STELLA REZENDE MELO

Avaliação da Susceptibilidade de Mutantes de Escape do Vírus Sincicial Respiratório Frente ao Palivizumab pelo Método de Microneutralização *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

STELLA REZENDE MELO

Avaliação da susceptibilidade de mutantes de escape do vírus sincicial respiratório frente ao Palivizumab pelo método de microneutralização *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Edison Luiz Durigon

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Melo, Stella Rezende
Avaliação da susceptibilidade de mutantes de escape do vírus sincicial respiratório frente ao Palivizumab pelo método de microneutralização in vitro / Stella Rezende Melo; orientador Edison Luiz Durigon. -- São Paulo, 2017.
58 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. HRSV. 2. Palivizumab. 3. Microneutralização in vitro. 4. Anticorpo Monoclonal Humanizado. 5. Infecção Respiratória Aguda. I. Durigon, Edison Luiz, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Stella Rezende Melo

Titulo da Dissertação/Tese: Avaliação da Susceptibilidade de Mutantes de Escape do Vírus Sincicial Respiratório Frente ao Palivizumab pelo Método de Microneutralização "*in vitro*".

Orientador: Edison Luiz Durigon

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Susceptibilidadede Mutantes de Escape do Vírus Sincicial Respiratório
Frente ao Palivizumabe pelo Método de Microneutralização "in vitro"

Pesquisador: Stella Rezende
Melo **Área Temática:**
Versão: 2
CAAE: 45925315.9.0000.5467
Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer:

1.585.007

Apresentação do Projeto:
Não se aplica.

Objetivo da Pesquisa:
Não se aplica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Não se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Não se aplica.

Recomendações:
Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
As recomendações e pendências foram atendidas a contento.

Continuação do Parecer: 1.585.007

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde.

Em não havendo um biorrepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante site do ICB.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_496501.pdf	12/05/2016 18:22:39		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	12/05/2016 18:20:48	Stella Rezende Melo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CadastroTeca.pdf	12/05/2016 18:12:42	Stella Rezende Melo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JustifAusenc.pdf	12/05/2016 18:11:02	Stella Rezende Melo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoAssent.pdf	12/05/2016 18:10:42	Stella Rezende Melo	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	12/05/2016 18:06:12	Stella Rezende Melo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Continuação do Parecer: 1.585.007

SAO PAULO, 10 de Junho de 2016

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)

William e Marialice

Que me criaram com todo o amor, ternura, confiança e dignidade que alguém pode desejar na vida.

Sem meus pais amados, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Edison Luiz Durigon por me receber em seu laboratório, por todos os ensinamentos que me transmitiu, pelas oportunidades fantásticas que me ofereceu e pelo crescimento, tanto pessoal quanto profissional, que me permitiu ter fazendo parte do seu grupo.

À Danielle Bruna de Oliveira Leal por me ajudar a ver que eu era capaz nos momentos de desespero e também pelos vários momentos de descontração.

À Profª. Drª. Charlotte Marianna Hársi Domotor, por me “abrir as portas” da USP.

À Telma Alves Monezi por me ensinar, com imenso carinho, praticamente tudo o que eu precisei para poder realizar este trabalho e por estar presente em todos os momentos que eu precisei.

À Viviane Fongaro Botosso, por toda ajuda, dicas e correções.

Ao Flávio S. Mesquita pela enorme ajuda com os meus experimentos.

Ao meu querido amigo Victor Figueiredo Pimentel por ter me “apresentado” ao maravilhoso mundo da virologia, por todo o apoio, conhecimento, carinho, brincadeiras e cafés que por várias vezes me ajudaram imensamente.

À Suellen Herbster, pelos impagáveis intervalos que quebravam o dia e faziam com que eu pudesse voltar com outro ânimo à labuta.

Ao meu irmão Gustavo Rezende Melo por toda a ajuda com os meus “perrengues matemáticos”.

À todos os alunos e integrantes do Laboratório do Prof. Edison que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização do meu trabalho.

À todas as pessoas que tive oportunidade de conhecer e que de alguma forma contribuíram com o meu trabalho, uma brincadeira, um empréstimo de material, um café, um bate-papo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a agência de fomento CAPES, pelo auxílio financeiro, possibilitando assim, a realização deste trabalho.

Aluno: Stella Rezende Melo

Matrícula USP: 9172281

Bolsa de fomento: CAPES

Programa: PROEX

Processo: 1522381

“Ciência é a aceitação daquilo que funciona e a rejeição daquilo que não.
Isso requer mais coragem do que podemos imaginar. ”
(Jacob Bronowski)

RESUMO

Melo S.R. Avaliação da susceptibilidade de mutantes de escape do vírus sincicial respiratório frente ao Palivizumab pelo método de microneutralização "*in vitro*". [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O Vírus Sincicial respiratório (HRSV) é um patógeno de grande importância para crianças. É o maior causador de infecções respiratórias agudas e também um dos principais causadores de internações e mortes de crianças menores de 5 anos. Cepas de HRSV com mutações no sítio de ligação do Palivizumab vêm apresentando resistência ao medicamento. Pouco se sabe sobre a prevalência destas mutações em amostras clínicas, apesar de sua potencial importância na patogênese viral. Além disso, existem poucos dados sobre a evolução molecular da proteína F do HRSV, sobretudo no Brasil. O presente estudo tem como objetivo caracterizar fenotipicamente através de ensaios de microneutralização *in vitro*, cepas oriundas de crianças não tratadas com Palivizumab circulantes em 2013 apresentando mutações na proteína F, mais especificamente relacionadas a potencial resistência nos epítopos de ligação do Palivizumab. Como resultado deste trabalho todas as amostras testadas foram neutralizadas pelo Palivizumab, concluindo-se que as mutações encontradas não conferem resistência ao monoclonal.

Palavras-chave: HRSV. Palivizumab. Microneutralização *in vitro*. Anticorpo monoclonal humanizado. Infecção respiratória aguda.

ABSTRACT

Melo S.R. Evaluation of the susceptibility of respiratory syncytial virus escape mutants to Palivizumab using "*in vitro*" microneutralization test. [Masters thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is a important pathogen for children. It is the major cause of acute respiratory infections and one of the main causes of hospitalizations and deaths in children under 5 years. Strains of HRSV with mutations in the binding site of Palivizumab have been showing resistance to the drug. Little is known about the prevalence of these mutations in clinical samples, despite their potential importance in viral pathology. In addition, there is almost no data on the molecular evolution of HRSV F protein, especially in Brazil. The aims of the present study is to characterize phenotypically by in vitro microneutralization assays, strains from children with no treatment with Palivizumab circulating in 2013 showing mutations in F protein, more specifically related to potential resistance in the binding epitopes of Palivizumab. As result of this study all samples tested were neutralized by Palivizumab, concluding that the mutations found did not confer resistance to the monoclonal.

Keywords: HRSV. Palivizumab. *In Vitro* Microneutralization test. Humanized monoclonal antibody. Acute respiratory disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura e Organização do HRSV 21
Figura 2 - Replicação do HRSV 25
Figura 3 - Topologia da árvore do HRSV genótipo A obtida pelo método Clustal W..40
Figura 4 - Topologia da árvore do HRSV genótipo B obtida pelo método Clustal W..41
Figura 5 – Figura representativa das amostras com a mutação 276 45
Figura 6 – Fotografias efeito citopático 47
Figura 7 – Fotografias do teste de IFI 49
Figura 8 – Fotografia do resultado do teste de microneutralização *in vitro* 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers Utilizados 31
Tabela 2 – Seleção das amostras idênticas 43
Tabela 3 – Amostras sequenciadas 45
Tabela 4 – Resultado qPCR 46
Tabela 5 – Resultado do teste ELISA 48
Tabela 6 – Resultado da titulação por IFI 48
Tabela 7 – Microneutralização 50

LISTA DE ABREVIATURAS

%: porcentagem

ºC: graus centígrados

µL: microlitro

µg: micrograma

Aa: aminoácidos

ANF: aspirado nasofaríngeo

cDNA: DNA complementar

cm^2 : centímetros quadrados

CO_2: gás dióxido de carbono

DICT 50%: dose infectante de 50% do tecido

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTRI: doença do trata respiratório inferior

DTRS: doença do trata respiratório superior

ECP: efeito citopático

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

g: gramas

HCl: ácido clorídrico

HRSV: Vírus Sincicial Respiratório Humano

IF: imunofluorescência

IFI: imunofluorescência indireta

IRA: infecção respiratória aguda

ITRS: infecção do trato respiratório superior

Kb: kilo-base

Kg: quilogramas

mg: miligramas

$MgCl_2$:Cloreto de Magnésio

mL: mililitros

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro

ng: nanograma

PBG: tampão PBS acrescido de gelatina e albumina sérica bovina

PBS: solução salina fosfatada

pH: potencial hidrogeniônico

pM: picomolar

pmol: picomol

qPCR: PCR em tempo real

RNA: ácido ribonucleico

RNP: complexo ribonucleoprotéico

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

S.F.B.: soro fetal bovino

SN: secreção nasal

TAE: tampão contendo tris, ácido acético e EDTA

V: volt

Sumário

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 Estrutura Viral 20
1.2 Replicação Viral 22
1.3 Proteína F 26
1.4 Epidemiologia e Patogenia 26
1.5 Profilaxia e Tratamento 27
2 OBJETIVO 29
3 MATERIAL E MÉTODOS 30
3.1 População Estudada 30
3.2 Critérios de Inclusão 30
3.3 Critérios de Exclusão 30
3.4 Amostras Testada 30
3.4.1 Extração do Ácido Nucléico Total 31
3.4.2 Primers Utilizados 31
3.4.3 Reação de Transcriptase Reversa RT para Produção de cDNA 32
3.4.4 Amplificação e Sequenciamento Parcial das Glicoproteínas G e F do HRSV 32
3.4.5 Genotipagem e Análise Filogenética do HRSV 34
3.4.6 Cultura de Células HEp-2 34
3.4.7 Infecção das Células e Cultivo do HRSV 35
3.4.8 Titulação Viral pelos métodos de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Imunofluorescência Indireta (IFI) 36
3.4.8.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) 36
3.4.8.2 Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI) 37
3.4.9 Ensaio de Microneutralização 37
4 RESULTADOS 39
4.1 Amostragem 39
4.2 Sequenciamento do HRSV 39
4.3 Genotipagem 39
4.4 Seleção das Amostras Idênticas 42
4.5 Detecção de Mutantes de Escape ao Palivizumab 44
4.6 Seleção das Amostras a Serem Cultivadas e Testadas pelo Ensaio de Microneutralização "*in vitro*" 45

4.6.1 Cultivo das Amostras 46
4.6.2 Titulação das Amostras Cultivadas 48
4.6.3 Microneutralização "in vitro" 50
5 DISCUSSÃO 52
6 CONCLUSÃO 54
REFERÊNCIAS 55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura Viral

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) pertence à ordem *Mononegavirales,* família *Pneumoviridae*, gênero *Pneumovirus* (ICTV, 2017). Segundo Collins P.L., 2001, é um vírus pleomórfico, composto de nucloeocapsídeo de simetria helicoidal, envelopado, que possui em seu genoma uma única fita de RNA de polaridade negativa. Seu envelope tem origem na membrana citoplasmática da célula hospedeira, sendo, portanto, lipoprotéico.

O genoma do HRSV é formado por dez genes, os quais codificam onze proteínas (Gan et al., 2012). Os primeiros sete genes são traduzidos em proteínas estruturais: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e a RNA-polimerase-RNA-dependente (L), que empacotam o RNA viral, formando o complexo ribonucleoprotéico (RNP). O complexo RNP, protege o material genético do vírus e forma uma maquinaria mínima, necessária para a sua replicação. O HRSV possui três proteínas de membrana: Glicoproteína (G) de adesão, proteína (F) de fusão e a proteína hidrofóbica curta (SH), que forma um canal iônico (Huang et al., 1985). Também é de responsabilidade de um desses sete primeiros genes a polimerização da proteína de Matriz (M), uma proteína associada à membrana. Esta proteína apresenta em ambos os domínios, N- e C-terminal uma grande área carregada positivamente que é importante para a ligação com a membrana citoplasmática. Essa grande área de carga positiva, é complementada por uma região hidrofóbica significativa, a qual provavelmente interaja com outros componentes virais (Money et al., 2009), Figura 1A.

Huang et. al., 1985 relata que no genoma do HRSV, também estão contidos três genes, que codificam duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e M2. NS1 e NS2 são antagonistas de Interferon tipo 1. Já M2 codifica 2 proteínas distintas, M2-1 e M2-2, que têm se mostrado funcionais na transcrição e replicação do genoma (Kiss et al., 2014) Figura 1B.

Figura 1 - Estrutura e Organização da Partícula Viral do HRSV

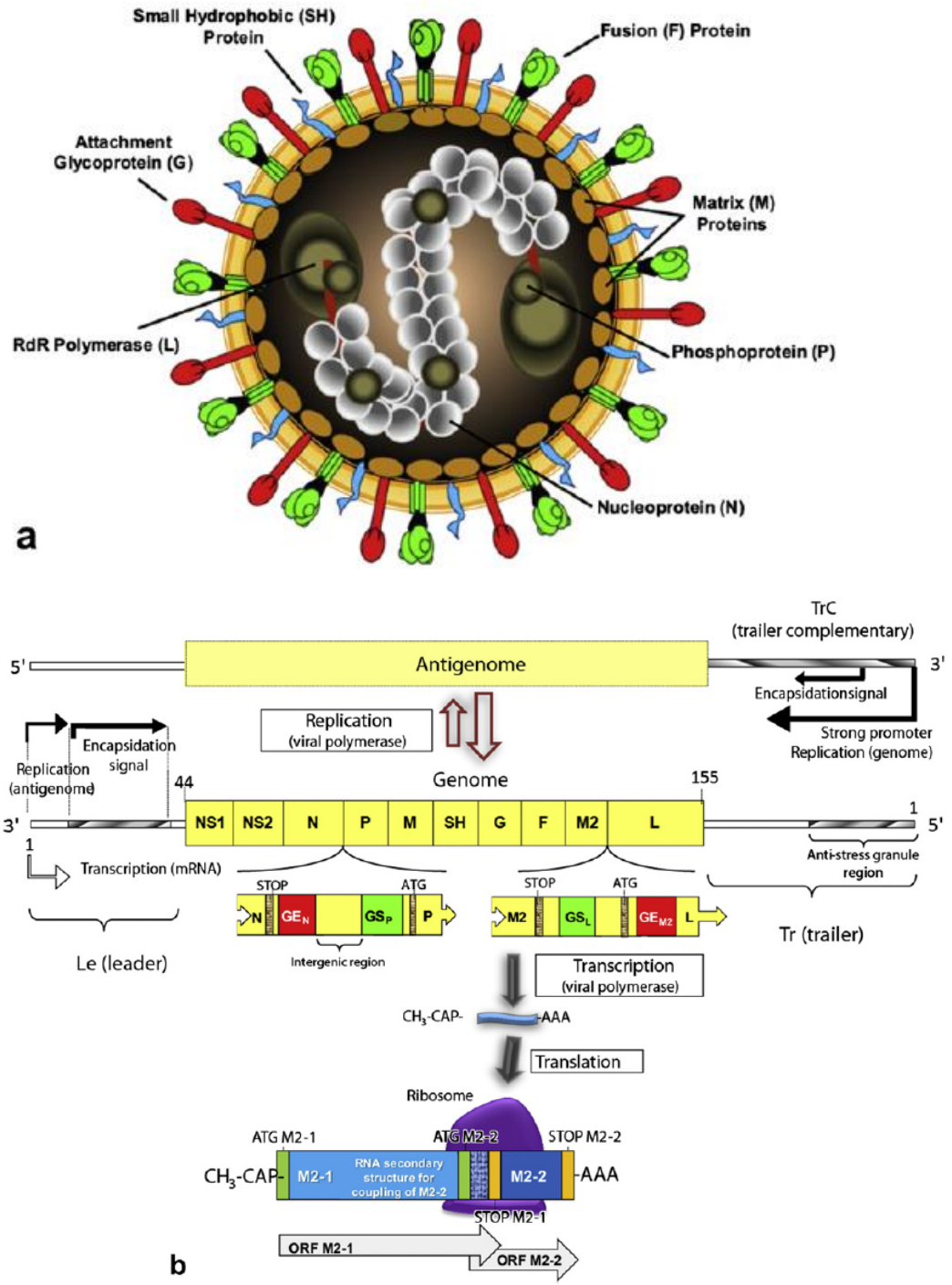


Figura 1 - Estrutura e Organização da Partícula Viral do HRSV. **(a)** Esquema representativo da particula viral com demonstração do complexo RNP composto pela nucleoproteina (N), fosfoproteína (P), RNA-polimerase-RNA-dependente (L) e as proteínas de membrana que são as glicoproteínas de adesão (G), fusão (F) e proteína hidrofóbica curta (SH) além da proteina de Matrix (M), que está associada ao envelope viral; **(b)** Esquema representativo da fita simples de RNA de polaridade negativa do HRSV (3' – 5') demosntrando todas as proteinas estruturais e não estruturais, suas posições no Genoma e o esquema de replicação viral.
Fonte: (Lay et al. 2013)

1.2 Replicação Viral

O HRSV infecta as células epiteliais das vias respiratórias se ligando às glicosaminoglicanas (GAGs) da superfície celular, através de um domínio que supostamente se liga à heparina encontrada na proteína G (Lambert, 1988). A proteína (F) medeia a ligação do HRSV com a célula hospedeira, a fusão do envoltório viral com a membrana celular e promove a liberação do nucleocapsídeo diretamente no citoplasma da célula hospedeira, onde ocorre todo o processo de replicação do vírus (Collins et. al., 2001). A ligação da proteína G à célula hospedeira, permite que a proteína F se ligue à nucleolina, uma outra proteína presente na superfície da célula hospedeira, e se incorpore em microdomínios lipídicos ricos em colesterol nas microvilosidades e cílios na superfície apical da célula. Essas interações ativam a reorganização dos filamentos de actina, modificam o citoesqueleto e iniciam a hemifusão do envelope viral à membrana plasmática, permitindo a entrada do nucleocapsídeo do HRSV na célula hospedeira. Após essa hemifusão, o complexo RNP viral se dissocia da matrix e é liberado no citoplasma (Lay et al., 2013) Figura 2 A. No citoplasma, o complexo RNP inicia a transcrição dos genes virais necessários para a replicação. Há um aumento profuso da síntese de mRNA viral no início da infecção, particularmente, nos corpos de inclusão que se reúnem nas proteínas do complexo RNP (García et al., 1993).

Os moldes dos genes do HRSV são transcritos na direção 3’ – 5’ e por seu genoma apresentar polaridade negativa, os mRNAs transcritos que codificam as proteínas virais são sintetizados diretamente do RNA genômico no citoplasma da célula hospedeira. No entanto, para a replicação do genoma viral é necessária a síntese de um antigenoma intermediário de RNA 5’ – 3’. Este antigenoma é sintetizado a partir do genoma viral pela RNA polimerase. Tanto a transcrição dos mRNAs quanto a replicação do genoma, são regulados por um único promotor, localizado na região leader, na extremidade 3’ do genoma viral (Mink et al., 1991). A enzima RNA polimerase RNA dependente se liga a região ***leader*** do genoma e dá início à transcrição do primeiro nucleotídeo (Collins et. al., 2001). Na junção entre a região ***leader*** e o primeiro gene, o mRNA transcrito é liberado e a polimerase recomeça a transcrição (Collins et. al., 2001). Os genes virais são flanqueados por sinais de início do gene (GS) e final do gene (GE), que são reconhecidos pela RNA-polimerase-RNA-dependente, que adiciona um *cap* na ponta 5’ (GS) da cadeia nascente e são

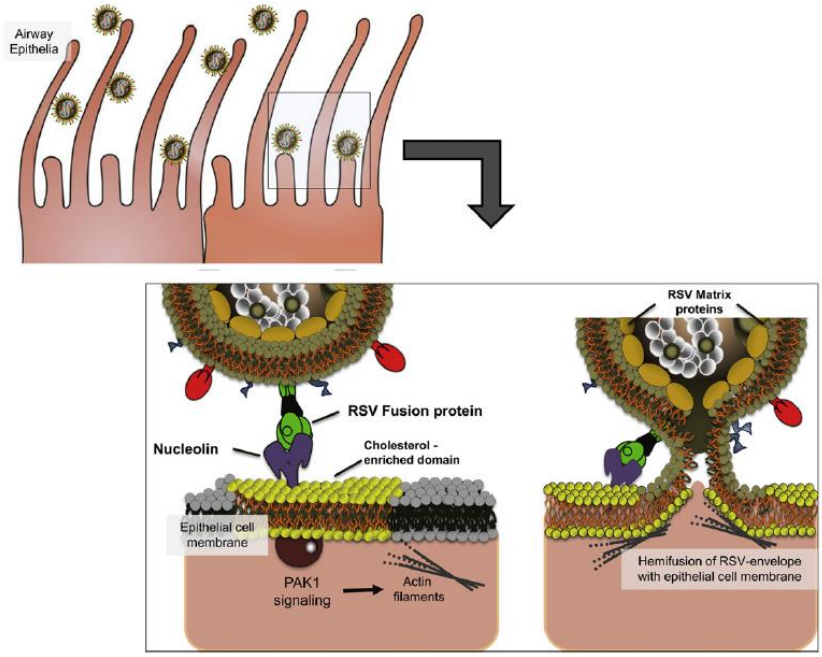
poliadenilados e liberados na ponta 3' (GE) (Collins, Wertz 1985). Nesta etapa, a proteína anti-terminação M2-1 previne a liberação concomitante da RNA-polimerase-RNA-dependente, que promove a transcrição dos mRNAs ao invés da replicação do genoma (Hardy, Wertz, 1998). Além dos mRNAs produzidos, também pode ser encontrada uma pequena quantidade de grandes mRNAs poliadenilados, que ocorrem devido à transcrição contínua de 2 ou mais genes. Estes fragmentos apresentam tanto a sequência dos genes quanto a sequência da região intergênica. Suspeita-se que a polimerase falha no reconhecimento de final do gene e continua sintetizando o mRNA até encontrar o próximo sinal de final do gene (Collins et. al., 2001). Quando os mRNAs se acumulam a uma certa quantidade no citoplasma da célula hospedeira, o complexo RNP pára de transcrever e replicar o mRNA, de polaridade negativa, e passa a produzir o antigenoma viral, que consiste em uma fita de RNA de polaridade positiva e que contém o genoma viral completo, o qual servirá de molde para formar o RNA viral de polaridade negativa (Murray et. al., 2009). Para que a síntese do antigenoma ocorra, é necessário que a maquinaria de produção de RNA entre em modo de "anti-terminação" e passe a ignorar todos os sinais de início e fim dos genes, inclusive entre a região leader e o gene NS1 (Collins et. al. 2001). Segundo Ghildyal et. al. (2005), a proteína M apresenta uma via de importação nuclear. No início da infecção, esta proteína é transportada para o núcleo da célula, onde desempenha algum papel, possivelmente, ligado a algum processo nuclear específico da célula hospedeira, como transcrição ou associação de ribossomos. Num período mais avançado da infecção, a proteína M se redireciona para o citoplasma. Esse redirecionamento é necessário para a produção de grandes quantidades de vírus e aparenta ser mediado pela fosforilação da proteína M (Ghildyal, et al. 2005).

O primeiro passo para a maturação do vírus é montagem do nucleocapsídeo, que acontece pela combinação da proteína N com o RNA genômico, seguido da adição das proteínas P e L (Collins et. al. 2001). As glicoproteínas de envelope, G e F, são sintetizadas e glicosiladas no retículo endoplasmático, posteriormente processadas no Golgi e transportadas para a membrana citoplasmática. A proteína F também recruta outras proteínas virais, como a glicoproteína G para a formação de um complexo na superfície da célula infectada. Ocorre também a interação da cauda citoplasmática da proteína G com a proteína M, vinculando as proteínas de superfície F, SH e G com a matrix viral. No interior da partícula viral, a proteína M parece se ligar à proteína M2-1 no complexo RNP, recrutando essa estrutura para a membrana

celular, para que haja a montagem do vírus (Li, et al. 2008). A montagem do envelope se dá com as glicoproteínas virais, modificadas por glicosilação durante seu transporte através do retículo endoplasmático e complexo de golgi, ocupando o lugar das proteínas celulares da membrana plasmática. Em seguida, as proteínas da matriz se agregam na porção interna do envelope nascente. Finalmente, o nucleocapsídeo alcança a superfície e o brotamento da partícula viral ocorre pela superfície apical, através da via endossomal de reciclagem, sendo este um mecanismo ainda não descrito para nenhum vírus envelopado de RNA. Este mecanismo de brotamento, também é independente dos complexos endossomais de distribuição requeridos para transporte (ESCRT), o principal mecanismo de brotamento para vírus de RNA de sentido negativo (Lay et al., 2013). Ao brotar, o vírion leva consigo uma porção da membrana plasmática da célula hospedeira, num processo inverso ao da penetração por fusão (Collins et. al. 2001). Os antígenos virais podem ser detectados 9h após infecção em cultura celular e o vírus infeccioso entre 11 e 13 horas (Ogra, 2004).

Figura 2 - Replicação do HRSV.

A



B

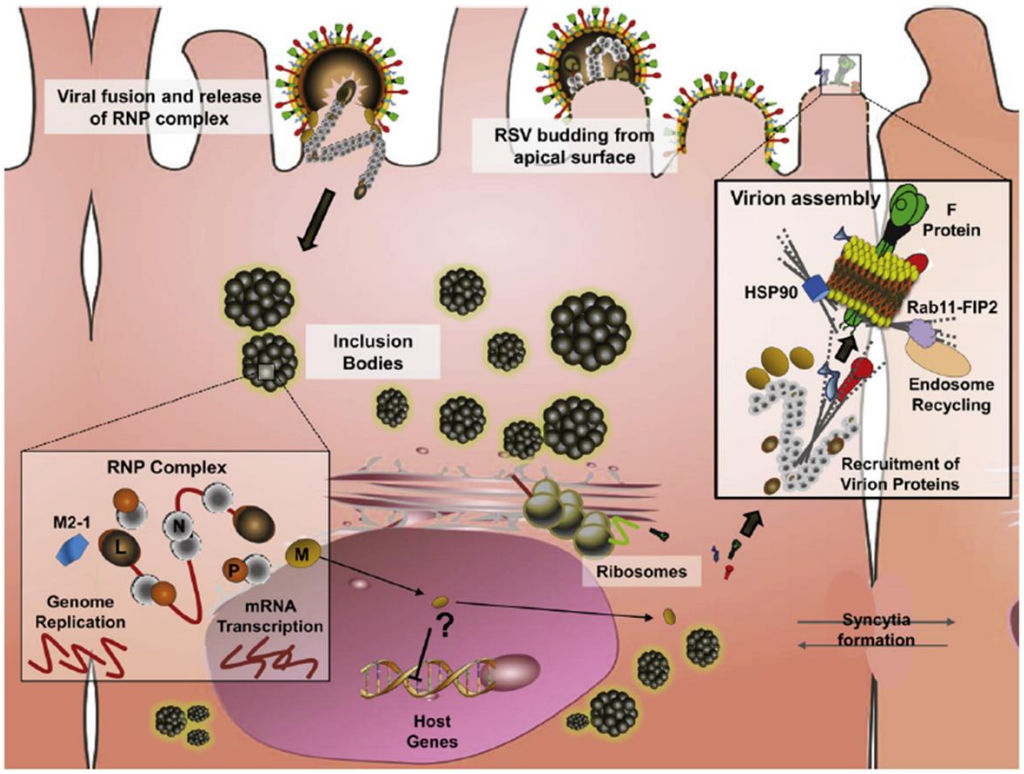


Figura 2 - Replicação do HRSV. (A) Representação esquemática da entrada do HRSV na célula hospedeira. A proteína de adesão G faz a ligação primária com a superfície celular e permite que ocorra a ligação da proteína F com a proteína nucleolina; (B) Representação da transcrição, tradução e brotamento dos dos virions.
Fonte:(Lay et al. 2013).

1.3 Proteína F

A glicoproteina F é uma proteína integral da membrana viral, altamente conservada e apresenta peso molecular de aproximadamente 68.000 KDa (Collins, Wertz, 1985). É responsável pela fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira. Também é encontrada na superfície de células infectadas, sendo responsável por sua fusão e consequente formação de sincício. Portanto, anticorpos contra esta proteína podem neutralizar diretamente o vírus ou bloquear sua entrada na célula ou ainda impedir a formação de sincícios (Johnson et al., 1997). A proteína F é bem conservada em todas as variantes do HRSV, sendo assim um alvo importante para o desenvolvimento de anticorpo monoclonal (Pollack, Groothuis, 2002).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo (F0) composto por 574 aminoácidos (Collins et al., 1984). Monômeros de F0 se juntam formando trímeros, que ao passar pelo complexo de Golgi vão sendo ativados por proteases do hospedeiro (Collins, Mottet, 1991). As proteases clivam F0 em duas subunidades, dando origem à F1 e F2, que são ligadas entre elas covalentemente (Zimmer et al., 2001a). A subunidade F1 é fundamental para a fusão das membranas e formação de sincício (Zimmer et al., 2001b). Dentro da subunidade F1 foram mapeados 5 sítios antigênicos conhecidos por I, II, IV, V e VI, sendo o sítio antigênico II da proteína F o que carrega o epítopo de ligação do Palivizumab (Zhao et al., 2004).

1.4 Epidemiologia e Patogenia

Em países em desenvolvimento, as principais causas de morbidade e mortalidade são as infecções respiratórias agudas. Nesses países a severidade, incidência e quantidade de casos fatais também são maiores. Umas das principais causas de infecção respiratória aguda são os vírus respiratórios (Arruda et al., 1991). Dentre os vírus respiratórios, o HRSV é um dos principais patógenos pediátricos e também vem se mostrando de grande importância em pacientes idosos e imunocomprometidos (Bates et al., 2014). Em um recente estudo epidemiológico global, foi estimado que em 2015 houveram aproximadamente 33,1 milhões de casos de infecção respiratória aguda por HRSV. Dentre estes casos, para 3,2 milhões foram necessárias internações hospitalares e 59.600 resultaram em mortes de crianças internadas menores de 5 anos de idade. Neste mesmo período, para crianças menores de 6 meses de idade, foi estimado 1,4 milhões de

internações hospitalares, sendo que destas, uma média de 27.300 resultaram na morte das crianças, com grande número ocorrendo próximo ao período neonatal, quando o HRSV se apresenta como apneia ou sepse. Este mesmo estudo ainda relata que devido a fatores como casos não relatados e amostras não testadas estes números podem estar subestimados (Shi et al., 2017).

O HRSV é uma importante causa de internação e morte de crianças em todo o mundo. Seu sintoma clínico e a sua severidade podem variar de acordo com a idade da criança. Normalmente a primeira infecção acontece entre as primeiras 6 semanas de vida e os 2 anos de idade e raramente são assintomáticas. As recidivas durante a vida são comuns, porém tendem a não ser severas (Ogra, 2004).

A população com maior predisposição a desenvolver doença severa resultante da infecção por HRSV são os neonatos, lactentes, crianças nascidas prematuras, com doenças pulmonares crônicas ou cardiopatias congênitas e imunodeficientes (Zhu et al., 2011).

A infecção por HRSV causa doença do trato respiratório inferior em crianças, podendo ocasionar bronquiolite aguda e pneumonia. Os principais sintomas são taquipneia e dispneia, tosse severa e chiado respiratório que podem ser tão fortes a ponto de se assemelharem a ataques de asma, em casos mais severos pode ocorrer hipóxia, podendo ser observada cianose (Ismail, Reisner, 2001; Lay et al., 2013). Outros sintomas bastante comuns são traqueobronquite ou doença do trato respiratório superior, normalmente acompanhadas por febre e otite média (Ismail, Reisner, 2001).

O HRSV é um vírus sazonal, tendo maior incidência de infecções nas estações frias de climas temperados e em climas tropicais, quando o clima esfria e aumentam as chuvas (Simoes, 1999).

1.5 Profilaxia e Tratamento

O Palivizumab, a única profilaxia aprovada pela FDA (do Inglês - Food and Drug Administration) contra infecção por HRSV (Shadman, Wald, 2011) é um anticorpo IgG monoclonal neutralizante humanizado que se liga no sítio antigênico A, uma região altamente conservada na proteína de fusão F do HRSV, localizada entre os aminoácidos 258 e 275 (Zhu et al., 2011a), impedindo, dessa forma que o vírus entre na célula hospedeira, e consequentemente, prevenindo ou reduzindo a severidade da

infecção (Murray et al., 2014). De acordo com Collins e Melero, 2011, “Este produto não necessariamente previne a infecção por HRSV, mas consegue restringir a replicação o suficiente para reduzir a doença”.

O Palivizumab é administrado por via intramuscular, na dose de 15 mg/Kg. A aplicação é realizada mensalmente, durante 5 meses, sendo a primeira feita antes do início da temporada de HRSV. Como a imunidade oferecida pelo medicamento é apenas parcial, há a necessidade de reforço mensal, durante todo o período de prevalência do HRSV (Robinson et al., 2013).

Assim como a grande maioria dos vírus de RNA, o HRSV também é altamente mutável, devido à baixa capacidade da RNA-polimerase-RNA-dependente de fazer reparos. Isso faz com que o HRSV seja bastante adaptável às pressões seletivas e proporcionando assim o aparecimento de quasiespécies (Zhao et al., 2004). As quasiespécies naturais de vírus de RNA permitem a emergência rápida de vírus mutantes que escapam da pressão imune do hospedeiro frente a este monoclonal (Moraes et al., 2015). Trabalhos prévios demonstraram que mutações nos aminoácidos S268I, K272Q, K272E, S275L e N276S já existem na população e podem propiciar pacientes com recidivas (Zhu et al., 2011; Papenburg et al., 2012; Tomé et al., 2012; Oliveira et al., 2015). A subunidade F_1 é relativamente bem conservada, sendo sua função comprometida mediante estas deleções ou substituições de aminoácidos (Collins et al., 2001, Tomé et al., 2012).

No entanto, pouco se sabe sobre a prevalência de tais mutações em amostras clínicas no mundo todo. Além disso, apesar do seu papel em estratégias de patogenia, imunidade e prevenção do HRSV, poucos dados sobre a evolução molecular da proteína F do HRSV estão disponíveis, sobretudo no Brasil, porque os estudos filogenéticos anteriores concentraram-se na glicoproteína G do HRSV.

2 OBJETIVO

Portanto, nosso trabalho tem como objetivo, em relação ao HRSV, caracterizar fenotipicamente por microneutralização, amostras de diferentes genótipos circulantes em 2013, que possuem alguma mutação na proteína F, porção parcial F_1 (262 `a 276 Aa), particularmente mutações de potencial resistência nos epítopos de ligação do Palivizumab (N268, K272, S275 para os dois tipos de HRSV e N276 para o HRSV-A e S276 para o HRSV-B), de cepas oriundas de crianças que não fizeram uso do Palivizumab.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População Estudada

O Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM) situado no Instituto de Ciências Biomédicas II, na Universidade São Paulo, sobre a coordenação do Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, possui uma TECA de amostras de aspirado de nasofaringe (ANF) ou secreção nasal (SN) coletadas de crianças com idade inferior a 05 anos, que apresentaram infecção respiratória aguda (IRA) e foram atendidas no pronto atendimento e ambulatório ou internadas na pediatria do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP). Neste estudo foram utilizadas as amostras de SN e/ou ANF que foram testadas pelo método de Imunofluorescência Indireta (IFI), que é utilizado como rotina de diagnóstico no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, para 7 vírus respiratórios e tiveram o HRSV como resultado positivo, no período de Janeiro a Dezembro de 2013.

3.2 Critérios de Inclusão

Amostras de ANF/SN de crianças com idade inferior a cinco anos que tiveram sinais e sintomas de IRA, incluindo Doença do Trato Respiratório Superior e Inferior (DTRS e DTRI) com pedido médico de investigação para Vírus respiratórios por IF e tiveram resultado positivo para HRSV, foram incluídas na pesquisa.

3.3 Critérios de Exclusão

Crianças maiores de 05 anos de idade e crianças menores de 05 anos de idade, mesmo com sintomatologia clínica de IRA, que possuíam resultado negativo para HRSV por imunofluorescência e crianças menores de 05 anos que não se enquadram no padrão clínico de IRA.

3.4 Amostras Testadas

Foram triadas 1990 amostras de ANF/SN que foram testadas por Imunofluorescência Indireta (IFI) no Laboratório de Imunologia do HU-USP e possuíram resultados positivos para HRSV e que obedeceram ao critério de inclusão.

Todas as amostras tiverem o ácido nucléico extraído e foram amplificados e sequenciados com a finalidade de genotipar e caracterizar geneticamente a proteína F dos vírus HRSV circulantes nestas amostras.

3.4.1 Extração de Ácido Nucleico Total

Todas as amostras incluídas no projeto foram extraídas utilizando-se uma alíquota de 300 µL de amostra com 670 µL de tampão de lise do *Nuclisens® Iso Kit* (TL) (*BioMerieux, Lyon, France*) que extrai RNA e DNA, utilizando o protocolo *off-board*, conforme instruções do fabricante, no qual obtivemos um volume final de 110 µL de ácido nucleico total extraído.

Na alíquota de 970 µL, contendo amostra e TL, foi acrescido 30 µL de Sílica Magnética, que sobre condições de elevadas concentrações de sal, ligaram-se aos ácidos nucleicos. Estas partículas de sílica atuam como fase sólida e os componentes que não continham ácidos nucleicos foram removidos através de várias etapas de lavagens efetuadas pelo equipamento *Nuclisens EasyMag* (*BioMerieux, Lyon, France)*. Por último, os ácidos nucleicos foram eluídos da fase sólida, com um tampão de eluição denominado, *Nuclisens Eluition Bufffer* (*BioMerieux, Lyon, France).* O eluído, contendo RNA e DNA total, foi armazenado em freezer -70 °C, até o momento da sua utilização.

3.4.2 Primers Utilizados

Tabela 1 - Relação dos *primers* utilizados na detecção de HRSV pela técnica de RT-PCR-GeneScan

Primer	**Proteínas**	**Posição no Genoma**	**Reação**	**Sequência 5'-3'**	**Referência**
GR5 +	G	151-173/Gene G	PCR	CTGGCAATGATAATCTCAACTTC	Sanz et al., 1994
BO2 -	F	1199-1216/Gene F	PCR	ATCTGTTTTTGAAGTCAT	Arbiza *
FP1 +	F	1-20/Gene F	PCR	GGGAAATAACAATGGAGYT	In House
FP2 +	F	573-595/Gene F	SEQ	TTAACCAGCAAAGTGTTAGACC	In House
FV +	F	163-186/Gene F	PCR	GGTTGGTATACCAGTGTCATAAC	Adaptado de Zheng et al., 1996
FV -	G	163-186/Gene F	PCR	GTTATGACACTGGTATACCAACC	Zheng et al., 1996
Observação: Todos os primers foram utilizados na reação de sequenciamento e para os dois tipos (A e B) do HRSV.					

** Cortesia do Dr. Juan Arbiza, Laboratório de Virologia, Faculdade de Ciências, Universidade da Republica, Montevideo, Uruguay.*

3.4.3. Reação de Transcriptase Reversa RT para Produção de cDNA

Foi feita a transcrição reversa de todas as amostras a partir do material extraído e realizada com o auxílio do *Super Script III First-strand Syntesis for Rt-PCR kit*, conforme instruções do fabricante (*Invitrogen by Life Tecnology, 5791 Van Allenway Carlsbad, Ca-EUA*). Uma alíquota de aproximadamente 8 µL do RNA total extraído foi diluída em tampão de reação contendo: 1 µL de *gene-specific* primers à 2 µM (*GSP)*, 2 µL de 10 x RT Buffer, 2 µL de Dithiothreitol (DTT) a 0,1 M, 1 µL de SuperScript® III RT enzyme, 1 µL de Inibidor de RNAse, 1 µL de 10 mM dNTP mix, 4 µL de $MgCl_2$ a 25 mM. A mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos, seguida de 50 °C por 50 minutos e seguida ainda por 85 °C por 5 minutos e colocada imediatamente em gelo após o término da ciclagem. O cDNA obtido foi armazenado em ultrafreezer de -70 ºC até sua utilização nas etapas de PCR convencional e sequenciamento pelo método de Sanger.

3.4.4 Amplificação e Sequenciamento Parcial das Glicoproteínas G e F do HRSV

Foi realizado a PCR de todas as amostras. Para isso, foi utilizado dNTPs, Buffer e Platinum Taq DNA polimerase do kit da Invitrogen, seguindo instruções do fabricante (*Invitrogen by Life Tecnology, 5791 Van Allenway Carlsbad, Ca-EUA*).

Resumidamente, 50 µL de reação foi preparada utilizando 1 U de Platinum Taq DNA polimerase (1 µL), 5 µL de tampão de reação [10 X], 10 pM de cada iniciador (“forward’’ e ‘‘reverse”) (1 µL de cada), 1.5 µL de $MgCl_2$ a 50 mM, água livre de nuclease para completar 45 µL de mix na PCR e 5 µL de cDNA (1 µL do produto da PCR para o Nested). A amplificação foi realizada em termociclador com as condições dos seguintes ciclos: 95 °C por 5 minutos (1 ciclo); 95 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos, seguido de 72 °C por 45 segundos (40 ciclos na PCR) e com extensão final à 72 °C por 5 minutos. Como controle positivo, foi utilizado uma amostra sabidamente positiva e tipada, e como controle negativo foi utilizado água livre de DNA/RNAse.

A detecção do produto amplificado pela PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose (LifeTechonologies) a 2% em tampão TAE [0,5 x], corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL. A 3 µL de azul de bromofenol foram misturados 10 µL do produto da PCR e submetidos à eletroforese em cuba horizontal durante 40 minutos a 100 V.

A visualização do gel foi realizada em trans-iluminador de luz ultravioleta, sendo fotografada digitalmente para análise detalhada.

A PCR fez uso de dois primers (Tabela 1), dNTPs e DNA polimerase para produzir múltiplas cópias de uma sequência de DNA específica. Quando a reação terminou, a maior parte dos primers e dNTP permaneceram intactas, e, se não retirados, iriam interferir no sequenciamento. Então, a purificação dos produtos da PCR foi realizada com o kit ExoSap (exonuclease I – Amersham Pharmacia Biotech), onde as enzimas Exonuclease I (*Exo* I) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) removeram estes materiais indesejados com a adição de 2 µL de enzima (*Exo*/SAP) em 5 µL de PCR, correspondendo de 1 a 10 ng, e 13 µL de H_2O UltraPure Gibco®®, completando o volume para 20 µL de material a ser purificado. A reação foi realizada em termociclador a 37 °C por 15 minutos, seguido de 80 °C por 15 minutos, para inativação da enzima.

Após a purificação do produto de PCR, as sequências alvo foram sequenciadas utilizando-se o kit *"ABI PRISM Dye ™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit*" ("*Big Dye*" - *Applied Biosystems, Inc., EUA*), seguindo as instruções do fabricante. Do produto purificado, 10 µL foram adicionados a um microtubo com 5 pmol de *primer* (1 µL), 1 µL do "*Terminator ready reaction Mix, Big Dye*", 3 µL do tampão de sequenciamento (*save money* - Tris HCl 200 mM [pH 9,0] e 5 mM $MgCl_2$) obtendo um volume final de 15 µL. Todas as reações foram feitas em duplicatas, sendo uma das reações de sequenciamento com *primer forward* e outra com o *primer reverse.*

A extensão enzimática foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 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. O produto obtido foi purificado, visando à remoção de excesso de dideoxinucleotídeos "terminadores" presentes na reação pelo kit X-terminator (*Applied Biosystems Inc., EUA*) conforme instruções do fabricante. Onde, em 10 µL da reação de sequenciamento foi acrescido 10 µL do X-Terminator e 55 µL de tampão da Reação buffer SAM'S. O mix foi agitado por 30 minutos seguido de uma centrifugação a 1300 g por 2 minutos e submetidos à eletroforese em polímero POP6, utilizando sequenciador automático ABI modelo 3100 (*Applied Biosystems, Inc., EUA).*

3.4.5. Genotipagem e Análise Filogenética do HRSV

As análises filogenéticas, desde sua edição até a produção da topologia da árvore foram realizadas com os programas específicos do pacote *Expert Analysis Software* - DNASTAR, Inc., EUA para Macintosh HD.

Os pares das sequências de nucleotídeos obtidas por amostras foram editadas com o programa *SeqMan*, de modo a obter a sequência do produto alvo amplificado. Posteriormente, estas sequências foram traduzidas utilizando o programa Edit Seq™ 4,05 seguida do alinhamento e análise das proteínas, utilizando o programa Meg Align™ 4.05 - *Expert Analysis Software* - DNASTAR, Inc., EUA para Mac. Para os fragmentos analisados tivemos como resultados a comparação das nossas sequências com sequências representativas de todos os genótipos existentes no GenBank, para obtenção da tipagem molecular do HRSV, além do grau de similaridade entre as sequências, calculadas par a par.

Com o intuito de otimizar as análises subsequentes, utilizou-se, aleatoriamente, apenas uma amostra de cada grupo de sequências idênticas. Desta forma, foram utilizadas sequências que apresentaram pelo menos uma mudança no número ou posição dos nucleotídeos. As sequências representativas foram submetidas à análise filogenética comparando-as com amostras padrões de diferentes genótipos, descritas na literatura e disponíveis no GenBank, para obtenção da genotipagem baseada na topologia da árvore.

3.4.6 Cultura de Células HEp-2

Células HEp-2 suscetíveis à infecção por HRSV, obtidas do banco de células do Instituto Adolfo Lutz e congeladas em nosso laboratório, foram descongeladas em garrafa de cultura de 25 cm^2, em meio de cultura de descongelamento DMEM alta glicose, complementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB-Cultilab) e incubadas em estufa à 37 °C e 5% de CO_2 durante 24 horas para que as células aderissem à garrafa. Após esse período de adesão, com o intuito de retirar o excesso de células mortas e diluir o crioprotetor DMSO (citotóxico), o meio de cultura foi trocado para meio de crescimento DMEM alta glicose enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino, e então mantidas em estufa à 37 °C com 5% de CO_2 até que o seu tapete estivesse com 100% de confluência, só então foi feito o primeiro repique. Os três primeiros repiques foram feitos com o meio enriquecido da mesma forma descrita acima, na

proporção de 1: 3. Só após o terceiro repique as células foram consideradas aptas para serem trabalhadas. Para manutenção das células HEp-2, o meio de crescimento foi também enriquecido, porém com 5% de soro fetal bovino e seu repique foi feito na proporção de 1: 5.

3.4.7 Infecção das Células e Cultivo do HRSV

No dia anterior à inoculação, as células HEp-2 foram preparadas em placas de cultura celular de 24 poços, na concentração de 150.000 células/mL, em meio de cultura enriquecido com 5% de soro fetal bovino e incubadas em estufa com CO_2. No momento da inoculação, o tapete celular deve estar apresentando, aproximadamente, 70 – 80% de confluência. Para a inoculação viral, 500 µL de cada amostra foi tratado com 50 µL de antibiótico e antifúngico Anti-anti Gibco®. As amostras foram descongeladas em gelo, 500 µL da amostra foi transferido para um criotubo, adicionado antibiótico e antifúngico e então foi feita a incubação por 1 hora em gelo. Após o período de incubação, 100 µL, 150 µL e 250 µL de cada amostra foram inoculados em placa de cultura celular com tapete semiconfluente e incubado à 37 °C em câmara úmida, por uma hora, para que ocorresse a adsorção do vírus. Após o período de adsorção, foi adicionado 1 mL de meio de cultura enriquecido com 2% de S.F.B. e a cultura inoculada foi novamente incubada a 37 °C e 5% de CO_2, até que fossem observadas 3 cruzes de efeito citopático ou por no máximo 5 dias após a inoculação. Após a observação de perda de grande parte do tapete, as três concentrações inoculadas foram misturadas e a passagem de 1 mL deste inóculo foi feita para células previamente repicadas em garrafas de cultura de 25 cm^2. Após a observação de efeitos citopático, 500 µL do sobrenadante foi novamente transferido para nova garrafa de cultura de 75 cm^2. Com o aparecimento de efeito citopático e a destruição de grande parte do tapete celular, o inóculo foi colhido e transferido para criotubos e armazenados em nitrogênio líquido, em várias alíquotas de 1,5 mL até a sua utilização. O qPCR foi realizado para confirmação do crescimento viral em cultivo celular utilizando o protocolo descrito por Fry et al., 2010 e com o kit “AgPath-id one step rt-pcr kit (Ambion), seguindo as orientações do fabricante.

3.4.8 Titulação Viral pelos métodos de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Imunofluorescência Indireta (IFI).

Após a terceira passagem do vírus em cultura celular, realizou-se a titulação viral em placa de cultura celular de 96 orifícios. As placas foram preparadas no dia anterior à inoculação, com aproximadamente 150.000 células/mL, para que no momento da infecção, apresentassem um tapete celular com aproximadamente 70 - 80% de confluência.

Para cada amostra viral, foi feita uma diluição seriada na base 10, no intervalo de 10^{-1} à 10^{-10}. Foi, então, adicionado 50 µL por poço de cada diluição, em quadruplicada e incubado em estufa a 37 °C, 5% de CO_2 e umidade durante 1 hora para que ocorresse a adsorção do vírus. Após o período de adsorção, cada poço foi completado com 100 µL de meio de cultura enriquecido com 2% de soro fetal bovino e a placa foi novamente incubada em estufa a 37 °C com CO_2 e umidade por 48 horas. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS e fixadas, adicionando-se 100 µL de metanol gelado. As placas foram incubadas em freezer à -20 °C durante 10 minutos, o metanol descartado e as placas foram secas ao ar. Depois de secas, foi feito no mesmo dia, o ensaio de imunofluorescência indireta ou as placas foram armazenadas em freezer à -20 °C, até o momento de sua utilização.

As placas foram lidas e cada poço foi classificado como positivo (presença de pelo menos 1 célula infectada) ou negativo (sem a presença de nenhuma célula infectada). Com este resultado, para cada vírus, foi aplicado o cálculo de Reed & Muench para que fosse possível chegar a sua titulação.

3.4.8.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

O ensaio ELISA foi realizado em placa de cultura celular de 96 poços, previamente inoculada e fixada com metanol quando atingiu 48 horas da inoculação.

Primeiramente a placa foi lavada em maquina microelisa, com PBS- Tween 20%, por 2 ciclos, totalizando 4 lavagens. Para o bloqueio da placa, foi adicionado 200 µL de PBS-Tween 20% + 0,5% de gelatina e incubada por 20 minutos em estufa a 37 °C, sem CO_2. Nova lavagem foi realizada e adicionou-se 75 µL por poço de Anticorpo Monoclonal Anti-HRSV, diluído em PBS-Tween 20% + 0,5% de gelatina, na proporção de 1: 1000, incluindo 4 poços do controle celular para servir de “branco”. Foi então incubada em estufa a 37 °C, sem CO_2, durante 1 hora.

Após o período de incubação, lavou-se novamente a placa para a remoção de anticorpo não ligados e adicionou-se 75 µL por poço de conjugado, diluído em PBS-Tween 20% + 0,5% de gelatina, na proporção de 1: 200. A placa foi incubada em estufa a 37 °C, sem CO_2, durante 1 hora. Terminado o tempo de incubação, outra lavagem foi realizada, 125 µL por poço de tampão TMB one foi adicionado e a placa foi imediatamente armazenada em câmara escura durante 15 minutos. Dado o período de incubação, a reação foi parada com 125 µL de ácido sulfúrico [1 M] por poço e a leitura foi realizada em espectrofotômetro.

3.4.8.2 Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI)

O ensaio de IFI foi realizado nas placas secas e em temperatura ambiente. Primeiramente foi adicionado 100 µL de PBS acrescido de gelatina e albumina sérica bovina (tampão PBG) por poço e incubado em estufa à 37 °C, sem CO_2 , durante 30 minutos, para que ocorresse o bloqueio das placas. Com as placas bloqueadas, o tampão PBG foi descartado e 100 µL de Anticorpo Monoclonal anti-HRSV, diluído à concentração de 1: 500, foram adicionados aos poços da placa e incubado em estufa sem CO_2, durante 1 hora.

Após o período de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com o tampão PBG e então, foram adicionados 25 µL por poço de conjugado, na concentração de 1: 200, diluído em azul de Evans (0,002%) e novamente incubado à 37 °C, sem CO_2 , em câmara úmida, durante mais 1 hora. Passado o período de incubação, as placas foram novamente lavadas com o tampão PBG e a leitura das placas foi realizada em microscópio de fluorescência.

3.4.9 Ensaio de Microneutralização

O ensaio de microneutralização, foi realizado em placas de cultura celular de 96 poços, preparadas no dia anterior contendo aproximadamente 150.000 células por poço. Em microtubos estéreis uma diluição seriada, na base quatro foi realizada para o Palivizumab, utilizando meio de cultura DMEM, obtendo volume final de 75 µL da diluição para cada poço a ser utilizado. Para cada 75 µL das diluições do Palivizumab foram adicionados 50 µL de cada amostra viral, contendo 100 DICT 50%, aos microtubos e então, incubado em geladeira, à 4 °C durante 2 horas. Após o período de incubação, com as placas de cultura celular previamente lavadas, foi adicionado 125 µL por poço de cada diluição do Palivizumab mais vírus, em duplicata e incubado

em estufa a 37 °C, com 5% de CO_2 e umidade durante 48 horas. As placas foram então fixadas com metanol e realizou-se o ensaio de IFI, conforme descrito nas seções 3.4.8 e 3.4.8.2, respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Amostragem

Das 1990 amostras testadas por IFI no HU-USP, 478 (24%) foram positivas para HRSV. Destas, 398 (83,2%) das positivas foram analisadas, onde seus ácidos nucleicos foram extraídos, amplificados e sequenciados com a finalidade de genotipar e caracterizar geneticamente os vírus HRSV circulantes na população estudada. A maioria das crianças infectadas por HRSV estão entre zero e dois anos de idade, mas com predomínio das crianças menores de 6 meses. Nas amostras analisadas, não foi encontrado diferença em relação ao gênero das crianças infectadas pelo HRSV. A distribuição sazonal do HRSV apresentou maior incidência durante o Outono, com pico no mês de Abril. Os percentuais de positividade foram de 34,1% no mês de Março, 59,3% no mês de Abril, 31,2% no mês de Maio e 29,3% no mês de Junho.

4.2 Sequenciamento do HRSV

A análise do sequenciamento foi feita das 398 amostras sendo que destas obtivemos 305 sequências da amplificação do gene da proteína G e 262 sequências da F, sendo que 240 amostras tiveram as duas proteínas sequenciadas e 103 sequencias falharam e não houve tempo hábil para repetição.

4.3 Genotipagem

As sequências nucleotídicas foram comparadas pelo método de Clustal W, com as sequencias de HRSV padrões do tipo HRSV A e B obtidas no GenBank. A distribuição dos genótipos de HRSV identificada durante o ano de 2013 na cidade de São Paulo. Foi verificada a co-circulação dos tipos A e B, com uma predominância do tipo A. As topologias das árvores obtidas pelo método de CLUSTAL W estão representadas nas figuras 3 e 4.

Figura 3 - Topologia da árvore do HRSV genótipo A obtida pelo método de Clustal W

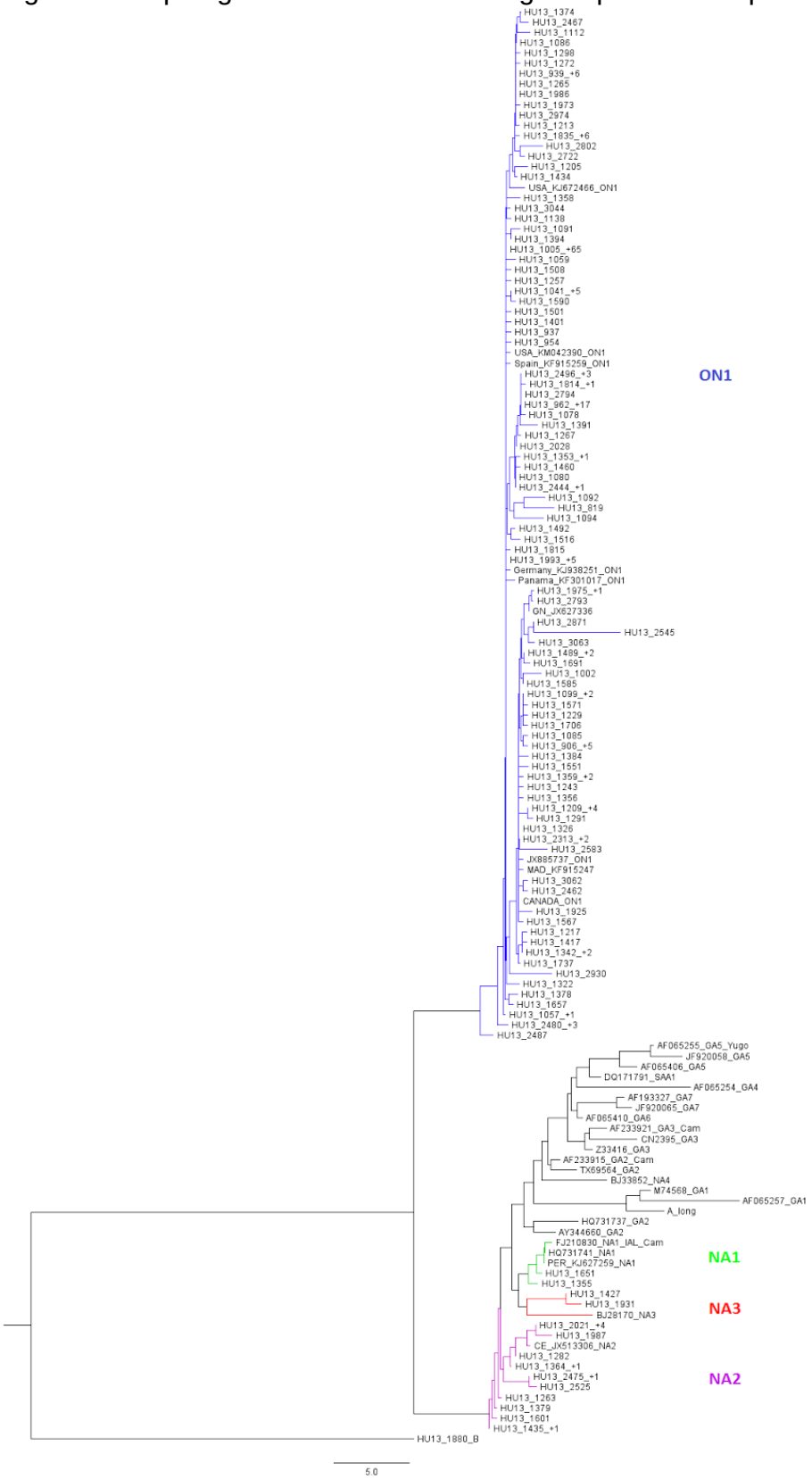


Figura 3: Topologia da árvore do HRSV genótipo A obtida pelo método de Clustal W. As 33 sequências adquiridas no GenBank estão incluídas, identificadas pelo seu genótipo e seu número de acesso. As 245 amostras brasileiras estão representadas por HU13.

Figura 4 - Topologia da árvore do HRSV genótipo B obtida pelo método de Clustal W.

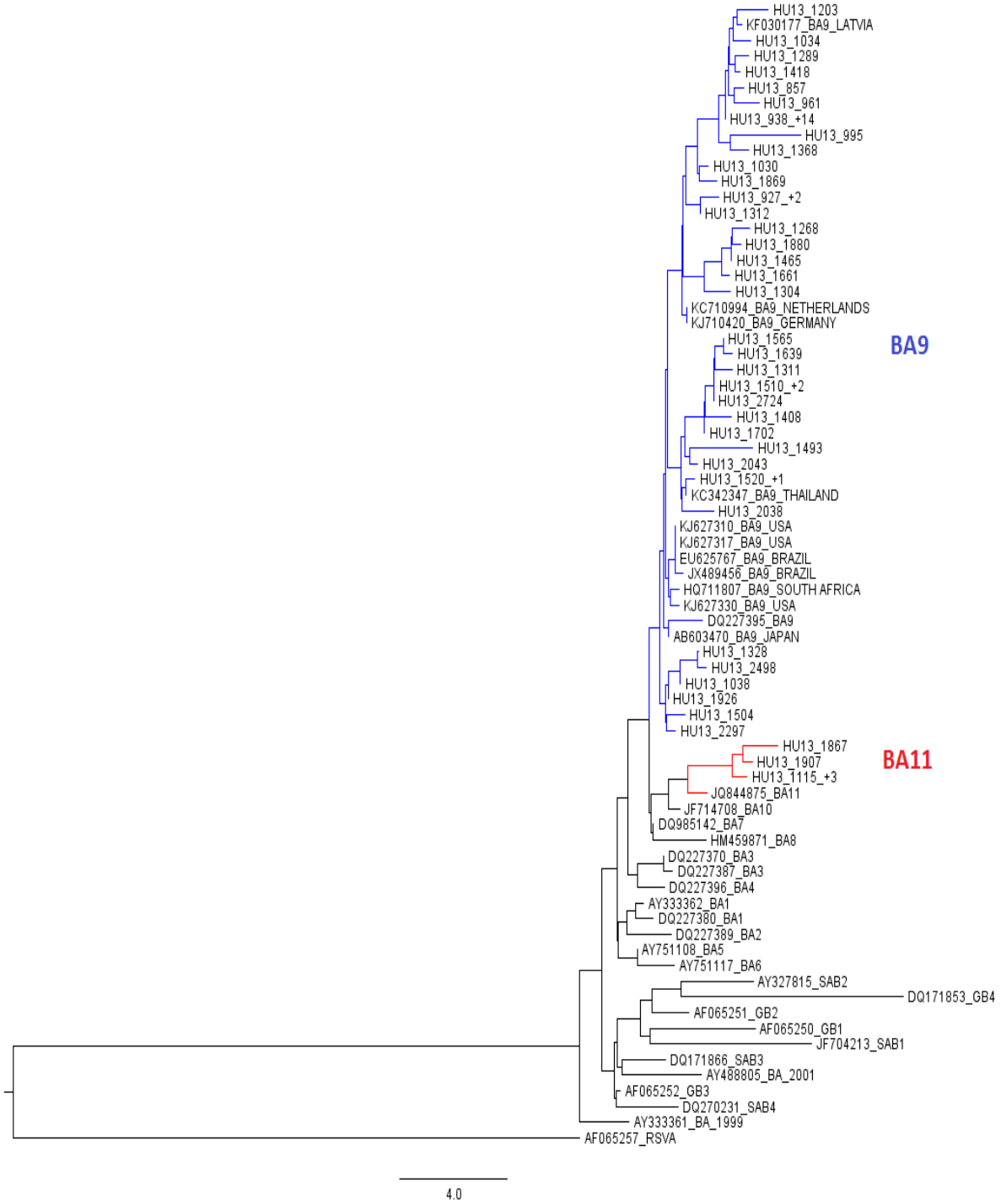


Figura 4 - Topologia da árvore do HRSV genótipo B obtida pelo método de Clustal W. As 35 sequencias adquiridas no GenBank estão incluídas, identificadas pelo seu genótipo e seu número de acesso. As 60 amostras brasileiras estão representadas por HU13.

4.4 Seleção das Amostras Idênticas

Com o alinhamento, pelo método de Clustal W do pacote DNAstar, entre as sequências nucleotídicas correspondentes ao intervalo de posição entre o nucleotídeo 634 e o 897/969 da região G2 do gene codificador da proteína G do HRSV (A e B), foi possível verificar que houveram inserções nesta região das amostras sequenciadas, incluindo a circulação dos genótipos novos de HRSV do tipo A e B, atualmente conhecidos.

Com o intuito de otimizar as análises subsequentes, utilizou-se, aleatoriamente, apenas uma amostra de cada grupo de sequências idênticas. Desta forma, foram utilizadas sequências que apresentaram pelo menos uma mudança no número ou posição dos nucleotídeos (Tabela 2).

Tabela 2 - Seleção das Amostras Idênticas.

Conjunto de Sequencias Idênticas						
Representante	**Genótipo**	**Representadas**				
HU13_906_+5	A_ON1	HU13_953	HU13_1371	HU13_1436	HU13_1494	HU13_1560
HU13_927_+2	B_BA9	HU13_1248	HU13_1293			
HU13_938_+14	B_BA9	HU13_858	HU13_1363	HU13_1387	HU13_1453	HU13_1498
		HU13_1266	HU13_1373	HU13_1430	HU13_1481	HU13_1570
		HU13_1343	HU13_1376	HU13_1452	HU13_1878	
HU13_939_+6	A_ON1	HU13_1207	HU13_1233	HU13_1303	HU13_1354	HU13_1467
		HU13_1563				
HU13_962_+17	A_ON1	HU13_1196	HU13_1330	HU13_1370	HU13_1423	HU13_1463
		HU13_1211	HU13_1331	HU13_1404	HU13_1428	HU13_1566
		HU13_1245	HU13_1336	HU13_1419	HU13_1443	HU13_1598
		HU13_1258	HU13_1365			
HU13_1005_+65	A_ON1	HU13_820	HU13_1043	HU13_1105	HU13_1167	HU13_1344
		HU13_833	HU13_1044	HU13_1111	HU13_1174	HU13_1357
		HU13_835	HU13_1056	HU13_1113	HU13_1175	HU13_1372
		HU13_850	HU13_1067	HU13_1117	HU13_1178	HU13_1439
		HU13_852	HU13_1070	HU13_1122	HU13_1188	HU13_1442
		HU13_859	HU13_1071	HU13_1143	HU13_1206	HU13_1451
		HU13_870	HU13_1072	HU13_1153	HU13_1223	HU13_1454
		HU13_968	HU13_1073	HU13_1156	HU13_1247	HU13_1484
		HU13_998	HU13_1084	HU13_1157	HU13_1261	HU13_1488
		HU13_1000	HU13_1093	HU13_1158	HU13_1262	HU13_1533
		HU13_1024	HU13_1097	HU13_1159	HU13_1294	HU13_1556
		HU13_1026	HU13_1100	HU13_1160	HU13_1299	HU13_1579
		HU13_1039	HU13_1103	HU13_1161	HU13_1332	HU13_1596
HU13_1041_+5	A_ON1	HU13_1063	HU13_1204	HU13_1227	HU13_1514	HU13_1577
HU13_1057_+1	A_ON1	HU13_1308				
HU13_1099_+2	A_ON1	HU13_1377	HU13_1397			
HU13_1115_+3	B_BA11	HU13_1135	HU13_1319	HU13_1402		
HU13_1209_+4	A_ON1	HU13_1185	HU13_1323	HU13_1450		
HU13_1342_+2	A_ON1	HU13_1473	HU13_1482			
HU13_1353_+1	A_ON1	HU13_1429				
HU13_1359_+2	A_ON1	HU13_1447	HU13_2628			

HU13_1364_+1	A_NA2	HU13_1395				
HU13_1435_+1	A_NA2	HU13_1559				
HU13_1489_+2	A_ON1	HU13_1461	HU13_1475			
HU13_1510_+2	B_BA9	HU13_1511	HU13_2599			
HU13_1520_+1	B_BA9	HU13_1523				
HU13_1814_+1	A_ON1	HU13_1597				
HU13_1835_+6	A_ON1	HU13_2640	HU13_2633	HU13_2629	HU13_2513	HU13_1906
		HU13_1479				
HU13_1975_+1	A_ON1	HU13_1928				
HU13_1993_+5	A_ON1	HU13_1990	HU13_1980	HU13_1915	HU13_1836	HU13_2299
HU13_2021_+4	A_NA2	HU13_1997	HU13_1987	HU13_1984	HU13_1970	HU13_1905
HU13_2313_+2	A_ON1	HU13_1977	HU13_1881			
HU13_2444_+1	A_ON1	HU13_2478				
HU13_2475_+1	A_NA2	HU13_1828				
HU13_2480_+3	A_ON1	HU13_2470	HU13_1479	HU13_2468	HU13_2303	
HU13_2496_+3	A_ON1	HU13_2465	HU13_2311	HU13_2041		

Tabela 2 - Seleção das Amostras Idênticas. Conjunto de amostras idênticas obtidas pelo alinhamento de nucleotídeos das sequencias brasileiras, utilizadas na análise filogenética. Na primeira coluna temos a amostra representante, seguida por + e o número de amostras idênticas à representante.

4.5 Detecção de Mutantes de Escape ao Palivizumab

A análise da proteína F foi realizada entre os nucleotideos 802 (268 Aa) a 828 (276 Aa) utilizando os padrões encontrados no *GenBank* pelos números U396661 (HRSV A) e KF640637 (HRSV B). Entre esses aminoácidos estão os epítopos de ligação do Palivizumab ao vírus, sendo eles N268, K272, S275 e N276. São conhecidos cinco tipos de mutações nestas regiões, sendo elas, N268I (A803T), K272E/Q (A814G/C), S275L/F (C824T) e N276S (A827G).

Sabe-se que o HRSV do tipo B possui a mutação 276 naturalmente em sua cepa selvagem. Em nossos resultados, observamos que 100% das amostras do tipo A também apresentaram essa mutação, sendo esta a única mutação encontrada por nós, como mostra a figura 5 e tabela 3. Nos HRSV do tipo B apenas uma amostra apresentou uma mutação diferente das já descritas anteriormente, na posição N262I (Tabela 3).

Figura 5 - Figura representativa das amostras com a mutação 276.

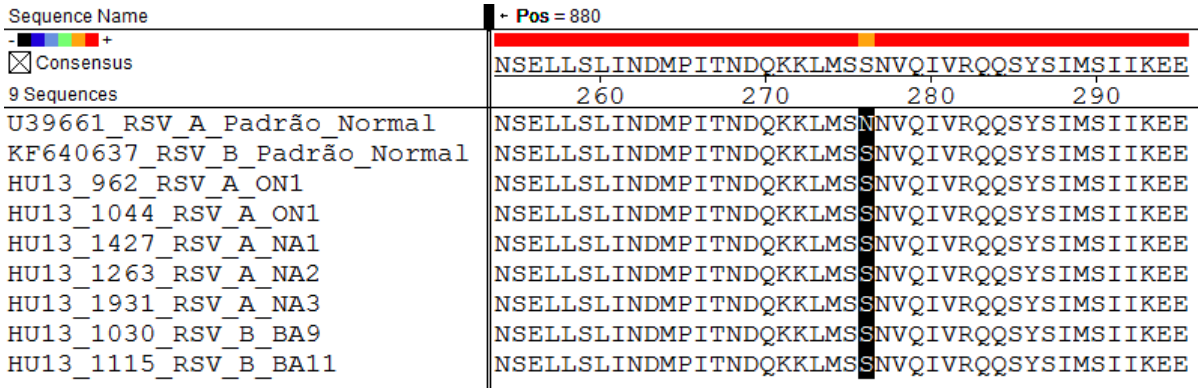


Figura 5 - Figura representativa das amostras com a mutação 276. Nesta figura, é destacada a mutação 276, que faz com que ocorra a mudança do aminoácido Asparagina (Amostra U39661_RSV_A_Padrão Normal), para uma Serina (Amostras HU13).

4.6 Seleção das Amostras a Serem Cultivadas e Testadas pelo Ensaio de Microneutralização *"in vitro"*

Todas as amostras sequenciadas, que apresentaram alguma mutação nos epítopos de ligação do Palivizumab, foram colocadas em cultura celular. Dentre as amostras que apresentaram apenas a mutação N276S, foram selecionadas, aleatoriamente, 10 amostras como mostra a tabela 3. Destas, todas as que cresceram em cultura celular, foram testadas pelo método de microneutralização in vitro e foi realizado o ensaio de IFI.

Tabela 3 - Amostras Sequenciadas.

RSV genotype	Nº strain with mutation	nt substituition	S / NSª	Predicted AA substituition	Antigenic site PZ - Amino Acid and nucleotide sequence
A_ON1	1	G816T / A827G	NS	K272N / N276S	LINDMPITNDQKNLMSS
A_ON1	216 (100 %)	A827G	NS	N276S	LINDMPITNDQKKLMSS
A_NA2	18 (100 %)	A827G	NS	N276S	LINDMPITNDQKKLMSS
A_NA1	7 (100 %)	A827G	NS	N276S	LINDMPITNDQKKLMSS
B_BA9	1	A785T	NS	N262I	LIIDMPITNDQKKLMSS
A_ON1	1	G810A / A827G	S / NS	K270 / N276S	TTAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAAAAAAGTTAATGTCCAGC
A_ON1	1	C825A / A827G	S / NS	S275 / N276S	TTAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCAAGC
B_BA11	3	A813G	S	K271	TTAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAGAAATTAATGTCAAGC
A_ON1	3	T778C / A827G	S / NS	L260 / N276S	CTAATCAATGATATGCCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAGC
A_ON1	1	T778C / A798C / A827G	S / S / NS	L260 / I266 / N276S	CTAATCAATGATATGCCTATCACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAGC

nt = nucleotide; ªS = Synonomous base substituition; NS = nonsynonomous base substitution; AA = amino acid; PZ= Palivizumab

Tabela 3 - Amostras Sequenciadas. O quadro mostra a sequência nucleotídica do sítio de ligação do Palivizumab, seguida pelas sequências normais encontradas nos genótipos A e B do HRSV. Para cada genótipo, foram destacadas as mutações encontradas, e a quantidade de amostras com a mesma mutação.

4.6.1 Cultivo das amostras

Para as amostras cultivadas, foi feito um primeiro teste de qPCR, para confirmar o crescimento viral, enquanto a presença de ECP ainda não era nítida, como mostra a tabela 4.

Tabela 4 - Resultado qPCR.

Amostra	Am. Clinica	T0	T1	Crescimento
HU13_1024	28,25	32	27,28	X X
HU13_1039	19	22	21	X
HU13_1041	17,81	20,47	20,01	X
HU13_1044	25,25	26,11	18,72	X X
HU13_1057	17	22	24	/
HU13_1059	19,34	18,68	18,75	X
HU13_1067	17	21	24	/
HU13_1073	20,45	23	22	X
HU13_1078	19,18	23,45	20,88	X X
HU13_1085	18,99	23,44	26,8	/
HU13_1086	25	20	23	/

Tabela 4 - Resultado qPCR. A tabela mostra o CT da amostra clínica, seguido pelo CT das passagens T0 e T1. Legenda: XX - alto crescimento viral; X - baixo crescimento. / - não apresentaram crescimento viral.

A partir da passagem T2, o crescimento viral foi acompanhado apenas pela presença de ECP, como mostra a figura 6.

Para as amostras HU13_1057, HU13_1085 e HU13_1086 que aparentavam não ter crescimento viral, nas suas passagens subsequentes foi dobrada a quantidade de inóculo e o crescimento viral pode ser observado pelo aparecimento de ECP.

As amostras HU13_1067 e HU13_1073, após a passagem T2, apresentaram ECP não característico de infecção por HRSV e foram testadas para outros vírus respiratórios. As amostras apresentaram-se positivas para Adenovírus e foram retiradas do trabalho.

Figura 6 - Fotografias Efeito Citopático.

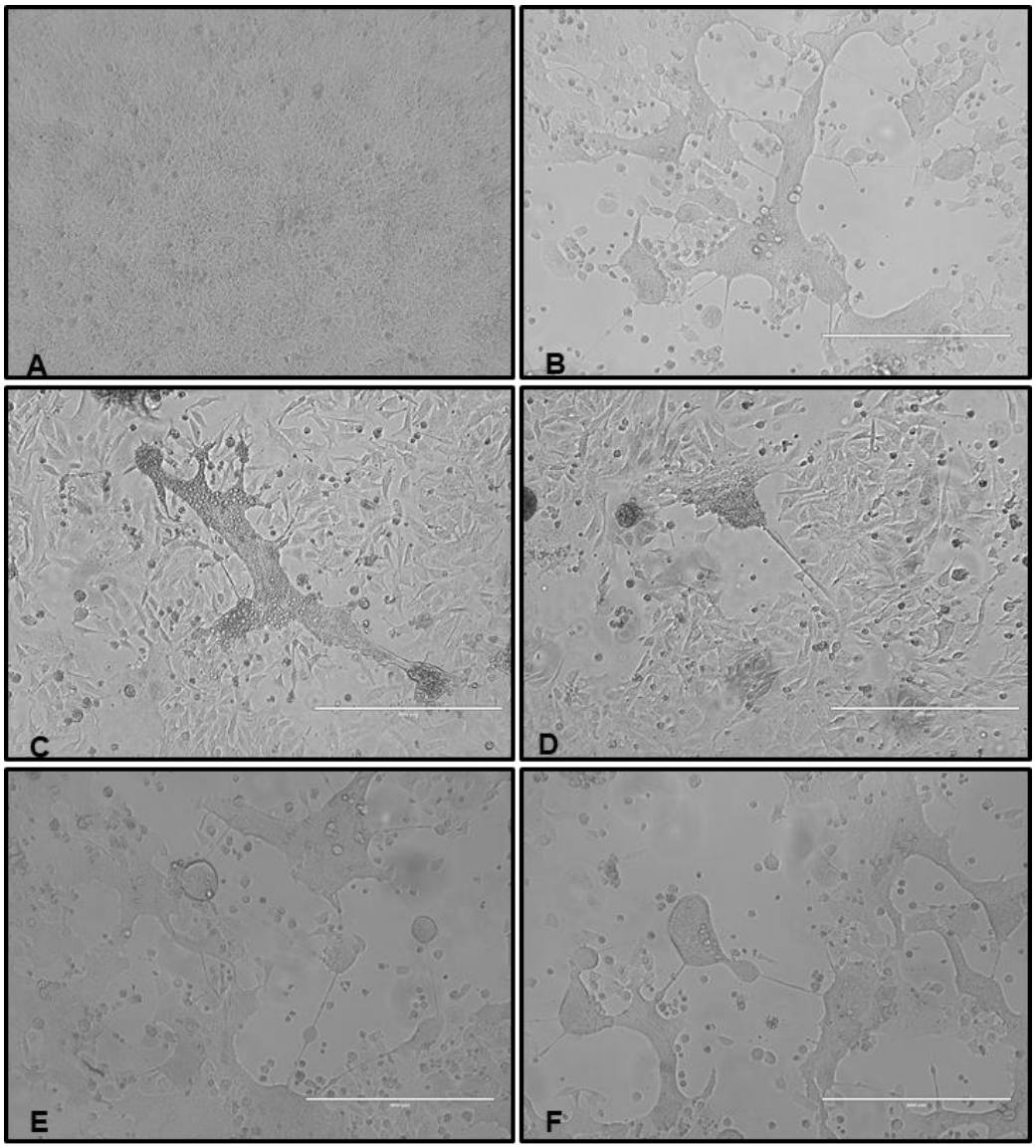


Figura 6: Efeito Citopático. A primeira foto (A), corresponde ao controle de células que é formado apenas por meio de cultura e célula. As fotos (B,C,D,E e F) são amostras inoculadas em HEp-2, onde podem ser observados grandes sincícios, de formato estrelado, característicos da infecção por HRSV.

4.6.2 Titulação das Amostras Cultivadas

Foram realizados para esta etapa dois testes diferentes, sendo eles ELISA e IFI, sendo o resultado mais específico aquele apresentado pelo ensaio de IFI. No teste feito por ELISA, o resultado encontra-se na tabela 5.

Tabela 5 - Resultado do Teste ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	C. Onda
HU13_1024	Cont.	Puro	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	nm
A	0,457	0,907	0,608	0,903	0,764	0,579	0,625	0,44	0,624	0,748	0,712	0,784	450
B	0,355	0,824	0,627	0,6	0,453	0,503	0,327	0,439	0,337	0,436	0,283	0,665	450
C	0,484	0,792	0,6	0,458	0,312	0,304	0,431	0,292	0,29	0,397	0,303	0,613	450
Média	0,432	0,841	0,612	0,654	0,510	0,462	0,461	0,390	0,417	0,527	0,433	0,687	
D	0,5	0,235	0,39	0,186	0,154	0,4	0,164	0,175	0,212	0,461	0,29	0,615	450
A_LONG	Cont.	Puro	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10	nm
F	0,59	0,842	0,523	0,425	0,212	0,143	0,306	0,175	0,42	0,357	0,407	0,509	450
G	0,194	0,841	0,518	0,663	0,199	0,301	0,14	0,137	0,189	0,366	0,421	0,501	450
H	0,419	0,962	0,628	0,556	0,317	0,289	0,518	0,493	0,681	0,39	0,676	0,785	450
Média	0,401	0,882	0,556	0,548	0,243	0,244	0,321	0,268	0,430	0,371	0,501	0,598	

Tabela 5 - Resultado do Teste ELISA. Na tabela pode-se observar cada uma das absorbâncias medidas, com as médias da triplicata.

Para o ensaio de imunofluorescência, os resultados foram obtidos tomando por positivo os poços que continham pelo menos uma célula infectada, bem marcada, que pudesse ser diferenciada de qualquer artefato técnico. Foram considerados negativos os poços que não apresentaram nenhuma célula fluorescente ou que continham fluorescência apenas em artefatos técnicos. Para a titulação das amostras os resultados obtidos encontram-se expostos na tabela 6 e figura 7.

Tabela 6 - Resultado da Titulação por IFI.

Amostra	DICT 50%	100DICT 50%
HU13_1024	$10^{-5,2}$	$10^{-3,2}$
HU13_1039	$10^{-6,5}$	$10^{-4,5}$
HU13_1041	$10^{-5,8}$	$10^{-3,8}$
HU13_1044	$10^{-5,75}$	$10^{-3,75}$
HU13_1057	$10^{-6,2}$	$10^{-4,2}$
HU13_1059	$10^{-6,8}$	$10^{-4,8}$
HU13_1078	$10^{-11,3}$	$10^{-9,3}$
HU13_1085	$10^{-8,53}$	$10^{-6,53}$
HU13_1086	falhou	Falhou
A-Long	$10^{-5,7}$	$10^{-3,7}$

Tabela 6 - Resultado da Titulação por IFI. A tabela demonstra o valor de DICT50% de cada amostra. Para o teste de microneutralização, foram usadas 100 DICT50% e para cada amostra a diluição utilizada foi mostrada na coluna 100 DICT50%.

Figura 7 - Fotografias do teste de IFI.

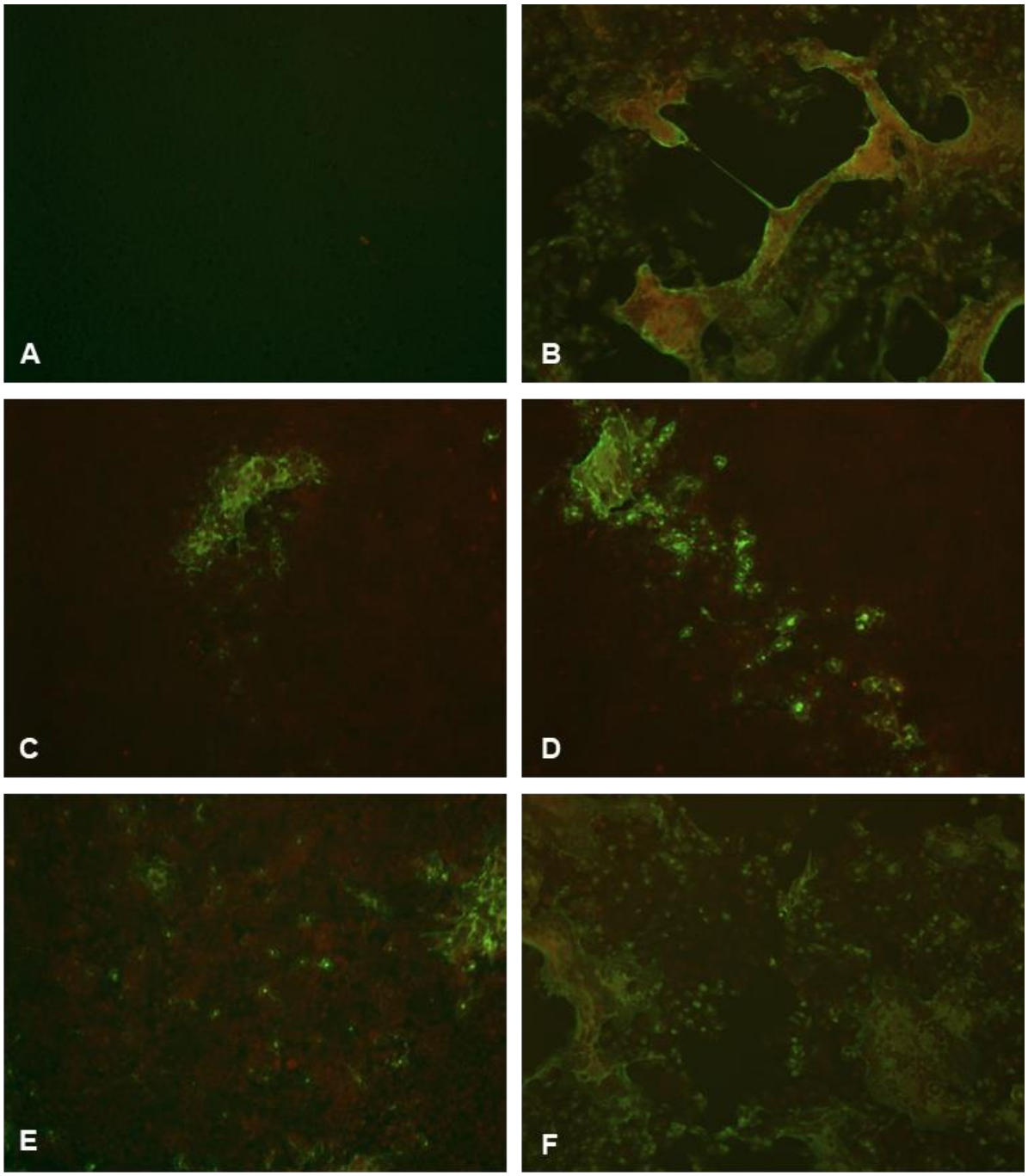


Figura 7: Fotografias do teste de IFI. Na foto A é observado o controle celular, sem nenhuma fluorescência. Nas fotos B, C, D, E e F, são observados ECPs, com as membranas celulares das células infectadas coradas em verde (conjugado FICT) e os citoplasmas das células infectadas e as células não infectadas corados em vermelho (Azul de Evans 0,002%).

4.6.3 Microneutralização "in vitro"

A neutralização do vírus pelo Palivizumab, ocorreu em todas as amostras testadas, porém essa neutralização ocorreu em diferentes diluições do monoclonal, como mostra a tabela 7. Na figura 8 observa-se o resultado do teste de microneutralização para a cepa padrão do HRSV A_Long. A fotografia B mostra o controle do vírus, onde pode ser observada a infecção das células, com formação de sincícios. Nas fotografias seguintes de C a L, pode-se observar o resultado da neutralização do HRSV pelo Palivizumab, em suas diferentes diluições.

Tabela 7 – Microneutralização**.**

		Diluições do Palivizumab									
Amostras	100 DICT50 %	1/5	1/20	1/80	1/320	1/1280	1/5120	1/20480	1/81920	1/327.680	1/1.310.720
HU13_1024	$10^{-3,2}$	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
HU13_1039	$10^{-4,5}$	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
HU13_1041	$10^{-3,8}$	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
HU13_1044	$10^{-3,75}$	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
HU13_1057	$10^{-4,2}$	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
HU13_1059	$10^{-4,8}$	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
HU13_1085	$10^{-6,53}$	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
A-Long	$10^{-3,7}$	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–

Tabela 7 - Microneutralização. Na tabela pode ser observado, para todas as amostras, em quais diluições do Palivizumab o vírus foi neutralizado, estando representado por (+). Nos campos marcados por (-), já não houve neutralização do vírus pelo Palivizumab.

Figura 8 - Fotografia do Resultado do Teste de Microneutralização para a Cepa Padrão do HRSV A_Long.

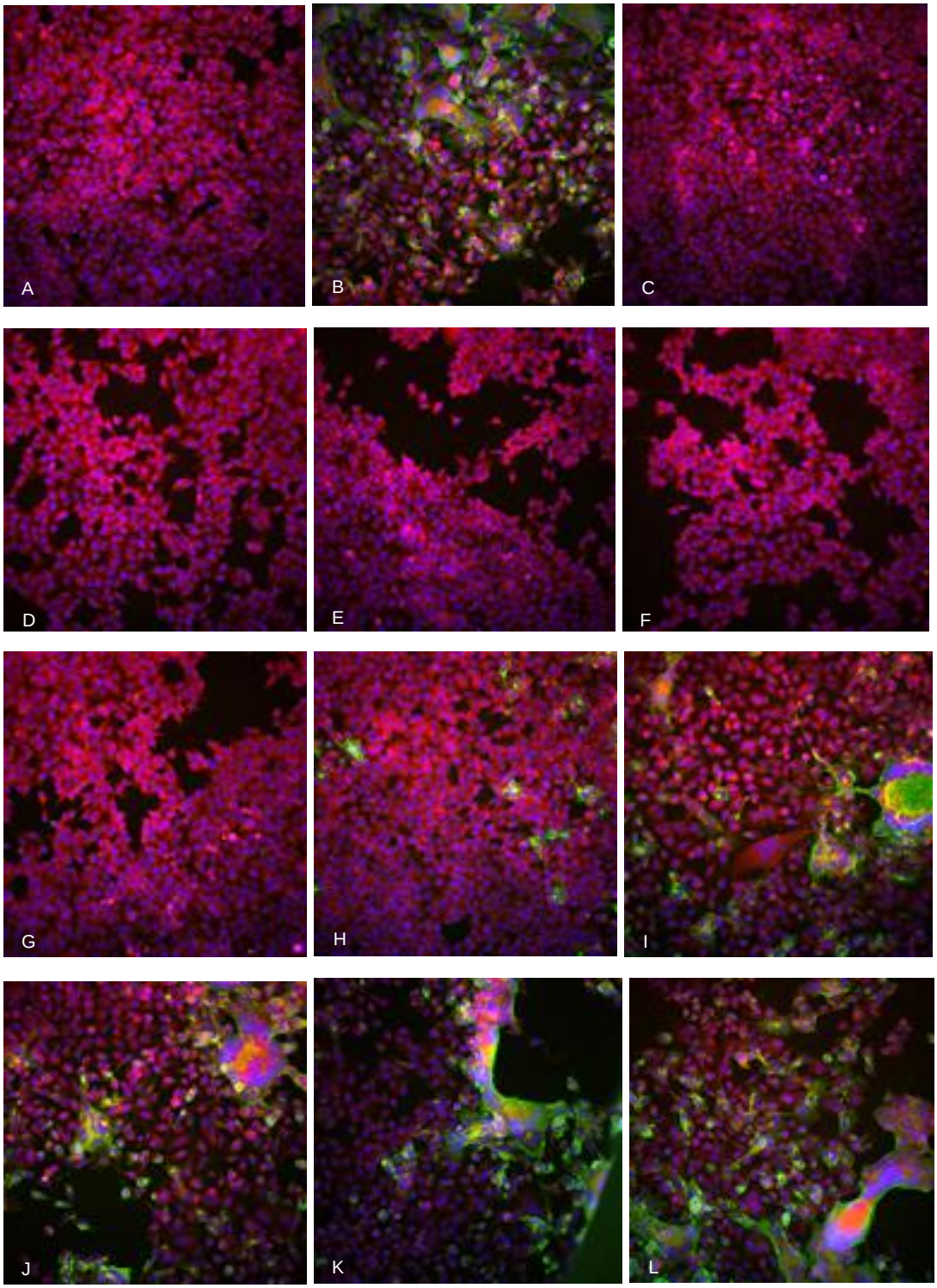


Figura 8 - Fotografia do Resultado do Teste de Microneutralização para a Cepa Padrão do HRSV A_Long. A fotografia (A) mostra o controle de células, onde pode ser observada a cultura celular íntegra. (B) controle de vírus, onde são observadas células infectadas, com formação de sincícios. Nas fotografias seguintes, pode-se observar o resultado da neutralização do HRSV pelo Palivizumab, em suas diferentes diluições: (C) 1: 5; (D) 1: 20; (E) 1: 80; (F) 1: 320; (G) 1: 1280; (H) 1: 5120; (I) 1: 20.480; (J) 1: 81.920; (K) 1: 327.680; (L) 1: 1.310.720. Com relação à coloração, podemos observar: rosa (azul de Evans 0,002%) - citoplasmas de células não infectadas; Verde (conjugado FICT) - células infectadas por HRSV e Azul (DAPI) - núcleos celulares

5 DISCUSSÃO

O HRSV é o principal causador de IRA em crianças do mundo todo e a maioria delas são infectadas antes de completarem um ano de vida e, praticamente todas são infectadas até seus dois anos (CDC, 2017). Em nosso trabalho foram utilizadas amostras provenientes de crianças internadas no HU-USP, onde pudemos observar uma maior frequência de infecção nas crianças menores de um ano (76,8%), entretanto o maior número de casos foi em crianças de até 6 meses de idade (59,4%), sendo que praticamente todas as crianças já haviam sido infectadas até os seus dois anos (97,7%). Apenas 2,3 % das crianças foram infectadas depois dos dois anos de idade, mas não sabemos se essa é a primo-infecção.

Nossa amostragem incluiu 200 crianças do sexo feminino e 229 do sexo masculino, o que nos levou a porcentagem de 46,6% de crianças do sexo feminino e 53,4% de crianças do sexo masculino, sem o uso do Palivizumab, mostrando que o HRSV pode atingir tanto meninos como meninas, independentemente, sem nenhuma predileção por gênero. Em estudo realizado com amostras de 2008, com crianças que fizeram o uso do Palivizumab, foram encontradas 52% de crianças do sexo masculino, corroborando com os nossos dados e mostrando que a infecção por HRSV não apresenta predileção por sexo, ainda que seja feito o uso do Palivizumab (Monteiro et al., 2014).

O HRSV possui uma sazonalidade bem definida em todo o mundo (CDC, 2017) e no Brasil com predominância nos meses de outono tardio e inverno (Oliveira et al., 2009). Nossos achados apresentaram sazonalidade com predominância no Outono, sendo que os principais meses de infecção por HRSV foram de Março a Junho, com pico em Abril, estando em concordância com os dados da literatura.

O HRSV é dividido em dois tipos, HRSV-A e HRSV-B, que evoluem separadamente em períodos diferentes de tempo (Mufson et al.,1985), apesar disso, circulam concomitantemente e ambos são responsáveis por epidemias no mundo. Entretanto, estas são mais comumente causadas pelo tipo A (Sullender, 2000; Gilca, 2006). O presente trabalho demonstrou que 80,3% das amostras foram de genótipos do tipo A e 19,7% de genótipos do tipo B.

Em 2012, foi detectado por Eshaghi et al., em Ontário no Canadá, um novo genótipo chamado de ON1, no tipo A, que possui uma duplicação de 72 nucleotídeos na porção C-terminal do gene G, a maior duplicação já descrita nesse grupo. Esse novo genótipo foi encontrado em 10% dos HRSV-A isolados pelo autor nas amostras

de 2010-2011. Outros autores observaram resultados semelhantes em um trabalho realizado na Itália com amostras obtidas entre 2011 e 2013 (Pierangeli et al., 2014), assim como o estudo realizado na Alemanha com amostras de 2012 e 2013 (Tabatabai et al., 2014). Outro estudo ainda, realizado na Ilha de Chipre, com amostras de 2012 e 2013, mostrou a dominância do genótipo ON1 nesses anos (Panayiotou et al., 2014). No Brasil, estudo publicado em 2017 por Vieira et al. identificou a presença do HRSV-ON1 utilizando amostras de crianças internadas na cidade de São Paulo de 2013 a 2015 mostrando que a circulação do novo genótipo praticamente substituiu todos os outros genótipos circulantes de HRSV-A. Em nosso estudo, 91,4% da amostras do grupo A pertenciam ao genótipo ON1, corroborando com os dados publicados recentemente por Vieira et al.,2017. Isso mostra que a entrada do novo genótipo pode ser uma tendência mundial e que esse genótipo pode ter uma maior capacidade de infectar as células ou possuir uma melhor capacidade de escape imunológico, sobrepondo-se a expressão dos outros genótipos.

As cepas do genótipo BA do HRSV-B foram descritas primeiramente na Argentina em 2003, em amostras de 1999. Essas cepas exibem uma duplicação 60 nucleotídeos na proteína G, que parece não estar associada com manifestações clínicas mais graves (Trento et al., 2003; Sato et al., 2005; Dapat et al., 2010). Em nossas amostras positivas para HRSV-B, encontramos 100% dos genótipos de BA-like, sendo 90% do genótipo BA9 e 10% do genótipo BA11.

A imunoprofilaxia por Palivizumab é recomendada para prevenir ITRS grave causada por HRSV em crianças com alto risco. As cepas de HRSV com mutações no sitio do Palivizumab inibem a ligação do anticorpo ao vírus. Estes fatos são amplamente estudados em crianças que receberam Palivizumab como profilaxia. Em 2010, Adams et al., mostrou que a mutação N276S na proteína F do HRSV A comprometeria a habilidade do Palivizumab de se ligar ao vírus, porém a mesma podia estar relacionada a mutação K272E. Em 2012, Zhu et al., e Papenburg et al., realizaram ensaios de microneutralização e mostraram que essa mutação não confere resistência ao Palivizumab. Em 2014, Xia et al., obtiveram os mesmos resultados que Zhu et al., 2011, e Papenburg et al. 2012. Em 2015, Oliveira et al estudando as amostras provenientes da rede de vigilância ativa para doença respiratória aguda e/ou febre (ARI) denominada de “New Vaccine Surveillance Network” (NVSN), nos Estados Unidos, em pacientes prospectivamente inscritos no NVSN durante os anos de 2001 a 2008 que relataram infecções por HRSV após receber o tratamento, identificou

mutações de resistência ao Palivizumab em 10,2% das crianças estudadas, sendo que uma delas usou o monoclonal (Oliveira et al., 2015).

Analisamos na proteína F do vírus, 207 amostras dos genótipos do tipo A e 36 dos genótipos do tipo B. Encontramos 100% das amostras do tipo A com a mutação N276S. Esses resultados mostram que essa mutação está crescendo e se adaptando podendo ser que esta se torne prevalente no HRSV do tipo A, assim como se sugere na China e no Canadá (Xia et al. 2014). As outras mutações não foram identificadas em nenhuma de nossas amostras, independentemente do tipo do HRSV.

Em concordância com os estudos apresentados por Xia et al., Zhu et. al. e Papenburg et.al., 100% das amostras testadas neste trabalho, que apresentavam apenas a mutação N276S, foram neutralizadas pelo Palivizumab. A grande maioria das amostras apresentam efeito ótimo para o Palivizumab a partir da diluição de 1: 320 até a diluição de 1: 1280, sendo que apenas duas das amostras apresentaram efeito ótimo a partir da diluição 1: 80 e uma delas foi neutralizada até a diluição 1: 20.480.

6 CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstra que no Brasil o uso do Palivizumab ainda é uma opção na profilaxia e tratamento de IRA em crianças com doenças de base e com risco de morte por infecção causadas por HRSV, devido não haver a ocorrência de cepas resistentes fenotipicamente a este monoclonal humanizado até o momento.

REFERÊNCIAS*

Adams O, Bonzel L, Kovacevic A, Mayatepek E, Hoehn T, Vogel M. Palivizumab-Resistant Human Respiratory Syncytial Virus Infection in Infancy. Clin Infect Dis 2010;51:185–8. doi:10.1086/653534.

Arruda E De, Hayden FG, Mcauliffe JF, De MA, Mota SB, Mcauliffe MI, et al. Acute Respiratory Viral Infections in Ambulatory Children of Urban Northeast Brazil Published by: Oxford University Press Stable URL: http://www.jstor.org/stable/30111895 Acute Respiratory Viral Infections in Ambulatory Children of Urban Northeast Brazi 1991;164:252–8.

Bates JT, Keefer CJ, Slaughter JC, Kulp DW, Schief WR, Crowe JE. Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. Virology 2014;454–455:139–44. doi:10.1016/j.virol.2014.02.010.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). [Internet]. Atlanta:Centers for Disease Control and Prevention; c2017 [update 2017 march; cited 2017 oct 05]. Available from: https://www.cdc.gov/rsv/research/us-surveillance.html

Collins PL, Huang YT, Wertz GW. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81:7683–7.

Collins PL, Mcintosh K, Chanock RM.Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.1950

Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. Virus Res 2011;162:80–99. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.020.

Collins PL, Mottet G. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. J Gen Virol 1991;72 (Pt 12:3095–101.

Collins PL, Wertz GW. The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide sequence of the mRNA and a related polytranscript. J Virol 1985;54:65–71.

Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, Kumaki A, Zaraket H, Dapat C, Oguma T, Yamaguchi M, Suzuki H. New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. J Clin Microbiol. 2010; 48(9):3423-7. doi: 10.1128/JCM.00646-10.Epub2010Jul7

Eshaghi AR, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus a strains circulating in Ontario: A novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. PLoS One 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0032807.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

Fry AM, Chittaganpitch M, Baggett HC, Peret TC, Dare RK, Sawatwong P, Thamthitiwat S, Areerat P, Sanasuttipun W, Fischer J, Maloney SA, Erdman DD, Olsen SJ, The burden of hospitalized lower respiratory tract infection due to respiratory syncytial virus in rural Thailand, PLoS ONE 5 (2010) e15098.

Gan S-W, Tan E, Lin X, Yu D, Wang J, Tan GM-Y, et al. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. J Biol Chem 2012;287:24671–89. doi:10.1074/jbc.M111.332791.

García J, Barreno BG, Vivo A, Melero JA. Cytoplasmic Inclusions of Respiratory Syncytial Virus-Infected Cells: Formation of Inclusions Bodies in Transfected Cells That Coexpress the Nucleoprotein, the Phosphoprotein, and the 22K Protein. Virology 1993; 195: 243-7.

Ghildyal R, Ho A, Wagstaff KM, Dias MM, Barton CL, Jans P, et al. Nuclear Import of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Mediated By Importin β1 Independent of Importin α. Biochemistry 2005;44:12887–95. doi:10.1021/bi050701e.

Gilca R, De Serres G, Tremblay M, Vachon ML, Leblanc E, Bergeron MG, et al. Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. J Infect Dis 2006;193:54–8. doi:10.1086/498526.

Hardy RW, Wertz GW. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. J Virol 1998;72:520–6.

Huang YT, Collins PL, Wertz GW. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: Identification of a fourth envelope-associated protein. Virus Res 1985;2:157–73. doi:10.1016/0168-1702(85)90246-1.

Intternational Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2017. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/pneumoviridae. Acesso em: 05 de utubro. 2017.

Ismail N, Reisner B. Update on Human Respiratory Syncytial Virus. Clin Micobiology Newsl 2001;23:91–7.

Johnson S, Oliver C, Prince G a, Hemming VG, Pfarr DS, Wang SC, et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. J Infect Dis 1997;176:1215–24. doi:10.1086/514115.

Kiss G, Holl JM, Williams GM, Alonas E, Vanover D, Lifland AW, et al. Structural Analysis of Respiratory Syncytial Virus Reveals the Position of M2-1 Between the Matrix Protein and the Ribonucleoprotein Complex. J Virol 2014;88:7602–17. doi:10.1128/JVI.00256-14.

Lambert DM. Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. Virology 1988;164:458–66. doi:10.1016/0042-6822(88)90560-0.

Lay MK, González PA, León MA, Céspedes PF, Bueno SM, Riedel CA, et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. Microbes Infect 2013;15:230–42. doi:10.1016/j.micinf.2012.11.012.

Li D, Jans DA, Bardin PG, Meanger J, Mills J, Ghildyal R, et al. Association of respiratory syncytial virus M protein with viral nucleocapsids is mediated by the M2-1 protein. J Virol 2008;82:8863–70. doi:10.1128/JVI.00343-08.

Mink MA, Stec DS, Collins PL. Nucleotide sequences of the 3′ leader and 5′ trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. Virology 1991;185:615–24. doi:10.1016/0042-6822(91)90532-G.

Money V a, McPhee HK, Mosely J a, Sanderson JM, Yeo RP. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:4441–6. doi:10.1073/pnas.0805740106.

Monteiro AIMP, Bellei NCJ, Sousa AR, dos Santos AMN, Weckx LY. Infecções Respiratórias Em Crianças Menores De Dois Anos De Idade Submetidas a Profilaxia Com Palivizumabe. Rev Paul Pediatr 2014;32:152–8. doi:10.1590/0103-0582201432214813.

Moraes CTP, Oliveira DBL, Campos ACA, Bosso PA, Lima HN, Stewien KE, et al. Genetic variability in G2 and F2 region between biological clones of human respiratory syncytial virus with or without host immune selection pressure. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015;0:00–00. doi:10.1590/0074-02760140299.

Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. J Gen Virol 1985;66 (Pt 10:2111–24. doi:10.1099/0022-1317-66-10-2111.

Murray J, Saxena S, Sharland M. Preventing severe respiratory syncytial virus disease: passive, active immunisation and new antivirals. Arch Dis Child 2014;99:469–73. doi:10.1136/archdischild-2013-303764.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia médica. 6ª edição. Elsevier Mosby, 2009. p 512.

Ogra PL. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. Paediatr Respir Rev 2004;5. doi:10.1016/S1526-0542(04)90023-1.

Oliveira, Danielle Bruna Leal Edi Durigon EL, Carvalho ACL, Leal AL, Souza TS, Thomazelli LM, Moraes CTP, et al. Epidemiology and Genetic Variability of Human Metapneumovirus During a 4-Year-Long Study in Southeastern Brazil. J Med Virol 2009;81:915–21. doi:10.1002/jmv.

Oliveira DBL, Iwane MK, Prill MM, Weinberg G a., Williams J V., Griffin MR, et al. Molecular characterization of respiratory syncytial viruses infecting children reported to have received palivizumab immunoprophylaxis. J Clin Virol 2015;65:26–31. doi:10.1016/j.jcv.2015.01.016.

Panayiotou C, Richter J, Koliou M, Kalogirou N, Georgiou E, Christodoulou C. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010–2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity. Epidemiol Infect 2014;142:2406–

11. doi:10.1017/S0950268814000028.

Papenburg J, Carbonneau J, Hamelin M-È, Isabel S, Bouhy X, Ohoumanne N, et al. Molecular Evolution of Respiratory Syncytial Virus Fusion Gene, Canada, 2006–2010. Emerg Infect Dis 2012;18:120–4. doi:10.3201/eid1801.110515.

Pierangeli A, Trotta D, Scagnolari C, Ferreri ML, Nicolai A, Midulla F, et al. Rapid spread of the novel respiratory syncytial virus a on1 genotype, central Italy, 2011 to 2013. Eurosurveillance 2014;19:1–10. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.26.20843.

Pollack P, Groothuis JR. Development and use of palivizumab (Synagis): A passive immunoprophylactic agent for RSV. J Infect Chemother 2002;8:201–6. doi:10.1007/s10156-002-0178-6.

Robinson K a, Odelola O a, Saldanha IJ, Mckoy N a. Palivizumab for prophylaxis against respiratory syncytial virus infection in children with cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev 2013. doi:10.1002/14651858.CD007743.pub4.

Sanz MC, Kew OM, Andesrson LJ. Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein G among subgroup A respiratory syncytial viruses. Virus Res 1994; 33: 203-17. doi: 10.1016/0168-17029(94)90103-1.

Sato M., Saito R., Sakai T., Sano Y., Nishikawa M., *et al.* Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. J Clin Microb 43: 36–40, 2005.

Shadman K a, Wald ER. A review of palivizumab and emerging therapies for respiratory syncytial virus. Expert Opin Biol Ther 2011;11:1455–67.

Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015. Lancet 2017;In Press:1–13. doi:10.1016/S0140-6736(17)30938-8.

Simoes EAF. Respiratory syncytial virus infection. Lancet 1999;354:847. doi:10.1016/S0140-6736(99)80040-3.

Sullender WM. Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. Clin Microbiol Rev 2000;13:1–15. doi:10.1128/CMR.13.1.1-15.2000.

Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J, Grulich-Henn J, Schnitzler P. Novel Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genotype ON1 Predominates in Germany during Winter Season. PLoS One 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0109191.

Tomé L, Frabasile S, Candia C, Pittini A, Farina N, Melero JA, et al. Selection and characterization of human respiratory syncytial virus escape mutants resistant to a polyclonal antiserum raised against the F protein. Arch Virol 2012;157:1071–80. doi:10.1007/s00705-012-1274-2.

Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, Palomo C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. J Gen Virol. 2003; 84(Pt 11): 3115-20.

Vieira SE, Thomazelli LM, de Paulis M, Ferronato AE, Oliveira DB, Martinez MB, Durigon EL. Infections Caused by HRSV A ON1 Are Predominant among Hospitalized Infants with Bronchiolitis in São Paulo City.Biomed Res Int. 2017;2017:3459785. doi: 10.1155/2017/3459785.

Xia Q, Zhou L, Peng C, Hao R, Ni K, Zang N, et al. Detection of respiratory syncytial virus fusion protein variants between 2009 and 2012 in China. Arch Virol 2014;159:1089–98. doi:10.1007/s00705-013-1870-9.

Zhao X, Chen F-P, Megaw AG, Sullender WM. Variable resistance to palivizumab in cotton rats by respiratory syncytial virus mutants. J Infect Dis 2004;190:1941–6. doi:JID32724 [pii] 10.1086/425515 ET - 2004/11/06.

Zheng H, Peret TC, Randolph VB, Crowley JC, Anderson LJ. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strains of respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol. 1996;34:334-7

Zhu Q, McAuliffe JM, Patel NK, Palmer-Hill FJ, Yang CF, Liang B, et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. J Infect Dis 2011a;203:674–82. doi:10.1093/infdis/jiq100.

Zhu Q, McAuliffe JM, Patel NK, Palmer-Hill FJ, Yang CF, Liang B, et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. J Infect Dis 2011b;203:674–82. doi:10.1093/infdis/jiq100.

Zimmer G, Budz L, Herrler G. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. J Biol Chem 2001a;276:31642–50. doi:10.1074/jbc.M102633200.

Zimmer G, Trotz INA, Herrler G. N-Glycans of F Protein Differentially Affect Fusion Activity of Human Respiratory Syncytial Virus 2001b;75:4744–51. doi:10.1128/JVI.75.10.4744.