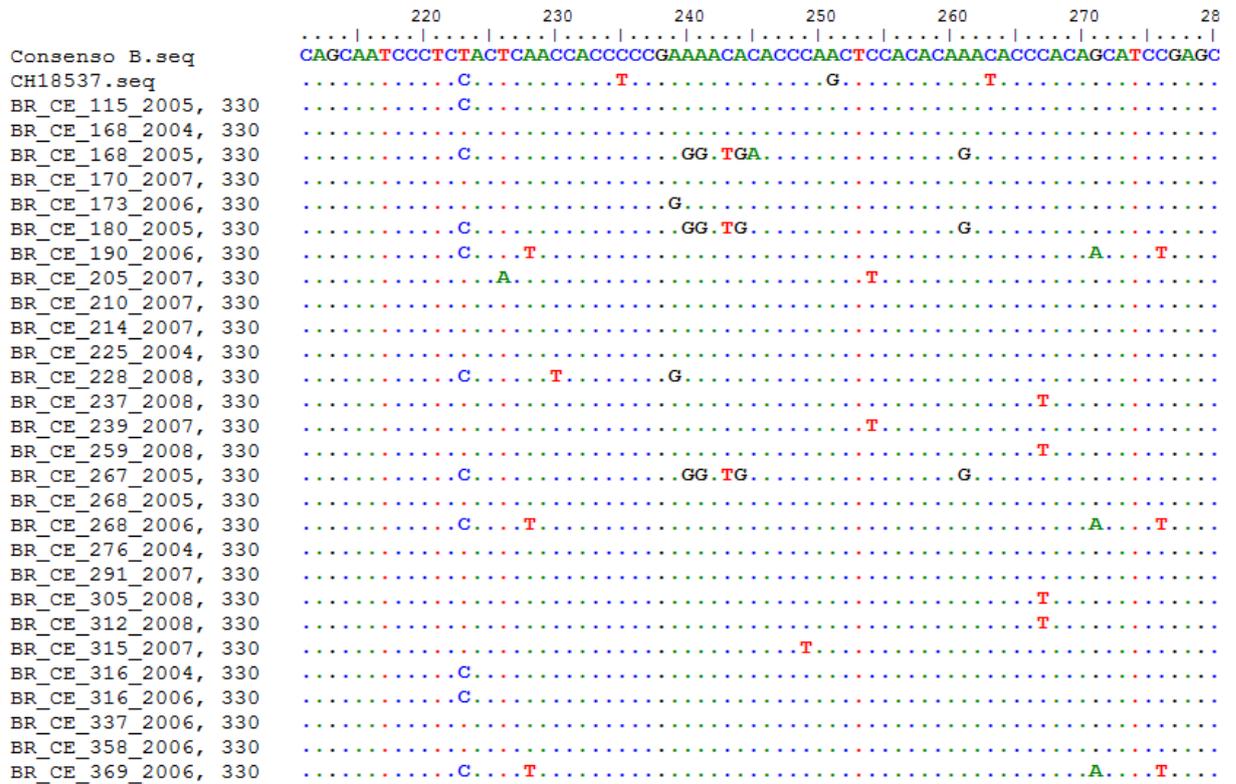
Anexo V – Alinhamento de nucleotídeos das seqüências de VSRh isoladas entre 2004 e 2008 pertencentes ao grupo B.

```

      10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Consenso B.seq AAAAGAGACCCAAAAACACTAGCCAAAAACCCGAAAAAAGAAACCACCATTAAACCCAACAAAAAACCAA
CH18537.seq .....C.....C.....TG..A.....T..T..CC.....G.....
BR_CE_115_2005, 330 .....C.....C.....TA.....CC.....
BR_CE_168_2004, 330 .....T.....C.....
BR_CE_168_2005, 330 .....C..A..C..T.....CC.....
BR_CE_170_2007, 330 .....C.....C.....
BR_CE_173_2006, 330 .....C.....C.....
BR_CE_180_2005, 330 .....C..A..C..T.....CC.....
BR_CE_190_2006, 330 .....A.....A.....T.....CC.....
BR_CE_205_2007, 330 .....C.....C.....
BR_CE_210_2007, 330 .....C.....C.....
BR_CE_214_2007, 330 .....C.....C.....
BR_CE_225_2004, 330 .....T.....C.....
BR_CE_228_2008, 330 .....T.....C.....
BR_CE_237_2008, 330 .....T.....C.....
BR_CE_239_2007, 330 .....T.....T.....C.....
BR_CE_259_2008, 330 .....C.....C.....
BR_CE_267_2005, 330 .....C..A..C..T.....CC.....
BR_CE_268_2005, 330 .....A.....C..A.....T.....CC.....
BR_CE_268_2006, 330 .....A.....C..A.....T.....CC.....
BR_CE_276_2004, 330 .....T.....C.....
BR_CE_291_2007, 330 .....A.....C.....
BR_CE_305_2008, 330 .....C.....C.....
BR_CE_312_2008, 330 .....C.....C.....
BR_CE_315_2007, 330 .....C.....C.....
BR_CE_316_2004, 330 .....C.....C.....
BR_CE_316_2006, 330 .....C.....C.....
BR_CE_337_2006, 330 .....T.....C.....
BR_CE_358_2006, 330 .....T.....C.....
BR_CE_369_2006, 330 .....A.....A.....T.....CC.....

      80      90      100      110      120      130      140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Consenso B.seq CCCCCAAGACCACAGAAAGAGACACCAGCACCCCAACAATCCACTGTGCTCGACACAACCACATCAAACA
CH18537.seq .....T.....TTT.....C.....T..TC.....T..
BR_CE_115_2005, 330 .....TT.....
BR_CE_168_2004, 330 .....T.....
BR_CE_168_2005, 330 .....TT.....
BR_CE_170_2007, 330 .....TT.....
BR_CE_173_2006, 330 .....TT.....
BR_CE_180_2005, 330 .....TT.....
BR_CE_190_2006, 330 .....T.....TT.....G.....
BR_CE_205_2007, 330 .....T.....
BR_CE_210_2007, 330 .....A.....G.....
BR_CE_214_2007, 330 .....G.....
BR_CE_225_2004, 330 .....T.....
BR_CE_228_2008, 330 .....C.....
BR_CE_237_2008, 330 .....C.....
BR_CE_239_2007, 330 .....C.....
BR_CE_259_2008, 330 .....TT.....
BR_CE_267_2005, 330 .....A.....TT.....G.....
BR_CE_268_2005, 330 .....T.....TT.....G.....
BR_CE_268_2006, 330 .....T.....TT.....G.....
BR_CE_276_2004, 330 .....T.....T.....
BR_CE_291_2007, 330 .....T.....
BR_CE_305_2008, 330 .....C.....
BR_CE_312_2008, 330 .....C.....
BR_CE_315_2007, 330 .....C.....
BR_CE_316_2004, 330 .....C.....
BR_CE_316_2006, 330 .....C.....
BR_CE_337_2006, 330 .....T.....C.....
BR_CE_358_2006, 330 .....T.....
BR_CE_369_2006, 330 .....T.....TT.....G.....

```



```

                290           300           310           320           330
    Consenso B.seq CCTCCACATCAAATTCCACCTAAAAACTCCAGTCATATGCTTAGTTATTT
    CH18537.seq     .....T.....C.T.AT.....AC.T.....C.....C
    BR_CE_115_2005, 330 .....C.....T.T.....C
    BR_CE_168_2004, 330 .....T.....C
    BR_CE_168_2005, 330 .....C.G..C.T.....C
    BR_CE_170_2007, 330 .....
    BR_CE_173_2006, 330 .....
    BR_CE_180_2005, 330 .....C.G..C.T.....C
    BR_CE_190_2006, 330 ...T.....C.G..C.T.....C
    BR_CE_205_2007, 330 .....
    BR_CE_210_2007, 330 .....
    BR_CE_214_2007, 330 .....C.....
    BR_CE_225_2004, 330 .....T.....C
    BR_CE_228_2008, 330 .....
    BR_CE_237_2008, 330 .....A.....
    BR_CE_239_2007, 330 .....
    BR_CE_259_2008, 330 .....
    BR_CE_267_2005, 330 .....C.G..C.T.....C
    BR_CE_268_2005, 330 .....
    BR_CE_268_2006, 330 ...T.....C.G..C.T.....C
    BR_CE_276_2004, 330 .....
    BR_CE_291_2007, 330 .....
    BR_CE_305_2008, 330 .....
    BR_CE_312_2008, 330 .....
    BR_CE_315_2007, 330 .....C.....C.....
    BR_CE_316_2004, 330 .....C.....
    BR_CE_316_2006, 330 .....C.....
    BR_CE_337_2006, 330 .....C.....
    BR_CE_358_2006, 330 .....T.....
    BR_CE_369_2006, 330 ...T.....C.G..C.T.....C

```

Anexo VI – Alinhamento de aminoácidos das seqüências de VSRh isoladas entre 2004 e 2008 pertencentes ao grupo A.

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
Consenso  KKDKPKQTTKPKKEVLTTKPTKEKPTINTTKTNIRTTLLTSNTTGNPEHTSQEETLHSTTSEGNPSPSQVITTS EYLSQSPSPSNTTKWSL
LONG      L.....P.....E.....T.....N.....KL...M..F...S...L.....S...HP..PS..P...RQL.
BR_CE_111_2005 L.....AP.....I.P.....NS...L...G.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_123_2006 L.....AP.....I.P.....NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_127_2004 L...K...AP...D...I.P...F.NS...L...F...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_127_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_130_2006 L...K...AP...D...I.P...F.NS...L...F...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_131_2005 L.....AP.....I.P.....NS...L...G...S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_132_2005 L.....D...Y.....P...S.....L.....S.....-
BR_CE_133_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_135_2006 L.....A.....I.E.Q...K.....L...R...
BR_CE_136_2004 L.....AP.....I.P.....NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_142_2006 L.....AP.....I.P.....NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_146_2007 L...K...AP...D...I.P...F.NS...L...F...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_151_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_154_2005 L.....AP.....I.P.....NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_155_2006 L.....A.....I.E.Q...K.....L...R...
BR_CE_156_2004 L.....AP.....I.P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_159_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_161_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_161_2007 L.....D...Y.....P...L.....S.....-
BR_CE_166_2007 L.....D...Y.....L.....S.....-
BR_CE_167_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_178_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_178_2007 L.....D...Q.....L.....S.....-
BR_CE_181_2005 L.....AP.....I.P.....NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_185_2004 L.....K.....K..Y..P.....L...
BR_CE_194_2004 L.....K.....K..Y..P.....L...
BR_CE_196_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_198_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_205_2005 L.....AP.....I.P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_208_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_209_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_210_2008 L.....R.....D.....L.....S.....-
BR_CE_226_2008 L.....R.....D.....L.....S.....-
BR_CE_237_2005 L.....R...APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_242_2005 L.....AP.....I.P.....NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_247_2007 L.....D...Y.....M.....L.....S.....-
BR_CE_259_2007 L.....AP.....I.P.....NS...L...M...S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_266_2007 L...K...AP...D...I.P...F.NS...L...F...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_272_2005 L.....AP.....I.P.....NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_273_2006 L.....AP.....I.P.....NS...L...D...S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_288_2004 L.....AP.....I.P.....NS...D...S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_295_2007 L.....D...K...Y.....L...H...S.....-
BR_CE_307_2008 L.....D.....L.....S.....-
BR_CE_325_2006 L...K...AP...D...I.P...F.NS...L...F...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_326_2006 L.....AP.....I.P.....NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_333_2008 L.....R.....D.....I.E.Q...K.....L...S.....R...
BR_CE_339_2006 L.....A.....I.E.Q...K.....L...S.....R...
BR_CE_341_2008 L.....R.....D.....Y.....L...H...S.....-
BR_CE_347_2007 L.....D...Y.....L...H...S.....-
BR_CE_357_2006 L.....AP.P...I.P...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_369_2008 L.....R.....D...D...Y...K...L...S.....-
BR_CE_373_2008 L.....R.....S...D.....LN...S.....-
BR_CE_403_2008 L.....D.....L.....S.....-
BR_CE_74_2004 L...K...AP...D...I.P...F.NS...L...F...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_77_2005 L.....K.....K..Y..P.....L...
BR_CE_81_2005 L.....APS...D...P.T...NS...L...S.....S...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_82_2007 L...K...AP...D...I.P...F.NS...L...F...T...I.....P.....I.DQ..
BR_CE_98_2004 L.....D...Y.....L.....S.....-

```

Anexo VII – Alinhamento de aminoácido das seqüências de VSRh isoladas entre 2004 e 2008 pertencentes ao grupo B.

```

          10      20      30      40      50      60      70
Consenso_B  KRDPKTLAKTPKKEETTINPTKKPTPKTTERDSTSPQSTVLDTTTTSKHTERDSTSTSQSIALDTTTTSKHTIQ
CH18537      .....P.M.....IIT.A...L.....IS.....I.P.Y.
BR_CE_115_2005 .....L.....T.....L.....
BR_CE_268_2006 ..Q.P..L...T.....M.....S.....E.....
BR_CE_168_2005 .....P.PL...T.....S.....
BR_CE_180_2005 .....P.PL...T.....S.....
BR_CE_190_2006 ..Q.....L...T.....M.....S.....E.....
BR_CE_168_2004 .....L.....V.....
BR_CE_170_2007 .....G.....
BR_CE_173_2006 .....P.....V.....
BR_CE_205_2007 .....L.....L.....
BR_CE_210_2007 .....A.....
BR_CE_214_2007 .....A.....
BR_CE_228_2008 .....D.....V.....
BR_CE_237_2008 .....V.....L.....
BR_CE_239_2007 .....V.....Y.....Y.....
BR_CE_291_2007 .....P.....P.T.P.....
BR_CE_316_2004 .....A.....
BR_CE_337_2006 .....P.....
BR_CE_358_2006 .....P.....
BR_CE_315_2007 .....P.....
BR_CE_312_2008 .....P.....

          80      90      100     110
Consenso_B  QQSLYSTTPENTPNSTQTPASEPSTSNST.KLQSYA.LF
CH18537      ...H...S...S...I.....L.PN.T.H...
BR_CE_115_2005 ...H.....Q.F.....
BR_CE_268_2006 ...H.....T...F...QEP.....
BR_CE_168_2005 ...H.....DE.....QEP.....
BR_CE_180_2005 ...H.....DA.....QEP.....
BR_CE_190_2006 ...H.....T...F...QEP.....
BR_CE_168_2004 .....
BR_CE_170_2007 .....
BR_CE_173_2006 .....G.....
BR_CE_205_2007 ...T.....F.....
BR_CE_210_2007 .....Q.....
BR_CE_214_2007 .....
BR_CE_228_2008 ...H.I.G.....
BR_CE_237_2008 .....
BR_CE_239_2007 .....F.....
BR_CE_291_2007 .....
BR_CE_316_2004 ...H.....Q.....
BR_CE_337_2006 .....
BR_CE_358_2006 .....L.....
BR_CE_315_2007 .....Q.....
BR_CE_312_2008 .....

```

Artigos

Artigo Publicado

**Seasonality of Influenza in the Tropics: A Distinct Pattern
Northeasters Brasil**

American Journal of Tropical Medicine Hygiene

Artigo Submetido

**Respiratory syncytial virus surveillance in a public pediatric hospital
in Fortaleza, Ceará.**

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

----- Original Message -----

From: "Memorias do Instituto Oswaldo Cruz" memorias.online@ioc.fiocruz.br

To: "Fernanda Edna Araújo Moura" fernandaedna@terra.com.br

Cc:

Sent: Ter 1/09/09 20:30

Subject: Fwd: [MIOC] Submission Acknowledgement

Dr.(a)Fernanda Edna Araújo Moura:

Manuscript: "Respiratory syncytial virus surveillance in a public pediatric hospital in Fortaleza, Ceará."

Thank you for your above-mentioned manuscript which you kindly submitted for publication in the Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.

The manuscript will be sent to the Editorial Board for review. We will contact you again as soon as we receive the reviewer's comments.

With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:

<http://submission.scielo.br/index.php/mioc/author/submission/18063>

Username: fernandaedna

Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Sincerely Yours,

Ricardo Lourenco de Oliveira
Editor

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz

<http://memorias.ioc.fiocruz.br>

Esta mensagem foi verificada pelo E-mail Protegido Terra.

Atualizado em 01/09/2009

**Respiratory syncytial virus surveillance in a public pediatric hospital in Fortaleza,
Ceará.**

Fernanda EA Moura/ ⁺, Anne CB Perdigão*, Mariana R Onofre, Cibele BM Carvalho*

Laboratório de Virologia, Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade
Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil *Programa de Pós-Graduação Mestrado em
Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal
do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Corresponding author⁺: fernandaedna@terra.com.br , fax number: 55-85-33668303

ABSTRACT

In this study RSV activity was reviewed by analysing of data collected during five years of active surveillance of viral respiratory infections in a cohort of children treated in a public hospital in Fortaleza. RSV infections were diagnosed using of indirect immunofluorescence on nasopharyngeal aspirates collected from children with acute respiratory infection. RSV was detected in 456 of 2885 samples collected. Local virology data showed a consistent pattern in the annual cycle of RSV associated with the rainy season throughout the observation period. The beginning and intensity of RSV activity varied in the surveillance years, but always ended in July.

Key words: respiratory syncytial virus- acute respiratory infections- surveillance- Brazil

INTRODUCTION

Acute respiratory infections (ARI) by viruses are a leading cause of morbidity and mortality in children worldwide. Respiratory syncytial virus (RSV) accounts for a substantial proportion of these infections (Rodriguez et al. 2007; Nokes et al. 2008; Pecchini et al. 2008; Tang et al. 2008; Di Carlo et al. 2009). However, there is no safe and effective vaccine to prevent infections caused by this agent. Specific treatment of RSV infections in high-risk children using the passive antibody therapy has been limited in developing countries such Brazil due to its cost (Weckx et al. 2009). The understanding of RSV epidemiology is crucial to the effective monthly application of available prophylactic drug during the RSV season.

RSV epidemics occur yearly during winter and early spring in temperate climates and during the rainy season in some tropical climates; elsewhere, the timing of RSV activity can vary widely (CDC 2006; Moura et al. 2006; Oliveira et al. 2008).

The aims of this study were: (1) to describe seasonal RSV activity in Fortaleza, (2) to analyze the variability in the onset, end and duration of epidemic periods for five consecutive years, and (3) to describe the eventual correlation between the activity of RSV and other viruses analyzed.

MATERIAL AND METHOS

This study reviewed data collected from an active surveillance of viral respiratory infections from January 2004 to December 2008. The patients included in this study were children and teenagers (0 to 16 years old) with acute respiratory symptoms, who were treated at the emergency department and pediatric wards of Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), a public and teaching hospital where care is provided to children from low income families living in Fortaleza and other cities in the state of Ceará. Patients were included in the study if they had one or more of the following symptoms with or without fever ($\geq 37.5^{\circ}$ C): cough, coryza, sore throat, earache, breathing difficulty, stridor and / or wheezing within seven days of onset. Demographic and clinical information was recorded in standardized data.

Nasopharyngeal aspirates were obtained from the patients, as describes previously (Moura et al. 2003). They were analyzed by indirect immunofluorescence assay performed using the Respiratory I Viral Screening and Identification kit (Chemicon International, Inc., Temucula, CA, USA) following the manufacturer's instructions, to detect antigens of the following respiratory viruses: PIV-1,2 and 3, RSV, Influenza A and B, and adenovirus. Samples collected since January 2006 to December 2008 were also tested for MPV by indirect immunofluorescence assay, as described previously (Ribeiro & Moura 2008).

RSV was considered to be actively present when there were $\geq 10\%$ positive RSV tests for a given week. The onset of the epidemic period was defined as the first of two consecutive weeks with at least 10% positive tests; the end of season was defined as the last week of at least 10% positive tests preceding two consecutive weeks of less than 10% positive tests (CDC 2006).

Descriptive statistics (mean, standard deviation, and the Student test were used for univariate analysis. Comparisons were performed using the Fisher exact test and Pearson's χ^2 for categorical variables. All p values were considered significant if ≤ 0.05 . Spearman's correlation test was used to correlate the total number RSV infections and other viral infections.

ETHICS

This study was approved by the Ethics Committee of HIAS (resolution 011/08). Parents or legal guardians provided signed informed consents for inclusion of children in the study.

RESULTS

A total of 2885 samples of nasopharyngeal aspirates were collected during the five-year study. An average of 11 samples was collected each week with a maximum of 39 NPA and a minimum of one NPA during the extended public holidays (Carnival, Easter and Christmas). A total of 887 viruses were detected in samples analyzed. Of these, 456 tested positive for RSV infection, which suggested an incidence rate of $\approx 15.8\%$. Table I summarises the results of the surveillance of viral ARI during the period of study. The viruses most

frequently detected in the study were RSV (15.8%), metapneumovirus (7.1%), influenza A (3.8%), parainfluenza 3 (3.4%), adenovirus (1.5%), parainfluenza 1 (0.7%), influenza B (0.4%), and parainfluenza 2 (0.1%). Coinfection with two kinds of virus was identified in 17 samples, 12 (70.5%) of them showed coinfection with RSV and other viruses.

Intense viral activity was seen during some of the RSV epidemic periods. About 37.8% of the total of other viruses detected during the entire period of study circulated during the RSV epidemic periods. There was intense variability in circulation of these viruses as shown in Table II. There was statistically significant association of RSV epidemics with circulation of influenza virus in 2004, 2006 and 2007 ($p < 0.0001$). Similar association between RSV and metapneumovirus occurred in 2006 and 2007 ($p < 0.0002$).

More than one peak of ARI was observed in all years of study, the first and major always occurring in association with rainy period ($p < 0.0001$). RSV epidemic periods occurred inside of this major peak of occurrence of ARI ($p < 0.0001$). In Figure 1 the noted statistically significant association between occurrence of the major peak of ARI, rainy season and RSV seasons ($p < 0.0001$) is clearly shown.

During the five-year study a considerable variation was noted in the number of RSV detected, at the onset and duration the RSV epidemic periods. The weekly distribution of RSV infections in the epidemic periods during the period of study is shown in Figure 2. No RSV cases were detected before the 3rd week or after the 30th week. There was a difference in the median of RSV infections during the five epidemic periods, with a maximum of 102 in 2004 and a minimum of 79 in 2006. In 2005 and 2007 RSV was actively present in the 13th and 6th week, respectively, although the RSV season was started only two (2005) and five (2007) weeks later. In the other years, the onset of RSV activity coincided with the RSV season. The onset, end and duration of each epidemic period are showed in Table III.

DISCUSSION

We used retrospective, population-based, laboratory-confirmed active surveillance to define precisely the RSV epidemic periods and the simultaneous circulation of other viruses. The assessment of the cohort revealed that RSV was the major pathogen accounting for 15.8% of the ARI and 51.4% of the total viral pathogens, according to some previous reports (Rodriguez et al. 2007; Di Carlo et al. 2009).

The definition of the RSV epidemic period used in this study follows the same criteria used in surveillance systems for RSV in the United States (CDC 2006). The presentation of these results using these criteria distinguishes this study from other Brazilians who show only a monthly distribution of cases of RSV and ARI. Thus the data presented here emphasize the regularity of the activity of RSV in Fortaleza, in addition to showing annual variations in the number of cases of infection in the onset and duration of each epidemic period, as shown in other studies (Light 2007; Boron et al 2008; Wilfret et al. 2008).

RSV infections were detected in a restricted period of each year, which the onset was variable but the end always occurred in July. The majority of the RSV infections occurred in the first half of each year. A significant number of RSV infections in the second half of the year was observed only in 2005, when 22 cases were detected in July. In fact, July was the month when the last cases of RSV infections were detected in all years of study. This finding disagrees of an early study that showed RSV circulation in Fortaleza in August in two years (Moura et al. 2006).

Our study confirms that the RSV seasons occur in association with the rainy season usually from March to June. This association, already demonstrated in another study, it is not observed in studies conducted in cities of the south and southeast of the country where the association is made with periods of lower temperatures (Moura et al. 2006; Tsuchiya et al. 2006; Ricetto et al. 2009; Nascimento et al. 1991). The seasonal regularity of RSV in Fortaleza differs from patterns exhibited in other Brazilian Southeast cities, in which RSV

activity has not coincided with the epidemic period (Checon et al. 2002; Oliveira et al. 2008; Pecchini et al. 2008). Other studies performed in places with a tropical climate have shown that RSV may occur in all months of the year, with a clear peak in restricted period of time, sometimes associated to rainy season or to other climatic factors such humidity and temperature (Omer et al. 2008; Rodriguez et al. 2007; Shek & Lee 2003).

A recent analysis of a novel system of surveillance of RSV in the United States revealed that the start time of epidemics, their duration and severity varied considerably from area to area and year to year (Boron et al. 2008). The unique characteristics of the RSV seasons in Florida have been used to investigate the standard US recommendations for RSV prophylaxis with palivizumab are appropriate in that state (CDC 2006; Bauman et al. 2007). The high costs for the use of palivizumab and lack of routine laboratory diagnosis to confirm the etiology of viral respiratory infections are factors that limit the use of palivizumab in Brazil (Weckx et al. 2009). However, one of the most important steps for use of palivizumab is the knowledge of the temporal pattern of activity of RSV. In Fortaleza, therefore, the regular pattern of occurrence of RSV has been well demonstrated, whether the results in this study or in a prior, which facilitates the adoption of a period for use of palivizumab in the prophylaxis of RSV infections in patients at risk (Moura et al. 2006).

The relatively high incidence of RSV infections reported here in association with an intense activity of other viruses, mainly metapneumovirus and influenza viruses provides further evidence of the contribution of RSV to ARI and of the significant burden that it may represent to health care systems.

There were two major limitations in our study. First, this retrospective study focused mainly on patients treated at emergency rooms (89%). Studies that analyze RSV infection incidence in hospitalized patients present higher detection rates of the virus. Second, this study only represents results of a tertiary hospital in Fortaleza. A comprehensive study

involving local clinics, primary care medical centers and regional hospitals will provide more details of RSV infections in Fortaleza.

RSV accounts for a substantial proportion of ARI in the study population. Characterization of the RSV season at the local level has important implications for appropriate decisions on the time period for administration of specific treatment.

REFERENCES

- Bauman J, Eggleston M, Oquist N, Malinoski F 2007. Respiratory syncytial virus: seasonal data for regions of Florida and its implications for palivizumab. *South Med J* 200: 669-676.
- Boron ML, Edelman L, Groothuis JR, Malinoski FJ 2008. A novel active respiratory syncytial virus surveillance system in the United States. Variability in the local and regional incidence of infection. *Pediatr Infect Dis J* 27: 1095-1098.
- Centers for Disease Control and Prevention 2006. Respiratory syncytial virus activity – United States, 2005-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55: 1277-1279.
- Checon RE, Siqueira MM, Lugon AK, Portes S, Dietze R 2002. Seasonal pattern of respiratory syncytial virus in a region with tropical climate in Southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 67: 490-491.
- Di Carlo P, Romano A, Salsa L, Gueli A, Poma A, Fuça F, Dones P, Collura M, Pampinella D, Motisi D, Corsello G 2009. Epidemiologic assessment of respiratory syncytial virus infection in hospitalized infants during the season 2005-2006 in Palermo, Italy. *Italian J Pediatrics* 35: 11-16.
- Light M 2007. Respiratory syncytial virus seasonality in southeast Florida: results from three area hospital caring for children. *Pediatr Infect Dis J* 26: S55-9.

Moura FEA, Borges LC, Portes SAR, Ramos EA, Siqueira MM 2003. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 739-743.

Moura FEA, Nunes IFS, Silva Jr GB, Siqueira MM 2006. Short report: Respiratory syncytial virus infections in Northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. *Am J Trop Med Hyg* 74: 165-167.

Nascimento JP, Siqueira MM, Suttmoller F, Krawczuk MM, de Farias V, Ferreira V, Rodrigues MJ 1991. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33: 287-296.

Nokes DJ, Okiro EA, Ngama M, Ochola R, White LJ, Scott PD, English M, Cane PA, Medley GF 2008. Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease in Infants and Young Children Studied from Birth in Kilifi District, Kenya. *Clin Infect Dis.*; 46: 50–57.

Oliveira TF, Freitas GR, Ribeiro LZ, Yokosawa J, Siqueira MM, Portes SA, Silveira MM, Calegari T, Costa LF, Mantese OC, Queiróz DA 2008. Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 103: 417-22.

Omer SB, Sutanto A, Sarwo H, Linehan M, Djelantik IG, Mercer D, Moniaga V, Moulton LH, Widjaya A, Muljati P, Gessner BD, Steinhoff MC 2008. Climatic, temporal, and geographic characteristics of respiratory syncytial virus disease in a tropical island population. *Epidemiol Infect.* 136:1319-27.

Pecchini R, Berezin EN, Felício MC, Passos SD, Souza MC, Lima LR, Ueda M, Matsumoto TK, Durigon EL 2008. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. *Braz J Infec Dis* 12: 476-9.

- Ribeiro JF, Moura FEA 2008. Detection of human metapneumovirus in nasopharyngeal aspirates of Brazilian children by immunofluorescence assay. *Virus Reviews & Research* 13: 1-15.
- Ricetto AG, Silva LH, Spilk FR, Morcillo AM, Arns CW, Baracat EC 2009. Genotypes and clinical data of respiratory syncytial virus and metapneumovirus in Brazilian infants: a new perspective. *Braz J Infect Dis* 13: 35-9.
- Rodriguez DHH, de la Hoz F, Mariño C, Ramirez E 2007. Respiratory virus in children aged less than 10 years old suffering from respiratory infection in the Hospital Militar Central in Bogota from 2000-2001. *Rev Salud Publica* 9: 576-587.
- Shek LP, Lee BW 2003. Epidemiology and seasonality of respiratory tract infections in the tropics. *Paediatric Respiratory Reviews* 4: 104-111.
- Tang LF, Wang TL, Tang HF, Chen ZM 2008. Viral Pathogens of Acute Lower Respiratory Tract Infection in China. *Indian Pediatrics* 45: 971-975.
- Tsuchiya LRRV, Costa LMD, Raboni SM, Nogueira MB, Pereira LA, Rotta I, Takahashi GRA, Coelho M, Siqueira MM, 2005. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infection* 51: 401-407.
- Weckx LY, Fernandes MM, Monteiro AI, Souza AR, Moraes-Pinto MI 2009. Optimization strategy to minimize wastage of Palivizumab during the 2008 RSV season in Sao Paulo, Brazil. *J Trop Pediatr* 55: 5-6.
- Wilfret DA, Baker BT, Palavecino E, Moran C, Benjamin DK Jr. 2008. Epidemiology of respiratory syncytial virus in various regions within North Carolina during multiple seasons. *N.C. Med. J* 69: 447-52.

Figure 1. Monthly occurrence of total acute respiratory infections, RSV infections and rainfall in Fortaleza, Brazil, from January 2004 to December 2008.

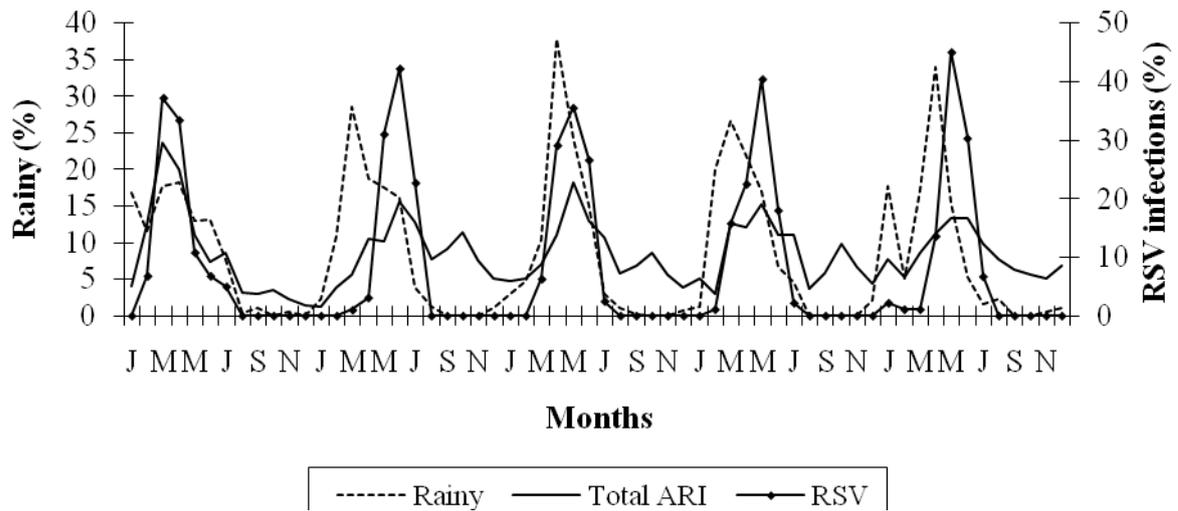


Figure 2. Weekly distribution of respiratory syncytial virus infections during the epidemic periods by year of study.

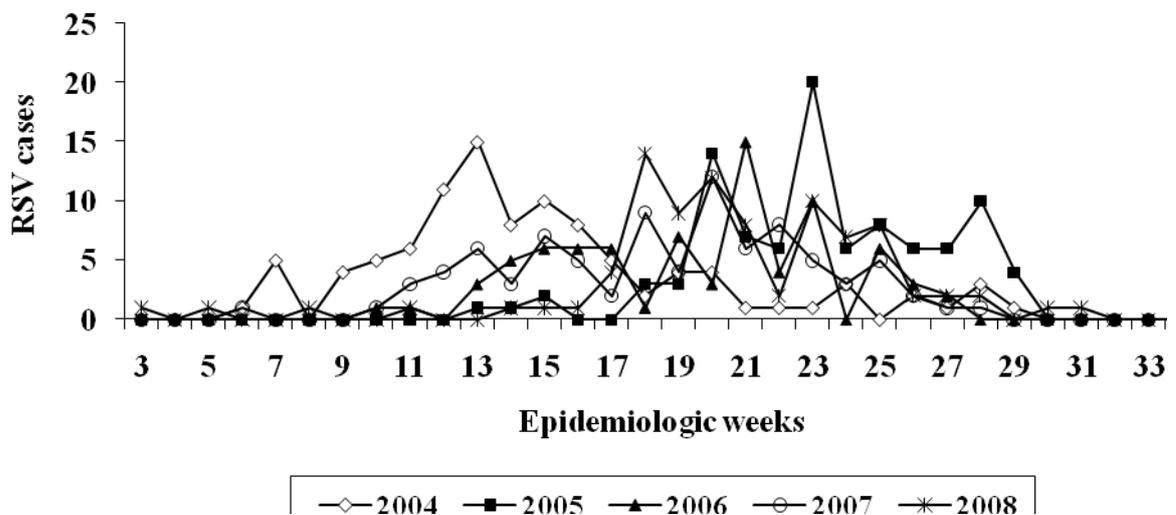


Table I

Number and percentage of respiratory specimens testing positive for respiratory syncytial virus and other viruses analyzed in Laboratory of Virology of Federal University of Ceará, from January 2004 to December 2008.

Year	Tested samples	RSV positive n (%)	Other viruses* n (%)
2004	411	102 (24.8%)	58 (14.1%)
2005	492	97 (19.7%)	70 (14.2%)
2006	653	79 (12%)	90 (13.7%)
2007	623	89 (14.3%)	118 (18.5%)
2008	706	89 (12.6%)	95 (13.4%)
Total	2885	456 (15.8%)	431 (14.9%)

*Adenovirus, parainfluenza virus 1, 2 and 3, influenza A and B, and metapneumovirus

Table II

Viruses circulating during respiratory syncytial virus epidemic periods from 2004 to 2008.

Year/virus	MPV	ADV	Flu A	Flu B	PIV 1	PIV 2	PIV 3	Total
2004	-	4	29	1	-	-	3	37
2005	-	2	1	-	-	-	3	6
2006	33	1	17	-	-	-	-	51
2007	24	6	12	4	3	-	3	52
2008	7	3	1	-	-	1	5	17
Total	64	16	60	5	3	1	14	163

Metapneumovirus (MPV), adenovirus (ADV), influenza A (Flu A), influenza B (flu B), parainfluenza virus 1 (PIV 1), parainfluenza virus 2 (PIV 2), parainfluenza 3 (PIV 3)

Table III. Onset, duration and end of respiratory syncytial virus epidemic periods in Fortaleza from January 2004 to December 2008.

Year	Onset	Offset	Duration (weeks)
2004	February 11, week 6	July 19, week 29	24
2005	May 4, week 18	July 19, week 29	12
2006	March 29, week 13	July 8, week 27	15
2007	March 13 , week 11	July 10, week 28	18
2008	April 22, week 17	July 30, week 30	14