PATRICIA ALVES RAMOS BOSSO

***Ausência de Escapes Mutantes para o medicamento
Palivizumab[®] do Vírus Respiratório Sincicial Humano (hRSV)
circulante, na cidade de São Paulo durante o ano de 2004***

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo

2008

PATRICIA ALVES RAMOS BOSSO

Ausência de Escapes Mutantes para o medicamento Palivizumab[®] do
Vírus Respiratório Sincicial Humano (hRSV) circulante, na cidade de
São Paulo durante o ano de 2004

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

São Paulo

2008

DEDICATÓRIA

A Deus, pois tem sido meu refúgio e fortaleza em todos os momentos e a meu filho Yuri, que me fez compreender o significado da palavra Amor, bastando um sorriso seu para iluminar minha vida.

*Viver é acalantar sonhos e
esperanças, fazendo da fé a nossa
inspiração maior. É buscar nas pequenas
coisas, um grande motivo para ser feliz!"*

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Paulo e Benedita, por seu amor, incentivo e valiosos ensinamentos que forjaram meu caráter, graças ao qual espero ser motivo de orgulho para eles com meu trabalho e com minha vida.

À minha família preciosa, que são uma dádiva para mim. Minhas amadas irmãs, Ana Paula e Fabíola, e meus sobrinhos Caroline, Julia, Emanuel e João Pedro, que alegam e enlouquecem nossas vidas com o ruído de risos, correrias e desentendimentos. São esses momentos que sempre me acompanham com um “gostinho” de querer mais...

Ao querido amigo Valdir Bosso, por me dar o maior presente que possuo - meu filho. Por ser um homem digno e estar sempre disposto a ajudar. Considero-me uma mulher de sorte por haver convívio com alguém como você.

À minha querida amiga, Ithana por sua amizade, por todos os momentos até agora compartilhados. Você é um exemplo por seu caráter, bom humor e lealdade, características que me incentivam a acreditar na boa vontade humana e também a meu compadre Buba.

À minha querida amiga, Lilia Mara. *Doce* - esta é sua palavra. Compartilharmos a vida no laboratório e fora dele. Amizade que espero cultivar por toda vida e, além disso, dividimos o carinho por Cesar Dinola, meu querido amigo.

Ao meu amigo César Nascimento, por permitir que eu faça parte de sua vida, pela cumplicidade, por seu bom humor e carinho.

À minha querida Amiga Danivet, a segunda pessoa com maior força de vontade que conheço e que me inspira, quando penso em esmorecer.

À Priscila Kosaka, minha amiga de aventura. Por sonharmos acordadas, desejos em comum e por ser, inúmeras vezes, como alguém de minha própria família.

Ao meu amigo Luiz Farinha, que me deu a honra de conhecê-lo. Uma pessoa muito especial, que fala sedutora e apaixonadamente daquilo que gosta.

Aos meus amigos Alessandra, Adriana, Ana Paula, Cristina, Maurício, Paulo, Ricardo, Rogério, Solange e Willian, que permanecem em minha cidade natal, Pederneiras. A distância física não permite a convivência, mas vocês estarão sempre em minha memória aonde quer que eu vá.

“Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só.”

Amir Klink.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof^o Edison Luiz Durigon, por transmitir seus conhecimentos sem nenhuma afetação. Ele é uma pessoa incomum, pois compreende e aceita diferentes personalidades, incentivando seu potencial. Obrigada por todas as oportunidades e valiosos ensinamentos, incluindo sua paixão pela ciência.

Aos meus primeiros incentivadores os professores João Manuel Grisi Candeias e João Pessoa de Araujo Jr., que me abriram as portas de seu laboratório na UNESP-Botucatu.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Virologia Clínica e Molecular que fizeram desses anos uma grande aventura, de crescimento pessoal e profissional, pela troca de experiências, pelos debates e também pelos embates. Foi uma grande honra viver esse período de minha vida ao lado de cada um de vocês: Ana Paula, Adélia, Andréia, Angélica, Ariane, Bruno, Carol, Claudinha, Claudionor, Danielle Bruna, Dyana, Eduardo “Edu”, Felipe, Janssen, Juliana Rodrigues, Hildener, Larissa, Lilian, Luciano, Thereza “Teca”, Maria Lucia “Malu”, Miguel, Silvana, e Thatiane “Tati”.

Aos colegas do laboratório do Prof^o Armando Ventura, pelo convívio, pela amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar. Em especial ao meu amigo Cassiano, que me ajudou a resolver algumas dúvidas me fazendo progredir em meu trabalho e aos meninos: Fernando e Rodrigo Tamura. Também incluo nossa amiga Zilda que maravilhoso!

Aos colegas da Micologia, pelos momentos de descontração e vizinhança pacífica.

Aos colegas do Laboratório da Prof.^a Maria Lúcia Racz, Veridiana, Thabata e Hugo pelo companheirismo

.

A Prof.^a Charlotte, por ajuda e as suas orientandas: Dani, Fernanda, Jô e Juliana, pela constante troca de experiências e momentos de descontração.

A Prof.^a Dolores e as suas alunas pela convivência durante esses anos.

A Prof.^a Viviane Botosso que é “prata da casa”. Sempre houve uma ligação estreita entre os laboratórios, proporcionando constante troca de conhecimentos e a seus alunos.

Aos Técnicos do Laboratório de Virologia: José e Fabiana. Eles foram fundamentais para conclusão do projeto.

As secretárias da pós-graduação do ICB II (Microbiologia) Aninha, Naide e Alice que sempre auxiliaram nos processos burocráticos com atenção e profissionalismo.

Aos pais que permitiram que seus filhos fizessem parte deste estudo. Espero que no futuro nosso trabalho contribua de alguma maneira, para melhorar as condições de tratamento em crianças acometidas pelo hRSV, minimizando o sofrimento da criança e de seus familiares.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro, sob a forma de uma bolsa de doutorado.

“Nas coisas pequenas, mais que nas grandes, muitas vezes reconhecemos o valor dos homens. Talvez eu represente apenas mais um que parte, mas na partida levarei saudades, deixando o meu agradecimento a todos pela ajuda e dedicação.”

RESUMO

Bosso, PAR. Ausência de Escapes Mutantes para o medicamento Palivizumab® do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) circulante, na cidade de São Paulo durante o ano de 2004.

O Vírus Respiratório Sincicial Humano (hRSV) é o patógeno mais comumente associado à doença do trato respiratório inferior em lactentes e crianças. Altas taxas de admissão hospitalar, frequência de casos e severidade da doença foi demonstrado em crianças abaixo de dois anos de vida. A frequência de casos positivos durante o ano de 2004 foi de 43% (188/435) das amostras coletadas no Hospital Universitário/USP na cidade de São Paulo e os isolados brasileiros do grupo A e B agruparam-se nos genótipos previamente caracterizados: GA2, GA5, SAB1, SAB4 e BA *like*, respectivamente. Palivizumab (PZ) é atualmente o único anticorpo monoclonal disponível para uso em humanos para infecções causadas pelo hRSV. Foi observado o surgimento de escapes mutantes ao PZ *in vivo* e *in vitro*, sendo que estas mutações no gene F determinam resistência ao Palivizumab. Nós avaliamos através de seqüenciamento da região F1 a ocorrência de escapes mutantes em aspirados de nasofaringe. Realizamos RT-PCR para amplificação de fragmentos do gene F e as seqüências de nucleotídeos foram determinadas. As 30 seqüências analisadas não revelaram mutações ao PZ e através desses dados podemos aferir que o PZ usado profilaticamente em grupos específicos da população é eficaz.

Palavras chaves: Vírus Respiratório Sincicial Humano; Infecção Aguda do Trato Respiratório; Escapes Mutantes; Palivizumab.

ABSTRACT

Bosso, PAR. Absence of Palivizumab[®] Escapes Mutant for the Respiratory Syncytial Virus (RSV) circulating, in the city of São Paulo during the year of 2004.

The Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the most common cause of lower respiratory tract disease in infants and young children. RSV has high rates of hospital admission and the frequency and severity of infections caused by RSV were assessed in children ≤ 2 years of age. In our study, the frequency of RSV detection during 2004 was 43% (188/435) of the samples collected from Hospital University/USP in São Paulo city. Partial sequences of G protein genes from antigenic groups A and B were clustered into previously characterized genotypes: GA2, GA5, SAB1, SAB4 e BA like, respectively. Palivizumab (PZ) is the only monoclonal antibody currently available for uses in humans against RSV infectious disease. Here we evaluated the potential for PZ-resistant RSV mutants to arise in clinical samples. Samples from aspirates nasopharyngeal, reverse-PCR-amplified F gene fragments, and the nucleotide sequences were determined. In thirty sequences no revealed F gene mutations. This work shows that Palivizumab prophylaxis is safe and efficacious.

Key words: respiratory syncytial virus, acute respiratory infections, escape mutants, Palivizumab.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das partículas dos pneumovírus	19
Figura 2. Esquema Representativo do Vírus Respiratório Sincicial Humano RNA polaridade negativa	20
Figura 3. Brotamento Viral	27
Figura 4. Foto ilustrativa de um bebe pré-maturo acometido de infecção pelo hRSV e recebendo suporte de oxigenoterapia	30
<i>Figura 5. RT-PCR para detecção da proteína</i>	<i>54</i>
Figura 6. Alinhamento das seqüências da proteína F com ênfase nas posições 816, 827 e 828	55
Figura 6. Árvore Genealógica com seqüências da proteína F e os genótipos da proteína G	56
Fluxograma do trabalho	50
Tabela 1. Primers utilizados para tipagem das amostras por seqüenciamento	45
<i>Gráfico 1. Correlação de casos hRSV positivos e Faixa Etária</i>	<i>51</i>
<i>Gráfico 2. amostras coletadas x amostras positivas para hRSV</i>	<i>52</i>
Gráfico 3. Sazonalidade através do genótipo	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Histórico</i>	18
1.2	<i>Classificação e Características Virais</i>	19
1.3	<i>Ciclo Replicativo</i>	25
1.4	<i>Características Antigênicas</i>	27
1.5	<i>Aspectos Clínicos</i>	29
1.6	<i>Imunologia do hRSV</i>	32
1.7	<i>Epidemiologia</i>	34
1.8	<i>Alvos Terapêuticos na Infecção pelo Vírus Sincicial Respiratório</i>	36
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	<i>Casuística</i>	42
3.2	<i>Diagnóstico do hRSV</i>	42
3.3	<i>Processamento das amostras</i>	42
3.4	<i>Isolamento em cultura de células</i>	42
3.5	<i>Amostras clínicas</i>	43
3.6	<i>RT-PCR</i>	43
3.6.1	<i>Extração do RNA total</i>	43
3.6.2	<i>Obtenção do cDNA (RT)</i>	44
3.7	<i>Diagnóstico por GeneScan</i>	44
3.8	<i>Primers utilizados para tipagem das amostras por seqüenciamento</i>	45
3.9	<i>Amplificação da seqüência parcial do gene G</i>	45
3.10	<i>Análise dos produtos amplificados do gene G</i>	46
3.11	<i>Purificação dos produtos amplificados</i>	46
3.12	<i>Tipagem por seqüenciamento do gene G</i>	47

<i>3.13 Purificação da reação de seqüenciamento</i>	47
<i>3.14 Processamento, alinhamento e análises genealógicas das seqüências do gene G</i>	48
<i>3.15 Amplificação da seqüência do gene F</i>	48
<i>3.16 Análise dos produtos amplificados do gene F</i>	48
<i>3.17 Purificação dos produtos amplificados do gene F</i>	49
<i>3.18 Seqüenciamento do gene F do hRSV</i>	49
<i>3.19 Análise da variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos</i>	49

4 RESULTADOS 50

<i>4.1 Fluxograma do trabalho</i>	50
<i>4.2 Diagnóstico do hRSV através do método de RT-GeneScan-PCR</i>	50
<i>4.3 Distribuição de Casos Positivos em Relação à Faixa Etária</i>	51
<i>4.4 Sazonalidade do Vírus Respiratório Sincicial Humano</i>	52
<i>4.5 Tipagem das amostras de hRSV coletadas durante o ano de 2004: nos grupo A e B</i>	52
<i>4.6 Sazonalidade dos diferentes Genótipos circulantes nas amostras de 2004</i>	53
<i>4.7 RT-PCR para amplificação do gene da proteína F do hRSV</i>	53
<i>4.8 Amostras clinicas positivas propagadas em cultura celular</i>	54
<i>4.9 Seqüenciamento parcial da Proteína F do hRSV</i>	54
<i>4.10 Comparação entre as seqüências da Proteína F e os Genótipos do hRSV</i>	56

5 DISCUSSÃO 57

6 CONCLUSÕES 68

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

ANEXOS 1 96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O Vírus Sincicial Respiratório (Respiratory Syntycial Vírus - RSV) foi isolado em 1956, em chimpanzés que apresentavam sintomas semelhantes ao resfriado comum (Morris et al., 1956). Em anos subseqüentes, um vírus semelhante foi isolado, oriundo de crianças que apresentaram infecção no trato respiratório inferior (Chanock et al., 1957a,b, 1961). Sua denominação, hRSV (Repiratory Syncytial Virus – hRSV), deu-se por sua predileção pelo trato respiratório e também por ocasionar uma histopatologia característica nas células infectadas pelo vírus, com formação de sincícios observada em cultura de células (Kim et al., 2006).

Atualmente, o hRSV é muito estudado em diversos núcleos de pesquisa no mundo todo; através desses dados, podemos dizer que ele é o agente viral mais freqüente relacionado a casos de infecções no trato respiratório (TRI) em recém-nascidos, lactentes e crianças em idade pré-escolar. Segundo dados da OMS¹, anualmente 64 milhões de pessoas se infectam pelo hRSV e, destas, 160.000 morrem por complicações causadas pela infecção viral.

Segundo diversos autores, aproximadamente 95% das crianças apresentam sua primeira infecção pelo hRSV nos primeiros dois anos de vida, sendo que, destes, a maioria se dá logo nos primeiros meses (Vieira et al., 2001; Linette et al., 2003). Este vírus acomete todas as faixas etárias e reinfecções são comuns durante toda a vida; mas os sintomas clínicos em crianças depois da fase pré-escolar e adultos possuem uma sintomatologia branda (Hall et al., 1991; Walsh et al., 2004). Em estudos feitos em algumas populações de idosos comprovaram que o hRSV também causa doença significativa nessa faixa etária, especialmente após 60 anos os idade. Estes dados puderam associar o hRSV a altos índices de mortalidade quando comparados a outros trabalhos referentes ao vírus influenza, considerado um importante patógeno nessa faixa etária específica, demonstrando que o hRSV acomete essa faixa etaria com maior morbidade do que o vírus influenza em anos não pandêmicos (Falsey et al., 1995; Elliot et al., 2008; Kawai et al., 2008).

■ 1-www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index3.html, 2008

1.2 Classificação e Características Virais

O hRSV pertence à Ordem *Mononegavirales*, Família *Paramyxoviridae*, Sub-família *Pneumovirinae* e Gênero *Pneumovirus*. É um vírus envelopado com morfologia pleomórfica. Seu tamanho varia de 150 a 350 nanômetros (nm) de diâmetro, contendo um nucleocapsídeo helicoidal, com espículas externas, formadas por glicoproteínas que variam de 12 e 15 nm. Seu genoma é formado por uma fita simples de RNA com polaridade negativa composto por 15.000 nucleotídeos; estes codificam dez RNAm, e cada RNAm codifica um único polipeptídeo (Figura1) (Wertz 2004; Collins et al., 2007).

Figura 1. Esquema das partículas dos pneumovírus. O RNA genômico está associado às proteínas virais do nucleocapsídeo N (representado na figura à esquerda), à fosfoproteína P, e à proteína L polimerase. A proteína M2-1 também está presente neste complexo (não demonstrado no esquema). A estrutura do nucleocapsídeo está rodeada pela proteína da Matrix M, que une o nucleocapsídeo à membrana viral da partícula do vírus. Inseridas a membrana lipídica estão as glicoproteínas G, a proteína de F de fusão e a proteína SH (*small hidrofóbica*) (Easton et al., 2004).

As proteínas NS1 e NS2 não fazem parte da estrutura viral, mas estão presentes em abundância nas células infectadas e em pequenas quantidades nos vírions. As outras proteínas são estruturais: duas estão associadas à matriz viral, M₁ [(Peso Molecular (PM) - 27 Kilodaltons (Kd)] e M₂ (PM-22Kd), três ao RNA genômico, para formar o nucleocapsídeo viral, N (PM-42Kd), P (PM-35Kd) e L (PM-200Kd); e outras

três são proteínas de superfície G (PM-90Kd), F (PM-70Kd) e SH (7, 5 Kd) (Figura 2) (Atreya et al., 1998; Fearn et al., 2002; Collins et al., 2007; Tran et al., 2007).

Figura 2: Esquema Representativo do Vírus Respiratório Sincicial Humano, RNA polaridade negativa. Fonte: (<http://www.uq.edu.au/vdu/VDUHumanRespiratorySyncytialVirus.htm>)

A glicoproteína G do hRSV é uma proteína tipo II. Contém 298 a 319 aminoácidos (aa) (dependendo de sua linhagem) e o gene que a codifica possui 923 nucleotídeos. Ela é a principal proteína de adesão viral nas células hospedeiras, como observado com o uso de anticorpos específicos contra a proteína G que impediu a adesão dos virions à membrana celular *in vitro* (Levine et al., 1987; Zhao et al., 2000). Sua região amino-terminal é intracitoplasmática e a carboxi-terminal é extracelular (Lichenstein et al., 1996) e apresenta um domínio interno (entre os resíduos 38 e 63, observado na linhagem A2) com uma única região hidrofóbica próxima à extremidade N-terminal, que direciona a inserção da proteína na membrana do envoltório viral (Roberts et al., 1995; Wertz et al., 1989; Feldman et al., 2001). A proteína G é expressa como uma pequena proteína e, subsequente, sofre uma glicosilação, obtendo assim sua forma madura. Uma característica importante e interessante desta proteína está no fato de poder suportar grandes deleções ou múltiplas substituições de aminoácidos, sem perda de sua função (Beeler e Coeling, 1989; Martinez et al., 1997; Melero et al., 2002).

Estudos feitos com a proteína G por Johnson et al. (1987), evidenciaram uma estrutura chamada de *mucin-like*, que possui elevados índices de serina, treonina e ainda resíduos de prolina. Essa sequência *mucin-like* apresenta um domínio central com 13 resíduos nas posições 164-176 (linhagem A2) que são completamente conservados entre as linhagens de hRSV. Isto levou à conclusão que esta sequência específica possui uma característica importante, por conter um segmento com 4 resíduos de cisteína nas posições 173, 176, 182 e 186 também conservados entre as diferentes linhagens de hRSV. Estes resíduos de cisteína nas posições cis-173, cis-176, cis-186 e cis-182 foram preditos como sendo uma estrutura secundária na proteína. Com a descoberta deste domínio conservado, postulou-se

que ele teria um papel fundamental na função da proteína G, relacionada ao processo de adesão nas células hospedeiras. Estudo posterior com um hRSV recombinante mostrou que esses domínios também poderiam se deletados sem causar significativa redução na replicação viral em experimentos realizados *in vitro*, utilizando cultura celular e/ou ratos (Teng et al., 2002). Do mesmo modo, experimentos realizados por Tripp et al. (2001), mostraram que este domínio envolve cis-182 e cis-186, relacionados ao domínio CX3C que é o domínio para quimiocina fractalina. Posteriormente, Polack et al., (2005), sintetizaram essa mesma seqüência de peptídeos contendo o domínio conservado na porção central em observações feitas *in vitro*, e notaram que eles inibiam a ativação do fator de transcrição do NF-kappa B e a secreção de citocinas inflamatórias por monócitos humanos, indicando que este domínio inibe a resposta imune inata do hospedeiro. Assim, este domínio conservado da proteína G tem atividade de modulação da resposta imune, embora o completo significado disto ainda não esteja totalmente elucidado.

A glicoproteína F é do tipo I, e está ancorada na membrana próxima à região C-terminal (intracitoplasmática) sendo clivada na porção N-terminal (extracelular), que é responsável pela fusão da membrana viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira, proporcionando o depósito do nucleocapsídeo dentro do citoplasma (Hoestra et al., 1990; Schlender et al., 2003). Por seu intermédio, ocorre a fusão de uma célula infectada com uma adjacente, levando a formação de sincícios (Walsh et al., 1985; Morton et al., 2003). O gene que a codifica possui 1903 nucleotídeos e sua síntese inicia-se com um precursor inativo, chamado F_0 , que forma posteriormente os domínios: F_2 (aa. 1-130) e F_1 (aa. 137-574) e um peptídeo clivável (aa. 131-136), (Calder et al., 2000; Collins et al., 2007). A proteína F_0 é clivada no complexo de Golgi por uma endoprotease celular nas subunidades F_1 e F_2 que se ligam por pontes dissulfídicas (Eckert et al., 2001; Reyes-Gonzales et al., 2001; Sugrue et al., 2001). Esta proteína é relativamente conservada e sua função é comprometida por deleções ou substituições de aminoácidos (Collins et al., 2007).

A porção N-terminal da subunidade F_1 , gerada pós-clivagem, possui um domínio hidrofóbico que se insere na membrana celular. Com isso, um deslocamento conformacional da proteína F, aproximando e unindo a membrana viral com a membrana celular, o que ocasiona a fusão das duas membranas (Zhao et al., 2000; Connolly et al., 2006).

Em estudos realizados com hRSV recombinante, em que as proteínas de superfície viral G e SH foram suprimidas, mantendo-se apenas a proteína F na superfície viral, em células infectadas *in vitro*, pode-se evidenciar a capacidade desta proteína em formar sincícios, independentes das demais proteínas de superfície viral (Kosaka et al., 2004; Techaarpornkul et al., 2001; Teng et al., 2001). Em outro trabalho com um vírus recombinante da estomatite vesicular que expressava a proteína F do hRSV, percebeu-se a habilidade do vírus de fudir célula-célula com formação de sincícios (Kahn et al., 1999). Assim, a proteína F do hRSV pode mediar eficientemente a fusão, independente de outras glicoproteínas virais, em contraste de outros membros dos *Paramyxovirinae*, em que há a necessidade da interação das 2 proteínas (G e F) para promover a fusão da célula infectada com outra adjacente (Techaarpornkul et al., 2001; Teng et al., 2001).

Nos processos infecciosos e imunes, as glicoproteínas de superfície F e G são as mais importantes para o desencadeamento da resposta imune do hospedeiro, quando infectado pelo hRSV (Olsted et al., 1986; Waal et al., 2004). O uso de anticorpos policlonais ou monoclonais (MAbs), específicos contra elas, são capazes de neutralizar o vírus *in vitro* (Bourgeois et al., 1991; Hendry et al., 1988). Em estudos realizados em camundongos, através da transferência passiva de anticorpos monoclonais anti-F, notou-se a redução da replicação do vírus nos seus pulmões (Walsh et al., 1983; Taylor et al., 1984; Kosaka et al., 2004). Num estudo realizado por Sano et al. (2003) utilizando uma proteína lactoferina em associação a um surfactante, observou-se que, numa ligação específica entre estes compostos e a proteína F, tais dados demonstraram *in vivo* que esta associação previne a invasão do trato respiratório superior pelo hRSV.

A proteína SH é uma proteína pequena da membrana formada por 64 aminoácidos (subgrupo A2) e o gene que a codifica possui 410 nucleotídeos. Ela possui um domínio hidrofóbico, chamado “sinal ancora” na porção N-terminal e a região C-terminal é extracelular (Huang et al., 1985; Collins et al., 1993; Olmsted et al., 1989). Intracelularmente ela se acumula em inúmeras formas: SH₀, SH_g, SH_p e SH_t (Olmsted et al., 1989; Anderson et al., 1991). Este complexo processamento da proteína SH em diversas formas é observado em outros membros da família *Pneumovirinae*, mas o significado destas formas ainda não é conhecido.

Burkreyev et al., (1997), utilizando um hRSV recombinante com deleção completa da proteína SH, demonstrou que esse vírus, ainda assim, permanece viável em cultura celular. Esses hRSV recombinante (com completa deleção da proteína SH) candidatos à vacina, foram ineficazes em atenuar o hRSV vacinal (Karron et al., 2005). Há estudos também demonstrando que a proteína SH aumenta o potencial de fusão célula a célula (Heminway et al., 1994), embora, em pesquisas posteriores, tenha-se demonstrado que o vírus hRSV recombinante com deleção da proteína SH, permanece competente em ocasionar a fusão célula-célula, (Techaarpornkul et al., 2001).

Perez et al., (1997) sugeriu que a proteína SH pode ser formadora de um canal transmembrânico chamado *viroporin*, cujo poro apresenta um diâmetro 1.46 Å. Colabora com essa afirmação um trabalho em que expressou-se a proteína SH em bactérias, ocorrendo um aumento da permeabilidade para compostos de pequeno peso molecular. Entretanto, o papel deste canal iônico na biologia do hRSV ainda não é compreendido (Biacchesi et al., 2004, 2005).

A proteína M da matriz possui 256 aminoácidos e o gene que a codifica possui 958 nucleotídeos. Ela se acumula na membrana plasmática, interagindo com outras proteínas virais durante a morfogênese da partícula viral, e é essencial para dar forma a partículas do vírus (Huang et al., 1985; Teng et al., 1998).

As proteínas N (*nucleoprotein*), P (*phosphoprotein*) e L (*large protein*) são proteínas que estão presentes no nucleocapsídeo. Em conjunto com a proteína M2-1, são encontradas no citoplasma celular. Quando células infectadas são visualizadas em microscópio, podemos verificar a presença de corpos de inclusão, assim acredita-se que estes contenham o nucleocapsídeo viral (Garcia et al., 1993).

As proteínas N, P e L são essenciais para replicação do RNA viral (Collins et al., 1996, 2007; Carromeu et al., 2007).

A proteína N (*nucleoprotein*) é a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo (Tristram et al., 1996); apresenta 391 aminoácidos, codificado por um gene que possui 1203 nucleotídeos. Esta proteína se liga ao RNA genômico e ao RNA antígeno, conferindo ao nucleocapsídeo recém-formado a propriedade de resistência às RNases intracelulares do hospedeiro. Tal característica não é somente vista no hRSV, mas também em outros membros dos *Mononegavirales* (Collins et al., 2007).

A proteína P do hRSV é altamente fosforilada. Apresenta 241 aminoácidos e o gene que a codifica possui 914 nucleotídeos (Collins et al., 2007). De forma similar a outros membros da ordem *Mononegavirales*, a proteína P faz parte do complexo da polimerase viral. A interação entre a proteína P e a proteína M2-1 parece ser essencial para o desempenho desta (Mason et al., 2003).

A proteína L do hRSV é a maior das proteínas, constituída de 2165 aminoácidos e é similar em tamanho a outros membros do grupo *Paramixoviridae*. O gene que a codifica possui 6578 nucleotídeos, contendo 6 segmentos conservados, onde se presumem domínios funcionais. Estes parecem *motifs* da expressão da polimerase (Stec et al., 1991; Collins et al., 2007).

Acredita-se que esta proteína seja necessária em todos os processos enzimáticos para produção de RNAs virais funcionais, incluindo a polimerização de nucleotídeos, metilação na porção terminal 5' com formação do cap e poliadenilação na porção 3' dos RNAm (Hercyk et al., 1994; Grdzlishvili et al., 2005; Ogino et al., 2005). A poliadenilação dos RNAm virais ocorre co-transcricionalmente, com a proteína L adicionando a cauda poli A nos RNAm virais nascentes num mecanismo de repetição do resíduo do molde U na extremidade de cada gene viral (Liuzzi M et al., 2005).

A proteína M2-1 apresenta 194 aminoácidos e é a única dos membros da família *Pneumovirinae*, embora VP30 da família *Filoviridae* tenha algumas similaridades com essa proteína. Inicialmente, acreditou-se que a proteína M2-1 do hRSV tinha sua função parecida com a proteína M, porém, segundo Collins et al., (1995, 1996, 1999), em trabalhos subseqüentes, identificaram sua função como sendo um fator de transcrição essencial para viabilidade do vírus.

A proteína M2-2 possui 90 aminoácidos observados no subgrupo A2, codificada por um RNAm no segundo ORF da M2 (Collins et al., 1990). Ela é expressa em níveis muito baixos pela célula (Ahmadian et al., 1999). Não há dados sobre ela ser ou não empacotada no virion. Em trabalhos feitos com hRSV recombinantes, com o segundo ORF do gene M2-2 silenciado, pode-se notar que estes vírus cresceram mais lentamente *in vitro* do que o tipo selvagem, embora eventualmente alcancem títulos similares. Em células infectadas com vírus recombinante, denominado hRSV-M2-2/ Δ , verificou-se um acúmulo de RNAm genômico e, em contrapartida o RNAm

antigenômico estava diminuído. Estas descobertas sugerem que a M2-2 exerça um papel de balanço na síntese do RNA (Bermingham et al., 1999; Teng et al., 2000).

As proteínas NS1 e NS2 são proteínas não estruturais e possuem, respectivamente, 139 e 124 aminoácidos e os genes que as codificam possuem 532 e 503 nucleotídeos. Alguns pesquisadores envolvidos em estudos feitos com estas proteínas observaram que as proteínas NS1 e NS2 inibem a indução dos interferons α e β em resposta a infecção viral. Este efeito se dá pela inibição da fosforilação, que controla a expressão dos interferons α_1 e β . (Bossert et al., 2003; Spann et al., 2004, 2005). Em células humanas esta inibição é mediada primeiramente pela proteína NS1, embora a proteína NS2 produza algum efeito. De toda forma, a combinação das duas proteínas ocasionam um melhor efeito inibitório.

1.3 Ciclo Replicativo

Para ter sucesso em infectar as células, o hRSV necessita se ligar aos glicosaminoglicanos (GAGs) da célula hospedeira, sendo estes os mediadores desse processo (Hallak et al., 2000; Techaarpornkul et al., 2002; Teng et al., 2002). Em adição aos GAGs, algumas proteínas celulares estão envolvidas no processo de infecção pelo hRSV *in vitro* (Curdy et al., 2003). Entre elas estão as moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) (Behera et al., 2001), RhoA, (Pastey et al., 1999), o receptor para quimiocina CX3CR1 (Tripp et al., 2001) e proteína anexina II (Malhotra et al., 2003). Além disso, a proteína surfactante produzida nas células epiteliais tem demonstrado auxiliar na infectividade do hRSV *in vitro* (Hickling et al., 2000).

A penetração do vírus na célula hospedeira se dá pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática. Após a adesão com o receptor celular, inicia-se o processo de fusão demonstrado em cultura de células e visto em microscópio eletrônico. Uma vez iniciada a fusão, os próximos passos da replicação ocorrem rapidamente (Collins et al., 2007).

Com a penetração do vírus, o nucleocapsídeo é liberado e todos os eventos do ciclo replicativo do hRSV são realizados no citoplasma (Harmon et al., 2002; Moudy et al., 2004; Collins et al., 2007).

Os genes do hRSV são transcritos na ordem 3'- 5' com um sinal promotor na posição 3' (Dickens et al., 1984). A polimerase se conecta ao RNA genômico na

região *leader*, iniciando a transcrição do primeiro nucleotídeo, e segue-se ao longo de todo o genoma por um mecanismo seqüencial denominado início/fim, guiado pelos sinais *gene start* e *gene end*, localizados em cada gene. Como resultado, são sintetizados uma série de RNAm subgenômicos, que são cópias exatas do genes (Harmon et al., 2002; Moudy et al., 2004).

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

O complexo N, P e L é responsável pela transcrição e tradução do genoma viral de fita negativa em um intermediário positivo, que vai servir como modelo para síntese de genomas filhos (Huang et al., 1982; Burke et al., 2000).

Em alguns estudos, os pesquisadores sugeriram que há necessidade de um fator celular, como a actina para a síntese de RNAm *in vitro*, indicando um possível papel dessas proteínas na transcrição do hRSV (McDonald et al., 2004; Kallewaard et al., 2005)

A maturação do vírus está restrita a determinadas regiões da membrana, onde estão os componentes aglomerados do capsídeo viral. Foram detectadas, através de estudos de imunomicroscopia eletrônica, duas formas de maturação do hRSV em células Hep-2 (Chi et al., 2006). Em uma delas, o vírus é montado, antes de alcançar a membrana citoplasmática, em vesículas internas (intracelulares), sendo então incorporado a membrana citoplasmática e liberado para o espaço extracelular por exocitose. Em outro, o vírus é maturado na membrana plasmática das células infectadas e liberado por brotamento, sendo este o momento que o vírus adquire o envoltório lipídico (Roberts et al., 1994; Jeffree et al., 2003) (Figura 3).

Figura 3. Brotamento Viral: Imagem demonstrativa de microscopia eletrônica. A seta indica a liberação da partícula viral no espaço extracelular.

Fonte: <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/virus01.htm>

1.4 Características Antigênicas

O hRSV apresenta um único sorotipo com dois subgrupos antigênicos A e B. Desde os primeiros estudos realizados com o vírus foi demonstrado seu dimorfismo antigênico (Coates et al., 1966).

Através da produção de anticorpos monoclonais, estas diferenças antigênicas mostraram-se mais definidas, sendo a proteína G a que apresenta maior diversidade; enquanto a proteína F e as demais proteínas virais apresentam menor dimorfismo (Anderson et al., 1985; Mufson et al., 1985; López et al., 1993). Esta variabilidade antigênica pode ser visualizada pelas diferenças de títulos de anticorpos neutralizantes. O título de anticorpos neutralizantes pode ser até quatro vezes maior, quando testados com amostras do mesmo grupo, e também foram testados MAb's para as proteínas N e P e as glicoproteínas F e G. Observações feitas com as glicoproteínas purificadas G e F através do ensaio de *ELISA* mostraram que o dimorfismo antigênico entre os grupos A e B é maior na glicoproteína G em que a antigênicidade é de 1% a 7%. Esse mesmo dimorfismo, na proteína F, está em torno de 50% (Mufson et al., 1985; Johnson et al., 1987; Hendry et al., 1988; Queiroz et al., 2002). Sendo assim, outros estudos comprovaram haver diferenças antigênicas dentro de cada grupo, possibilitando a divisão em subgrupos. A princípio, foram identificados 7 subgrupos do tipo A (A1 a A7) e 4 do tipo B (B1 a

B4) (Anderson et al., 1991; Sullender et al., 2000; Kamasaki et al., 2001; Silva et al., 2008).

Na última década, houve descrição de mais um genótipo (SAV1) do grupo A (totalizando oito subgrupos) e mais 3 genótipos (SAB1, SAB2 e SAB3) do grupo B (totalizando 7 subgrupos). Outros trabalhos identificaram mais um genótipo BA do grupo B do hRSV, circulando na América do Sul e nordeste da Ásia (Venter et al., 2001; Moura et al., 2003; Trentro et al., 2006; Nagai et al., 2004; Scott et al., 2004).

As glicoproteínas G e F são os principais alvos da resposta humoral contra o hRSV. Estudos feitos *in vitro* e *in vivo* com a utilização de anticorpos monoclonais e com o vírus vaccínia recombinante expressando a glicoproteína F, indicam que esta é o mais importante antígeno na indução de imunidade cruzada entre os dois grupos hRSV A e B, enquanto a glicoproteína G induz imunidade grupo específica (Jonhson et al., 1987; Hendry et al., 1988).

A região hipervariável da proteína G sofre uma pressão seletiva proveniente do sistema imune, que induz substituições de aa nesses domínios hipervariáveis, tolerantes a variações. O mesmo fenômeno não é observado nas outras proteínas do hRSV, como na proteína F, que também está sujeita à mesma pressão seletiva, mas não é tolerante a grandes substituições de aminoácidos devido à sua estrutura e por exigências funcionais. Isolados virais, provenientes de epidemias de hRSV em diversas décadas de estudo, forneceram evidências, de que ocorreram progressivas mudanças de aminoácidos na proteína G. Isso foi observado na sua reatividade frente a MAbs. Zlateva et al. (2004) selecionou amostras obtidas ao longo de 47 anos e foi possível observar que a pressão seletiva ocorreu em 13 codons no ectodomínio da proteína G.

Diversos laboratórios relataram que anticorpos monoclonais direcionados à proteína F do hRSV neutralizam a infectividade do vírus ou são capazes de inibir a fusão da membrana. Esta competição entre a ligação do vírus e os anticorpos possibilitou a identificação de 4 locais antigênicos na molécula de F (Beeler et al., 1989; Garcia-Barreno et al., 1989). Alguns destes epítomos foram mapeados e sua reatividade foi testada com peptídeos ou fragmentos sintéticos da proteína expressos em bactérias (Trudel et al., 1987; Bourgeois et al., 1991)

Vários estudos baseados apenas nas propriedades antigênicas foram realizados no sentido de elucidar o padrão de circulação do hRSV. Isto nos leva a tirar algumas

conclusões: a co-circulação dos grupos durante os surtos e a variação do padrão de circulação em diferentes comunidades durante o mesmo ano. Não foi encontrado um subgrupo que ocasione epidemias de caráter nacional ou mundial (Anderson et al., 1991; Mufson et al., 1888; Venter et al., 2001; DaSilva et al., 2008).

O conhecimento da variação antigênica e suas implicações são fundamentais para desenvolvimento de uma vacina contra hRSV.

1.5 Aspectos Clínicos

O hRSV se replica nas células do trato respiratório, causando um processo inflamatório que inclui destruição do epitélio, edema e aumento da produção de muco. Após um período de incubação de 3 a 5 dias, ocorrem as primeiras manifestações clínicas, típicas de um resfriado comum, com secreção nasal clara, tosse moderada, febre baixa e algumas vezes sibilância, evoluindo geralmente, para a recuperação no período de uma a três semanas. A tosse é um dos sintomas mais comuns e afeta de 90 a 97% dos pacientes. Em 50% dos indivíduos infectados pelo hRSV foram observadas febre, como um sintoma - diferente do que acontece em infecções do vírus influenza e infecções bacterianas, em que 75% das infecções ocasionam sintomas febris (Larcher et al., 2006; Falsey et al., 2000; Polak, 2004; Artiles-Campelo et al., 2006). Ainda nas infecções pelo hRSV, também podem aparecer sintomas como diminuição do apetite, além de complicações como otite média e sinusite (Hall et al., 1978; Pitkaranta et al., 1998; Winther et al., 2002).

A migração do vírus do trato respiratório superior para o inferior provavelmente envolve a aspiração de secreções ou migração via epitélio respiratório e a bronquiolite é resultado da destruição do epitélio bronquiolar, inflamação peribronquiolar, edema dos tecidos das vias aéreas e produção de muco. A obstrução das vias aéreas pode levar a casos de enfisema e colapso do pulmão (Polak, 2004).

As infecções respiratórias agudas (IRAs) têm sido as principais causas de morbidade e mortalidade em crianças de até 5 anos de idade em todo mundo, tendo considerável aumento em países em desenvolvimento (Law et al., 2002; Ogra, 2004). Dentre os principais causadores deste tipo de infecções, o hRSV é apontado como responsável pela maioria dos casos de IRAs em crianças menores de 1 ano

de idade (Miyao et al., 1999). Anualmente o hRSV contribui direta ou indiretamente, com 600.000 a 1.000.000 de mortes em todo mundo em crianças com idade inferior a 5 anos (Polak, 2004; Silvestri et al., 2004).

Entretanto, pacientes pré-maturos (Atkins et al., 2000; Carbonell-Estrany et al., 2002), idosos (Falsey et al., 2000), pacientes com cardiopatias congênitas (Eisenhut, 2004), portadores de leucemia (Torres et al., 2007; Sung et al., 2008), imunocomprometidos (Chang et al., 1999; Visser et al., 2008;), tais como receptores de transplante (McCarthy et al., 1999; Machado et al., 2003; Escuissato et al., 2005) e pacientes portadores de HIV (Falsey et al., 2000), podem evoluir para um quadro clínico mais grave, com acometimento importante do TRI, acarretando casos de taquipnéia, pneumonia, bronquiolite e bronquite, que muitas vezes, levam a hospitalização, necessitando de intubação e ventilação mecânica (Figura 4). As manifestações clínicas dependerão da magnitude da imunodepressão (Welliver, 2003; Camara et al., 2004; Ogra, 2004; Jonhson et al., 2008).

Figura 4. Foto ilustrativa de um bebe pré-maturo acometido de infecção pelo hRSV e recebendo suporte de oxigenoterapia. Fonte: <http://breathebetter.blogspot.com/>

Um estudo realizado em crianças com doenças cardíacas congênitas, admitidas no hospital com infecção pelo hRSV ou que o adquiriram durante a hospitalização, mostrou que essas crianças apresentaram um risco maior de desenvolver uma doença grave ou fatal (Cilla et al., 2006). A taxa de letalidade entre lactentes com doenças cardíacas congênitas e infecção por hRSV foi de 37%, em comparação aos 6.5% de mortes dentre as crianças sem cardiopatias. Crianças com doenças pulmonares e pré-maturas também apresentam elevado risco de doença grave ou fatal (Groothuis et al., 1988; Shay et al., 2001; Figueiras-Aloy et al., 2008). Em

estudo multicêntrico observou-se que as infecções causadas pelo hRSV em pacientes com doença cardíaca congênita ou doença pulmonar crônica provocavam índices maiores de mortalidade (3, 4% e 3, 5%, respectivamente); isso quando comparado a pacientes saudáveis (1%). Além disso, os grupos com doença cardíaca congênita ou doença pulmonar crônica apresentam duração maior da terapêutica de oxigenação suplementar (Flamant et al., 2005).

Segundo Viera et al., (2001) em um estudo realizado em crianças hospitalizadas no município de São Paulo, o acometimento bronquial difuso e a condensação alveolar foram os padrões clínicos mais frequentes associados aos casos de infecção pelo hRSV.

Em outro estudo, realizado por Rakes et al. (1999) entre a faixa etária de 2 meses a 16 anos, atendidas no serviço de emergência do Centro de Ciências da Saúde da Universidade da Virginia/USA, apresentando chiado como sintoma clínico, 68% dessas crianças tiveram diagnóstico de hRSV e se encontravam na faixa etária de até 24 meses de vida, enquanto em crianças mais velhas, 71% dos casos estavam associadas a casos de rinovírus.

Diversos estudos têm voltado à atenção para infecções com hRSV na população idosa, principalmente aqueles que vivem em asilos e casas de repouso. Os sintomas da infecção pelo hRSV variam e podem ocasionar desde um leve resfriado a um grave problema respiratório (Han et al., 1999; Falsey et al., 2000).

Nos adultos com algum tipo de imunossupressão, a infecção pelo hRSV está associada à morbidade e à letalidade significantes, apesar da gravidade das manifestações clínicas dependerem da magnitude da imunossupressão. No geral, a progressão clínica da infecção por hRSV nos adultos imunocomprometidos parece seguir um padrão semelhante à dos indivíduos imunocompetentes, com infecção inicial no trato respiratório superior progredindo para doença no TRI (Falsey, 2000). Em pacientes portadores de leucemia e que progrediram para um quadro de pneumonia causado pelo hRSV as taxas de letalidade podem chegar a 20% (Van-Elden et al., 2002). Outros pacientes apresentam elevada letalidade quando associam uma infecção pelo hRSV são os indivíduos transplantados, principalmente nos primeiros vinte dias pós-transplante (Pohl et al., 1992). Em pacientes que se submeteram a transplante de medula óssea, a taxa de letalidade é de 45% a 80% dentre os que se infectam com o hRSV (Bowden, 1997; Ogra, 2002).

1.6 Imunologia do hRSV

Em seres humanos, a patofisiologia grave causada pelo hRSV é ocasionada pela disfunção das vias aéreas o que inclui necrose de células epiteliais com conseqüente aumento da produção de muco e comprometimento da ventilação . A disfunção das vias aéreas é resultado dos danos causados pela replicação viral, mas também pode ser facilitada pelo processo inflamatório (Wang et al., 2003). Casos mais graves da doença causada pelo hRSV envolvem processos imunes e o recrutamento de mediadores inflamatórios, CT (linfócitos T), CB (linfócitos B), eosinófilos, neutrófilos, citocinas, quimiocinas e leucotrienos e são eles os responsáveis pela doença causada pelo vírus (Garofalo et al., 2001; Bont Et al, 2002; Tripp et al., 2002; Piedimonte et al., 2005). Alguns grupos observaram que o direcionamento para uma resposta Th2 está associado com casos mais graves em crianças (Legg et al., 2003). O estudo da patogenese viral não pode ser totalmente entendido em humanos, assim, modelos animais de infecção pelo hRSV são necessários para avaliar os mecanismos inflamatórios para proteção e imunopatologia. Segundo Moore et al. (2006), modelos animais são importantes para definir a relação entre disfunção das vias aéreas e a inflamação induzida pelo hRSV.

A resposta imune vírus específica é responsável pela proteção contra doença no TRI e também o restabelecimento do organismo frente a uma infecção pelo hRSV. A imunidade para o hRSV é mediada através da resposta imune humoral e celular, que incluem anticorpos no soro (adquiridos como resultado de uma infecção anterior ou recebidos através da placenta para o feto), anticorpos secretores e MHC-1 restritos para LTC (linfócito T citotóxico) (Falsey et al., 1995; Hurk, 2007). Segundo Pulendran (2004), por meio de seus estudos epidemiológicos, observou que a imunidade natural contra hRSV é incompleta e reinfecções ocorrem durante toda vida. Crianças saudáveis e adultos jovens, geralmente conseguem eliminar o vírus antes que este alcance o TRI. Em geral a resposta imune, envolvendo anticorpos secretores e anticorpos no soro, parece proteger contra infecção no trato respiratório superior e inferior, enquanto a resposta imune, mediada por células, é direcionada contra proteínas internas, sendo este fator determinante para infecção (Hurk, 2007).

Ribeiro et al., (2008), num estudo feito em Uberlândia, relatou que pacientes maiores de 6 meses de vida também tinham níveis baixos MBL (*Serum Mannose-*

Binding Lectin), sugerindo um importante papel na proteção durante o período vulnerável onde as crianças perdem os anticorpos recebidos via placenta e enquanto o sistema imune adaptativo é ainda imaturo.

O papel da imunidade local na proteção do trato respiratório superior contra hRSV foi sugerida pela observação da transferência passiva de anticorpos neutralizantes que protegeram o pulmão de *cotton rats*, mas não afetou significativamente a replicação viral no TRI. *Cotton rats* que foram novamente desafiados com hRSV via trato respiratório foram resistentes ao vírus por um período de 6 a 12 meses, sugerindo que a resposta imune local inibiu uma reinfecção (Ostler et al., 2001; Sallusto et al., 2004). Em estudos com adultos voluntários, observa-se a presença de anticorpos neutralizantes secretórios, mas não de anticorpos no soro. Isso foi correlacionado com a proteção do TRI contra a infecção pelo hRSV (Chin et al., 1969). O hRSV se replica primariamente no epitélio respiratório superior, por essa razão anticorpos neutralizantes não previnem a infecção, como acontece em patógenos que ocasionem viremias, sendo exemplos o vírus do sarampo e vírus da varicela-zoster. Elevados títulos de anticorpos neutralizantes no soro anti-hRSV desempenham papel protetor no trato respiratório e isto foi demonstrado em estudos com animais (Sallusto et al., 2004; Ostler et al., 2001). Elevados títulos de anticorpos neutralizantes anti-hRSV maternos, observados através de *ELISA* ou ensaio de neutralização no sangue materno ou do sangue do cordão umbilical, demonstraram uma correlação inversa com a incidência da infecção por hRSV (Noah, 2000) e a severidade da pneumonia causada por hRSV nos primeiros 6 meses de vida (Cannon et al., 1989). Em crianças, a taxa de reinfecções por hRSV e de doença do trato respiratório também foi correlacionada aos níveis de anticorpos neutralizantes no soro anti-hRSV realizado após a infecção primária (Gern et al., 2003). Um outro estudo realizado em crianças de alto risco utilizando RS/VIG demonstrou que as crianças que receberam mensalmente doses de 750 mg/kg tinham uma significativa redução na severidade da doença do trato respiratório. Tal dado foi mensurado pela comparação dos dias que a criança permaneceu hospitalizada e os dias que a criança permaneceu na UTI (Tekkanat et al., 2002). Os títulos de anticorpos neutralizantes nas crianças que receberam as doses de RS/VIG causaram um efeito protetor nas crianças, fato comparável ao demonstrado nos pulmões dos *cotton rats* em estudos feitos anteriormente

(Hammad et al., 2004; Tekkanat et al., 2002). O efeito protetor das RS/VIG em recém-nascidos foi demonstrado posteriormente também com grupo controle-placebo (Kaeck et al., 2002).

1.7 Epidemiologia

O hRSV é a principal causa de bronquiolite em crianças em todo mundo. Em países de clima temperado, como Estados Unidos, Japão e França, geralmente os surtos ocorrem de novembro a maio e nas regiões de clima temperado e subtropical a infecção pelo hRSV apresenta uma sazonalidade nos meses de março a agosto (Tsutsumi et al., 1998; Brandenberg et al., 2001; Bosso et al., 2004). Cada epidemia dura cerca de 5 meses, com 40% dos casos ocorrendo durante os meses de pico, geralmente no meio do surto (Hall, 2001).

Cerca de 95% das crianças tem a primeira infecção pelo hRSV durante os primeiros dois anos de vida, estando o pico de incidência dos dois aos sete meses, podendo levar a bronquiolite e pneumonia. Apesar de reinfecções serem comuns durante toda vida, os sintomas em crianças mais velhas e adultos são mais brandos e ficam, geralmente, limitadas ao trato respiratório superior (Shay et al., 1999; Thompson et al., 2003).

Dados do CDC mostram que nos EUA, o hRSV é responsável por 120.000 admissões hospitalares anuais em bebês e crianças pequenas. Já em países em desenvolvimento, como Moçambique, Indonésia e África do Sul, a incidência do hRSV foi de 5, 10 e 9 em 1000 crianças com infecção no TRI, respectivamente (Robertson et al., 2004).

Embora as infecções respiratórias agudas sejam uma importante causa de morbidade e letalidade no Brasil, os dados disponíveis ainda hoje são poucos e esparsos sobre a sazonalidade e etiologia viral do hRSV. Em trabalho realizado por (Stralio et al., 2002) em Porto Alegre (RS), o hRSV foi freqüente em crianças menores de 1 ano, sendo mais prevalente em menores de 6 meses e juntamente com os adenovírus foram responsáveis por 91.4% dos diagnósticos virais ocorrendo anualmente nas estações de outono e inverno.

Segundo Vieira et al. (2001), no município de São Paulo, a sazonalidade apresentada pelo hRSV é marcante, estendendo-se pelo outono-inverno com pico

de maio a junho, e demonstrou que todas as crianças acometidas por este vírus tinham idade inferior a 3 anos ou, em sua maioria, menos de 1 ano. Na cidade do Rio de Janeiro foi realizado um estudo transversal em 1997 e 1998, onde o hRSV foi o principal causador de infecções do TRI em lactentes que necessitaram de hospitalização (Machado et al., 2003; D'Elia et al., 2005). Em Uberlândia, segundo Calegari (2005), 24% das amostras foram positivas para hRSV e 87% desses foram menores de 12 meses de vida; estudos de Queiroz et al. (2002) e Calegari et al. (2005) também correlacionaram a idade das crianças acometidas com o número de casos positivos para hRSV.

Serafino et al., (2004) em trabalho realizado em Aracaju constatou que nos dois anos de estudo o hRSV foi prevalente em 55%, 68% respectivamente em crianças com diagnóstico de doença no TRI e estavam na faixa etária menores de dois anos.

Independente da sazonalidade, a gravidade da doença pode variar a cada surto e flutuações de grupo e cepas circulantes podem contribuir na gravidade anual de cada surto (Hall et al., 1990). Por outro lado, vários fatores podem influenciar a gravidade da doença, como fatores ambientais e exposição passiva ao tabaco, (Queiroz et al., 2002). O padrão de circulação dos grupos A e B aparecem com grande variação de local para local e de ano para ano. Vários estudos demonstraram que os dois tipos têm circulado concomitantemente em muitas epidemias em diversas regiões do mundo, com predominância de um deles, (Straliotto et al., 2001; Sensballe et al., 2003).

Botosso (2003) realizou um estudo em crianças hospitalizadas no hospital universitário na cidade de São Paulo - USP, e encontrou também uma co-circulação de ambos os grupos em 3 anos de estudo. Struck et al. (2004), não observou em seus estudos diferenças significativas de patogenidade entre os tipos A e B do hRSV. Isso também foi observado em Porto Alegre (Straliotto et al., 1999)

Buckingham et al., (2000) e Vieira et al. (2001) relacionaram a gravidade da doença com a carga viral presente na secreção em comparação com o subgrupo do vírus.

Stein et al., (1999) em um estudo longitudinal realizado em Porto Alegre, acompanhou um grupo de crianças de 0 a 13 anos com quadro de doença no trato respiratório, demonstrando que hRSV contraído antes dos 3 anos de vida está associado como um fator de risco para quadros asmáticos em crianças com até 10

anos de vida. Entretanto, não encontraram relação entre incidência do hRSV e subsequente desenvolvimento de sensibilização alérgica.

Em seu trabalho Peret et al., (1998), identificou os primeiros genótipos do hRSV. Com essa descoberta também veio a especulação se haveria influência, não apenas do grupo, mas do genótipo sobre a gravidade da doença.

Martinello et al., (2002) observou em seu estudo que o genótipo GA3 pode estar associado com a gravidade da doença. Um grande interesse atual é o conhecimento da infecção causada pelo hRSV em idosos e também em adultos de alto-risco. Durante o período de 4 anos, especialmente na estação de inverno em Nova York, acompanhando 608 pacientes idosos e 540 adultos de alto-risco e foi verificado que o hRSV foi responsável por 10.6% das hospitalizações por pneumonia, 11.4% devido à doença pulmonar obstrutiva crônica, 7.2% foram causadas por asma e 5, 4% doenças cardíacas (Falsey et al., 2005). Isso leva a pressuposição que o aumento da expectativa de vida da população idosa nos USA, também levará ao aumento das hospitalizações dessa população quando comparado com a população pediátrica.

1.8 Alvos Terapêuticos na Infecção pelo Vírus Sincicial Respiratório

A ocorrência dos principais sintomas clínicos causados pela infecção com hRSV ocorrer após o pico de replicação viral em modelos animais e seres humanos, faz do desenvolvimento de uma terapêutica eficaz anti-hRSV um grande desafio. Terapias com corticosteróides não se mostrou eficaz para combate da infecção com hRSV (Buckingham et al., 2002) .

O uso do medicamento Ribavirina é controverso. Em estudo com crianças menores de 6 meses de vida com infecção do TRI provocada por hRSV, onde se empregou como tratamento este antiviral, os dados revelaram insignificância estatística quanto a diminuição da mortalidade, ao tempo de hospitalização e também no emprego de ventilação mecânica (Cabalka et al., 2004; Ventre et al., 2004). Estudos posteriores indicaram que a Ribavirina não tem efeito em longo

prazo na função pulmonar em crianças tratadas com este agente farmacológico para infecções com hRSV (Krillov et al., 1997; Long et al., 1997).

Existe uma grande discussão e diversas tentativas até hoje frustradas quanto à prevenção vacinal como sendo a melhor escolha para terapia, porque seria difícil e caro o tratamento de cada criança ao primeiro sinal de tosse ou dificuldade de respiração.

Durante os últimos anos, os processos na terapia anti-hRSV tem seguido 2 caminhos, drogas antivirais mais efetivas e terapia com MAbs. Novas drogas antivirais estão sendo desenvolvidas através da seleção tradicional de compostos. Uma pequena molécula chamada BMS- 433771, em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, inibiram a replicação do hRSV induzindo efeito profilático em camundongos BALB/c e em *cotton rats*, inibindo a fusão vírus-célula através da proteína F do hRSV (Cianci et al., 2004a, 2002b, 2005). Outro inibidor de fusão é a molécula chamada RFI-641, que provocou efeito antiviral em macacos verdes africanos infectados pelo hRSV (Huntley et al., 2002; Weiss et al., 2003).

Novas drogas antivirais para tratamento do hRSV foram baseadas na biologia do vírus. A glicoproteína F do hRSV pode se ligar a outra proteína (RhoA) em células HEp-2, e com o aumento da expressão dessa proteína também leva ao aumento da formação de sincícios (Pastey et al., 1999). A proteína RhoA derivada de um peptídeo inibiu a replicação dos vírus hRSV e PIV-3 e evitou a formação de sincícios. Este peptídeo reduziu a carga viral e a doença em camundongos BALB/c (Pastey et al., 2000). O uso desse peptídeo inibidor da RhoA *in vitro* demonstrou que a sinalização da RhoA não é requerida para replicação do hRSV , mas é requerida para formação de sincícios (Gower et al., 2005). A ativação da proteína RhoA é precedida pela etapa chamada isoprenilação (esse peptídeo inibe a isoprenilação). Outro agente farmacológico chamado lovastatina teria essa mesma característica de inibição, como observado em um experimento realizado com cobaias, onde houve eliminação da replicação do hRSV *in vitro*, reduzindo também a fusão célula-célula com conseqüente redução da carga viral (Gower et al., 2001).

Uma inovadora e promissora classe de drogas antivirais são os RNAs de interferência (siRNA), que são pequenas seqüências de 16-22 nucleotídeos de RNA dupla fita. Pequenas moléculas de RNA são produzidas como seqüências

complementares ao um RNAm viral, e podem ser distribuídas *in vitro* e *in vivo*, para se ligar à porção complementar do RNA viral a fim de evitar a sua leitura nos ribossomos e síntese da proteína correspondente (Barik, 2004). A principal vantagem dos siRNA é não ser necessária a elucidação da estrutura da proteína e, teoricamente, ser possível construir siRNA para qualquer RNAm viral, bastando apenas saber qual a seqüência do vírus. Um grande número de RNAm são indispensáveis para o ciclo de vida viral, fazendo com que eles sejam alvos para ação de silenciamento gênico, diminuindo assim a chance de escapes mutantes e também vírus com resistência a drogas (Barik, 2004). RNA de interferência seqüência-específica de RNAm dos vírus hRSV e PIV-3 inibiram de forma eficaz a replicação viral *in vitro* e também *in vivo*, em camundongos BALB/c através de administração intranasal (Bitko et al., 2005; Zhang et al., 2005). Ainda nesses mesmos trabalhos, foram desenvolvidos siRNA direcionados ao RNAm da proteína NS1 do hRSV, com efeito antiviral *in vitro* e em camundongos BALB/c comprovado.

Outra maneira de prevenção do hRSV é o uso de MAb, o MAb humanizado anti-proteína F do hRSV, chamado comercialmente de Palivizumab (*Synagis*®), tem sido efetivo na prevenção de doença severa causada pelo hRSV em crianças de alto-risco (DeVincenzo, 2008). Devido a diversas pesquisas bem sucedidas com o Palivizumab, a Academia Americana de Pediatria e, mais recentemente a Sociedade Brasileira de Pediatria, recomendaram seu uso como método profilático em populações de risco.

Segundo dados do *Committee on Infectious Disease* (2003), a profilaxia realizada com o medicamento Palivizumab foi bem tolerada pelos usuários e também se mostrou segura, reduzindo em 45% o número de hospitalizações onde a causa foi a infecção pelo hRSV.

Estudos mais recentes revelaram que mutações de genes dos MAb podem originar MAb mais potentes anti-hRSV. Estudos com mutações genéticas no medicamento Palivizumab levou ao desenvolvimento do MEDI-524 (Numax®) (Mejias et al., 2005). O Medicamento Numax é específico para o mesmo epítipo do Palivizumab, mas MEDI-524 reduziu a carga viral e o processo inflamatório em camundongos BALB/c, demonstrando-se mais eficaz que o Palivizumab (Mejias et al., 2005; Wu et al., 2005). Em estudos posteriores, o Numax foi 50-100 vezes mais

potente quando comparado ao Palivizumab experimento realizado em *cotton rats* e reduziu os títulos do hRSV no TRI (Mejias et al., 2005; Wu et al., 2005). Contudo, esse novo anticorpo monoclonal ainda está em fase de testes para comprovar sua real eficácia e segurança.

Até o presente momento, o medicamento Palivizumab é o único método realmente efetivo para prevenção das doenças respiratórias causadas pelo hRSV. Por essa razão, existe uma tendência ao uso aumentado nas populações de risco. Postula-se que esse aumento, poderia levar a um período mais prolongado de replicação viral, possibilitando o aparecimento de vírus resistentes ao medicamento, com consequente disseminação de vírus mutantes resistentes entre a população (El Saleeby et al., 2004; Wu et al., 2007., DeVincenzo, 2008).

Os vírus RNA em geral, e o hRSV se inclui nessa categoria, são formados de uma fita de RNA e dependem da ação da enzima RNA polimerase que não apresenta um mecanismo de correção durante a replicação. Em decorrência disso, esses vírus possuem uma elevada taxa de mutação. O hRSV também apresenta uma elevada adaptação à pressão seletiva, que levaria ao surgimento de vírus quasispecies (Domingo et al., 1995). Em estudos realizados *in vitro* observou-se a formação de escapes mutantes provenientes de cultura celular utilizando-se anticorpos monoclonais e policlonais contra a proteína G e F (Beeler et al., 1989; Garcia-Barreno et al., 1990; Lopez et al., 1990; Crowe et al., 1998; Walsh et al., 1998). Segundo estudos realizados por alguns grupos de pesquisa com a proteína F do hRSV, descobriu-se pontos de mutação de grande relevância biológica (Arbiza et al., 1992; Lopez et al., 1998).

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

Preparações de anticorpos usados contra hRSV em hospedeiros imunocomprometidos pode ser um agente seletivo em diferentes ciclos de replicação. Escapes mutantes do tratamento foram selecionados em células cultivadas com anticorpos anti-F e anti-G do hRSV (Zhao et al., 2006). Esses resultados confirmam a possibilidade de seleção de vírus escape mutantes; por essa

razão decidimos verificar, em amostras clínicas obtidas em coletas no Hospital Universitário da USP de crianças com infecção no TRI no ano de 2004, há existência de variabilidade entre as amostras e possíveis pontos de mutações, que poderiam levar a resistência parcial ou total ao medicamento Palivizumab, utilizando o método de seqüenciamento parcial da proteína F do hRSV.

2 OBJETIVOS

- Verificar a variabilidade genética da proteína F de amostras de hRSV identificadas na cidade de São Paulo, através da análise das seqüências do gene F de diferentes linhagens, no período de 2004.
- Avaliar os padrões obtidos através do seqüenciamento de sítios específicos do gene da proteína F, com os sítios de epítópos do monoclonal humanizado Palivizumab[®] utilizado como tratamento da doença causada pelo hRSV, verificando assim a existência de sítios de mutação específica, escapes mutantes para resistência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

A população estudada foi formada por 435 crianças com até 5 anos de idade, que apresentaram quadro clínico respiratório e que foram internadas na Clínica Pediátrica do Hospital Universitário da USP (HU/USP).

As amostras clínicas foram colhidas durante o ano de 2004 após a assinatura, pelos pais ou responsáveis, de um Termo de Consentimento e com a aprovação da Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário e do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.2 Diagnóstico do hRSV

Foram coletadas amostras clínicas de aspirado de nasofaringe e *swab* nasal. Foi colhido, de uma das narinas de cada criança, um *swab* seguido de aspiração da secreção da nasofaringe com o auxílio de um catéter, depositando-a em um equipo de solução parenteral, *que* foram transferidos, imediatamente, para um frasco contendo PBS 0,01 M (pH 7.2) estéril. Os dois materiais foram transportados, sob refrigeração, para o laboratório, em um período máximo de 4 horas.

3.3 Processamento das amostras

O aspirado e o *swab* foram homogeneizados e tratados com 1000U/mL de penicilina e 1000 µg/mL de estreptomicina (*Gibco BRL*®). Após 30 minutos a 4 °C, as amostras foram separadas em alíquotas: uma para inoculação em cultura de células (600 µL), com adição de meio de congelamento (soro fetal e glicerina) e outra para testes de Biologia Molecular, com adição de Trizol LS®

3.4 Isolamento em cultura de células

Amostra viral padrão: A amostra padrão de hRSV A2 foi utilizada como controle positivo das reações. A amostra foi inoculada em células HEp-2 (cultivadas em meio

Eagle contendo 10% Soro Fetal Bovino) em garrafas de 25 cm² e monitoradas até o aparecimento de efeito citopático. Tais garrafas, com sincícios em mais de 50% da área de cultura, foram estocadas a -70 °C com Trizol LS. Células HEp-2 não inoculadas foram utilizadas como controle negativo e também congeladas nas mesmas condições.

3.5 Amostras clínicas

As amostras foram inoculadas em células HEp-2, como descrito anteriormente, em placas de 96 orifícios (*Corning Inc.*) O meio de crescimento foi a seguir, retirado e foram inoculados 150 µl de amostra por orifício, foram utilizados 3 orifícios por amostra. As células foram incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% CO₂, em câmara úmida, por 30 minutos, para adsorção. A seguir, acrescentamos 500 µL de meio de manutenção, incubando-se novamente, nas mesmas condições anteriormente descritas.

As células foram monitoradas diariamente para a detecção de efeito citopático (ECP), por um período de 15 dias ou até destruição total do tapete de células. As amostras que apresentaram formação de sincícios foram coletadas, com adição de Trizol LS[®] e estocadas a -70 °C.

3.6 RT-PCR

3.6.1 Extração do RNA total

Na extração do RNA viral foram utilizadas as amostras clínicas, as amostras clínicas inoculadas em cultura celular da amostra padrão e as células HEp-2 não inoculadas, utilizadas como controle negativo das reações (item 3.4).

Para a extração das amostras clínicas isoladas em cultura celular foram utilizadas as alíquotas estocadas com meio de congelamento. Todo processo de extração foi realizado em banho de gelo, com reagentes gelados e centrifuga refrigerada, 1 mL do lisado de células foi adicionado 100 µL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (*Merck-Sigma*). Após a homogeneização em vortex por 15 segundos e incubação por 5 minutos em banho de gelo, a amostra foi centrifugada a 7200 x g

por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa, cerca de 400 µL, foi transferida para outro tubo, sendo que o RNA precipitado pela adição de isopropanol (*Sigma Chemical*) volume a volume, seguido de homogeneização em vortex, incubação em banho de gelo por 15 minutos e centrifugação a 7200 x g por 15 minutos a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 800 µL de etanol a 75% (*Merck-Sigma*) diluído em água Milli-Q tratada com DEPEC, seguido de centrifugação a 4000x g por 8 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 20 µL de água tratada com DEPEC contendo 40U de inibidor de ribonuclease (*Rnasin-Promega*). Logo em seguida foi realizada a transcrição reversa para obtenção do cDNA.

3.6.2 Obtenção do cDNA (RT)

Utilizamos o kit comercial *High-Capacity cDNA Archive* (*Applied Biosystems®*), com 50 µL de RNA extraído, diluídos em tampão contendo 50 mM de Tris-HCl [pH 8.3 a 25 °C] / 75 mM de KCl / 3 mM de MgCl₂ (10x RT Buffer), 50 pMoles de *Random primers*, 10 mM de Dithiothreitol, 50 U/µL da enzima MultiScribe RT, 0.2 U de Inibidor de Ribonuclease, 1.5 mM de 25x dNTP mixture e água ultra pura (*Gibco*) q.s.p. 100µL. A mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems®*). O cDNA foi armazenado em freezer -70 °C.

3.7 PCR Diagnóstico por GeneScan

O diagnóstico por *GeneScan* foi realizado a partir do cDNA provenientes das amostras clínicas como descrito no item 3.6.1 e 3.6.2. A amplificação foi efetuada com a diluição de 3 µL de cDNA em tampão 20 mM de Tris-HCl pH 8, 4/50 mM KCl/, 5 mM de MgCl₂ (*Applied Biosystems®*), 25 pMoles dos *primers* RSVAB F1-FAM⁺ e RSVAB R1⁻ (Mazzulli et al., 1999; Erdman et al., 2003), 1U de Taq DNA Polimerase (*Applied Biosystems®*), 0.2 mM de dNTPs e água ultra pura livre DNases q.s.p. 25 µL. As seqüências alvos, para diagnóstico do hRSV, faziam parte da subunidade F1

do gene da proteína F, o *primer sense* possuía um marcador fluorescente (*FAM-Gibco BRL*).

A reação foi amplificada em termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®)*, a partir de uma etapa 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 54 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e uma etapa final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram estocados a 4 °C.

3.8 Primers utilizados para tipagem das amostras por seqüenciamento

Primers complementares aos mRNAs dos genes da glicoproteína G e F foram utilizados para amplificar e seqüenciar as amostras de hRSV e estão esquematizados (Tabela 1).

Primer	Utilização	Posição	Sequencia (5' – 3')	Referência
FV ⁻	PCR	163-186 gene F	GTTATGACACTGGTATACCAACC	Zheng et al., (1996)
F1AB ⁻	Semi <i>nested</i> Sequenciamento	3-22 gene F	CAACTCCATTGTTATTTGCC	Peret et al., (1998)
Gr5 ⁺	PCR Semi <i>nested</i> e seqüenciamento	151-173 gene G	CTGGCAATGATAATCTCAACTTC	Sanz et al., (1994)

3.9 Amplificação da seqüência parcial do gene G

As amostras positivas para hRSV pelo *GeneScan* foram submetidas a PCR para amplificação parcial do gene G que foi realizado a partir de 5 µL do cDNA diluído em tampão de reação, 10 mM tris-HCl (pH 9), 1.5 mM MgCl₂; 50mM de KCl [PCR buffer 10x (*Amersham Pharmacia Biotech*)], 0.2 mM de cada dNTP, 2.5 U de Taq DNA polimerase, 50 pmoles dos primers Gr5⁺ e FV⁻ e água Milli-Q tratada com DEPEC q.s.p. 50 µl. A amplificação foi realizada utilizando termociclador *Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems®)*, com pré-aquecimento a 95 °C por 2 minutos,

seguida de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Findos os ciclos, seguiu-se um aquecimento a 72 °C por 7 minutos de extensão final e inativação enzimática.

A *semi-nested* PCR foi feita utilizando-se como amostra 10µL do produto da primeira amplificação, nas mesmas condições descritas acima, com os *primer* Gr5⁺ e F1AB⁻.

3.10 Análise dos produtos amplificados do gene G

A detecção do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose [1.5% (*Gibco BRL*®)], em tampão TBE 0.5x [45mM de Tris-Borato e 1mM de EDTA (pH 8.0) e 0.5 µg/ml brometo de etídeo]. Foi submetida à eletroforese 10 µl da amostra e 2 µl de azul de bromofenol (*loading buffer*), em cuba horizontal (*Gibco BRL*®), durante 40 minutos a 100 volts. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta (UV), sendo fotografado, a seguir, para uma análise mais detalhada.

3.11 Purificação dos produtos amplificados

Os produtos amplificados por *semi-nested* RT-PCR foram purificados, para remoção de dNTPs e *primers* residuais. Cerca de 100 µL do produto do *semi nested* RT-PCR foi transferido para um micro tubo de 1.5 mL e adicionada água DEPEC ao produto de PCR (vol./vol.), foi acrescentado 10% do volume total de acetato de sódio pH 5.29 3M e 2 vezes o volume de etanol 100%. Procedeu-se a agitação em *vortex* e armazenamento em freezer por 2 a 3 horas, em seguida as amostras foram centrifugadas por 30 minutos em 14.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante o foi descartado, e foi realizado a lavagem do micro tubo com 150 uL de isopropanol 75%, foi centrifugado por 10 minutos em 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco em *speed vacuum* (60 °C por 20 min), por último o *pellet* foi ressuspenso com 40 µL de água MilliQ. Uma alíquota do produto purificado foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1.5% para quantificação utilizando como marcador *DNA Mass Lader* (*Gibco BRL*®).

3.12 Tipagem por seqüenciamento do gene G

Após a purificação, as fitas de DNA foram seqüenciadas utilizando-se o kit *ABI PRISM Dye™ - Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystem®)*, segundo as instruções do fabricante.

Foram utilizados os primers Gr5⁺ e F1AB⁻ e descritos no item 3.8 para tipagem através do seqüenciamento em grupo A ou B do hRSV. Cerca de 5µL, correspondendo a 10-30 ng do produto purificado (item 3.11), foi adicionado a um micro tubo com 3.2 pmol do *primer*, 2µL do *Terminator ready reaction Mix (Big Dye)*, 6µL do tampão de seqüenciamento (*save money*-Tris HCl 200mM (pH 9) e 5 mM MgCl₂ e água Milli-Q q.s.p. 20µL. Todas as reações foram feitas em duplicatas com ambos os primers (Gr5⁺ e F1AB⁻). A extensão enzimática foi realizada termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®)*, durante 25 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos .

3.13 Purificação da reação de seqüenciamento

O produto foi purificado, visando a remoção de excesso de dideoxinucleotídeos (terminadores) presentes na reação, por precipitação com isopropanol. Ao produto da reação de seqüenciamento foram adicionados 30 µl de água Milli-Q e 60 µl de isopropanol a 100%, logo em seguida levou-se ao *vortex* e posterior centrifugação por 60 minutos a 4000 x g em temperatura ambiente, utilizando centrífuga (*Centrifuge 5804R-Eppendorf®*). O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 250 µl de etanol 70%, novamente levou-se ao *vortex* e posterior centrifugação por 30 minutos a 4000 x g em temperatura ambiente.

As amostras purificadas e precipitadas foram ressuspensas com 10 µl de formamida ultra pura (formamida *Hi-Di – Applied Biosystems®*), denaturadas a 95 °C por 3 minutos e resfriadas em banho de gelo por mais 2 minutos e então submetidas a eletroforese em polímero POP6 (*Applied Biosystems®*), utilizando sequenciador

automático ABI-PRISM modelo 3100 (*Applied Biosystems*®) e analisadas utilizando software do Analisador Automático de DNA ABI Prism modelo 3100.

3.14 Processamento, alinhamento e análises genealógicas das seqüências do gene G

As seqüências de nucleotídeos foram analisadas com o programa *Sequence Navigator* versão 1.0 (*Applied Biosystems*®), para *Power Macintosh*, de modo a obter um segmento de 270 nucleotídeos que correspondem à região variável G2, da glicoproteína G, a que compreende os nucleotídeos 649-918 para o grupo A e 652-921 para o grupo B (Peret et al., 1998). Para análise da variabilidade de nucleotídeos intra-genótipos as seqüências representantes de cada genótipo foram alinhadas, utilizando o programa *MegAlin*™ 4.05, para obtenção do grau de similaridade, calculado par a par.

3.15 Amplificação da seqüência do gene F

A amplificação teve início no nucleotídeo 152 a 1205 do gene F utilizando os *primers* FV⁺ (5'-GGTTGGTATACCAAGTGTGATAAC-3'), correspondente ao nucleotídeos 152-170 do gene F e BO2Rev (5' ATCTGTTTTTGAAGTCAR-3') complementar ao nucleotídeos 1216-1199 do gene F, produziu um fragmento de 1053 pb. Utilizamos 5 µL do cDNA (itens 3.6.1 e 3.6.2) diluído em tampão de reação 10 mM tris- HCl (pH 9), 1.5 mM MgCl₂; 50mM de KCl (PCR buffer 10X - *Amersham Pharmacia Biotech*), 0.2mM de cada dNTP, 2.5 U de Taq DNA polimerase (*Amersham Pharmacia Biotech*), 50pmol de cada primer e água DEPEC q.s.p. 50 µL. Com uso termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*®), com pré-aquecimento a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, 94 °C por 1 minuto e 30 segundos, 54 °C por 2 minutos e 72 °C por 1 minuto e 72 °C por 7 minutos.

3.16 Análise dos produtos amplificados do gene F

A detecção do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1.2% como descrito no item 3.10

3.17 Purificação dos produtos amplificados do gene F

Os produtos amplificados por PCR foram purificados como descrito no item 3.11.

3.18 Seqüenciamento do gene F do hRSV

As seqüências foram determinadas diretamente dos produtos de RT-PCR e foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos FV⁺ e BO2⁻ por meio do *kit* ABI PRISM *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction kit* (*Big Dye*-Applied Biosystems).

Para reação de seqüenciamento, utilizamos 10-30 ng, do produto purificado, 3.2 pmol, 8 µl do *Terminator ready reaction Mix*, *Big Dye* e água Milli-Q para completar um volume final de 20 µl. A extensão enzimática foi realizada em termociclador *GeneAmp PCR System 2400* durante 25 ciclos de 96 °C por 10 minutos para denaturação do DNA molde, 50 °C por 10 segundos.

O produto seqüenciado foi purificado como descrito no item 3.13.

3.19 Análise da variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos

As seqüências de nucleotídeos do gene F foram analisadas com o programa *SeqMan 4.05 - Expert Analysis Software - DNASTAR*.

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas, utilizando o programa *MegAlign 4.05 Expert Analysis Software - DNASTAR*. 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.

4 RESULTADOS

4.1 Fluxograma do trabalho

4.2 Diagnóstico do hRSV através do método de RT-GeneScan-PCR

As amostras clínicas foram colhidas durante o ano de 2004, totalizando 435 amostras de crianças com até 5 anos de idade, internadas na Clínica Pediátrica do Hospital Universitário da USP (HU/USP). Destas 435 amostras, 188 (43%) foram positivas para hRSV.

Estas amostras foram coletadas em diferentes serviços de saúde oferecidos pela equipe pediátrica do Hospital Universitário, 30% das amostras foram colhidas no PA

(pronto-atendimento) que correspondem aos atendimentos realizados ambulatoriamente, 22% na UTI (Unidade de Terapia Intensiva), 44% foram de crianças hospitalizadas na enfermaria e 4% no berçário.

4.3 Distribuição de Casos Positivos em Relação à Faixa Etária

Das 435 amostras coletadas, 316 amostras perteceram à crianças com até um ano de vida e esta relação nos fornece um percentual de 73% nessa faixa etária. Destas 316 amostras coletadas, 126 amostras (29%) foram hRSV positivas, em todo período estudado. O restante que corresponde a 111 amostras estavam distribuídas em crianças com idade de 1 a 5 anos, que representam 25% do total. Nessa faixa etária, 62 casos foram positivos para hRSV, perfazendo um percentual de 14%. Em 8 amostras (2%) não obtivemos os dados de idade dos pacientes, representados no Gráfico 1.

Gráfico 1. Casos hRSV positivos e negativos em relação à Faixa Etária dos pacientes: Número absoluto de amostras em crianças com até 12 meses de vida e com crianças de 1 a 5 anos.

4.4 Sazonalidade do Vírus Respiratório Sincicial Humano

As amostras foram colhidas durante os meses de Janeiro a Dezembro de 2004. Podemos observar no Gráfico 2 que a incidência de hRSV positivos ocorreu entre os meses de março a junho .

Gráfico 2. Distribuição das amostras colhidas no ano de 2004: amostras coletadas x amostras positivas para hRSV.

4.5 Tipagem das amostras de hRSV coletadas durante o ano de 2004: nos grupo A e B

A amplificação das amostras utilizando os primers FV⁻ e Gr⁵⁺ gerou um produto de 980 p.b. No entanto, algumas amostras positivas não foram amplificadas, e 55 amostras positivas tiveram parte do gene da proteína G seqüenciado, permitindo a tipagem e genotipagem das amostras. Do total das 188 amostras, 46 amostras (84%) foram do grupo A e 9 (16%) foram do grupo B.

4.6 Sazonalidade dos diferentes Genótipos circulantes nas amostras de 2004

As 55 amostras dos grupos A e B do hRSV, foram genotipadas através de análise filogenética utilizando o programa *Meg Align 4.05 - Expert Analysis Software-DNASTAR*. Foi possível identificar 20 amostras pertencentes ao genótipo GA2, 26 amostras foram pertencentes ao grupo GA5, 3 amostras foram do genótipo SAB1 e 4 amostras do genótipo SAB3, 1 amostra GB3 com inserção e 1 BA like (Grafico 3).

Gráfico 3: Grupos circulantes obtidos seqüenciamento da porção variável G2 na proteína G do Vírus Respiratório Sincicial Humano.

Os genótipos co-circularam no ano de 2004 durante o período sazonal do hRSV, o genótipo GA5 foi predominante, sobressaindo no pico de incidência do vírus.

4.7 RT-PCR para amplificação do gene da proteína F do hRSV

Para amplificação do gene F testamos as 188 amostras positivas para hRSV identificadas no ano de 2004, pelo método de *GeneScan PCR*. Utilizando os *primers* FV sense e BO2Rev, que originaram um produto de 1053 pb, com início da

amplificação no nucleotídeo 152 e terminando no nucleotídeo 1205 da proteína F do hRSV. Destas 188 amostras conseguimos amplificar 105 amostras para o gene F e em 83 não conseguimos obter amplificação (Figura 5).

Figura 5: RT-PCR para detecção da proteína F. Em amostras hRSV positivas utilizando os primers FV^+ e BO_2Rev . Gel de agarose a 1, 2% e coloração por brometo de etídio. Foram aplicados nas canalasetas: 1-) amostra 58/2004 positiva; 2-) amostra 64/2004 positiva; 3-) amostra 68/2004 positiva; 4-) amostra 83/2004 negativa; 5-) amostra 84/2004 positiva; 6-) controle negativo; 7-) A2 protótipo; M-) Marcador de peso molecular (Invitrogen®).

4.8 Amostras clínicas positivas propagadas em cultura celular

Para aumentar a eficiência do RT-PCR na amplificação do gene F do hRSV e consequentemente uma melhor qualidade no seqüenciamento, inoculamos um total 50 amostras clínicas em cultura de células HEp-2 (item 3.5), que foram positivas pelo método de *Gene Scan-RT PCR* e em 24 amostras conseguimos propagar o vírus, constatado por observação da formação de sincícios nas culturas positivas e como controle negativo utilizamos as células HEp-2, descrito no item 3.4.

4.9 Sequenciamento parcial da Proteína F do hRSV

Das 139 amostras de hRSV amplificadas por RT-PCR para a subunidade F2 do gene da F, 30 amostras obtiveram qualidade para serem seqüenciadas com o *kit ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction kit (Big Dye - Applied Biosystems)* como descrito no item 3.17. Para análise da variabilidade de

nucleotídeos além das 30 seqüências do gene F provenientes das amostras clínicas, agrupamos a seqüência representante do grupo A2 (gi333959) do hRSV.

As seqüências consenso (Figura 6) geradas, foram alinhadas gerando o grau de similaridade entre as seqüências de nucleotídeos (Figura 4), através do programa *Meg Align 4.05-Expert Analysis Software-DNASTAR*. A análise das seqüências das amostras clínicas geradas, não apresentou nenhuma substituição nos nucleotídeos 816, 827 e 828 (Zhao et al., 2004,2005,2006), que indicaria resistência ao medicamento Palivizumab® nas amostras circulantes no ano de 2004.

Sequence Name	10	20	30	40
Consensus	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
gi333959 sul	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R58-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R68-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R77-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R84-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R86-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R87-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R92-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R93-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R100-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R115-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R126-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R127-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R136-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R148-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R157-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R169-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R177-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R178-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R189-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R197-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R206-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R215-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R221-04	CCYATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R222-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R224-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R225-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R268-04	CCCATAACTAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R303-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R304-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			
R315-04	CCTATAACAAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTTCA			

Figura 6. Alinhamento das seqüências com ênfase nas posições 816, 827 e 828. Estas representadas por caixa em cor verde e comparadas com a amostra protótipo A2 (gi 333959) em conjunto com as 30 seqüências obtidas do gene da proteína F gerado pelo programa *Meg Align 4.05 DNASTAR*.

4.10 Comparação entre as sequências da Proteína F e os Genótipos do hRSV

Com os genótipos identificados da proteína G e as sequências obtidas pelo seqüenciamento da proteína F do hRSV foi possível fazer uma comparação entre as duas proteínas por meio de uma árvore genealógica. Para algumas amostras seqüenciadas da proteína F e da proteína G não foi possível fazer a comparação entre as duas proteínas, por não obtermos a genotipagem da proteína G (amostras: 86/2004, 148/2004, 84/04, 197/04, 224/04, 222/04, 136/2004, 100/2004, 92/2004, 87/2004 e 315/2004).

Figura 7. Árvore Genealógica com seqüências da proteínas F e os genótipos da proteína G. Todas as seqüências da proteína F têm tamanho de, 334 pares de bases (iniciando no nucleotídeo 690 e terminando no nucleotídeo 849) da proteína F.

5 DISCUSSÃO

O hRSV é o principal patógeno relacionado a infecções do trato respiratório inferior em lactentes, crianças na fase pré-escolar e em idosos, com uma incidência nas crianças hospitalizadas variando de 26% a 41% (Forster et al., 2004; Garcia et al., 2004).

Em nosso estudo, dentre as 435 amostras coletas com diagnóstico de sintomas de doenças no TRI em crianças com até 5 anos de idade, 188 (43%) foram positivas para hRSV, as crianças foram atendidas no Hospital Universitário/USP em quatro setores distintos Pronto Atendimento onde foram colhidas 30% do total de amostras, na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica, 22%; Enfermaria, 44% e Berçário 4%.

Em um trabalho realizado em Salvador por Souza et al (2003), foi observada uma incidência de doença no TRI de 7.66 episódios em cada 1000 crianças, sendo que o hRSV foi identificado em 4% de todos os casos de doença do TRI. Iwane et al. (2004), obteve com seus experimentos uma prevalência de infecção pelo hRSV de 13 episódios em 1000 crianças com até um 1 ano de vida e de 0.4% episódios em 1000 crianças hospitalizadas de 2 a 5 anos de idade. Segundo Costa et al. (2006) com amostras provenientes do Hospital de Clínicas (HC/UFU), na cidade de Uberlândia (MG) observou-se 26.4% de positividade para hRSV e também concluíram que a maioria dos casos positivos eram em crianças com menos de 6 meses de vida. Ainda, em trabalho de Moura et al. (2006) na cidade de Fortaleza (CE) o hRSV foi detectado em 21% dos casos; sua sazonalidade foi de janeiro a agosto e estava associada à estação das chuvas.

Foi importante avaliar a faixa etária das crianças com doença do TRI, pois nossos dados corroboram com outros trabalhos descritos na literatura, indicadores da influência direta na incidência de casos positivos para hRSV. Essa avaliação também nos faz dizer que as crianças em tenra idade terão uma maior probabilidade de serem acometidas pela infecção pelo hRSV, conforme observado em nosso estudo, pois a maior incidência de casos positivos ocorreu em lactentes*. Das 435 amostras coletadas, 316 eram pertencentes a crianças com até um ano de vida, perfazendo um percentual de 73% no total geral de amostras. Entre elas, 126 crianças (29%) foram positivas para infecção com hRSV. Na faixa etária de 1 a 5

*crianças com até 12 meses

anos foram coletadas 111 amostras e 62 crianças obtiveram resultados positivos para hRSV (25%) e, em 8 amostras (2%) não possuímos a idade dos pacientes.

Com esses dados podemos constatar que o hRSV é uma importante causa de doença respiratória em lactentes, concordando com os dados da literatura de países desenvolvidos e em alguns países em desenvolvimento, onde o hRSV foi o principal agente de infecção viral das vias aéreas inferiores em crianças (Herreira-Rodriguez et al., 2007; Myao et al., 1999; Moura et al., 2003; Cintra et al., 2001; doNascimento et al., 2008; Souza et al., 2003). Um trabalho realizado por Herrera-Rodríguez et al. (2007) na população atendida no Hospital Militar de Bogotá (Colombia) comprovou que os casos de hRSV eram mais severos quando comparados a outros vírus respiratórios estudados e leva a eventos mais graves, como pneumonia e bronquiolite. Sua sazonalidade decorreu em todos os meses do ano, exceto no mês de julho, com picos de incidência em abril, junho e agosto. Também foi observado que os custos do tratamento de pneumonia com etiologia viral estão entre 273 e 550 dólares por criança.

Em um estudo realizado por Weber et al (1998), cujo trabalho analisou 4 epidemias de hRSV em Gâmbia (Africa), o hRSV também foi considerado um importante agente nas internações em lactentes com diagnóstico de doença do TRI, com impacto significativo na morbidade, mortalidade e nos custos de saúde pública, principalmente quando houve necessidade de oxigenoterapia.

Constatamos em nosso estudo que as infecções causadas pelo hRSV ocorreram nas estações de outono e inverno, com início no mês de março até junho. Em abril, ocorreram a maior quantidade de casos diagnosticados do hRSV. No Brasil, dados semelhantes em relação ao padrão sazonal do hRSV são demonstrados na cidade do Rio de Janeiro (Nascimento et al., 1991; Suttmoller et al., 1995), e em São Paulo (Botosso, 2003; Vieira et al., 2001; Tomazelli, 2007).

Em outros estudos realizados em diferentes localidades no Brasil como Campinas (Silva et al., 2008), Uberlândia (Serafino et al., 2004,2008) e Aracajú (Ribeiro et al., 2008), os autores também descreveram uma sazonalidade típica, com surtos ocorrendo entre os meses de março a setembro e com picos de incidência nos meses de abril, maio e junho (Bosso et al., 2004; Campos et al., 2007; doNascimento et al., 2008).

O hRSV é dividido em dois grupos A e B, sendo que a maior diferença está na glicoproteína G (Mufson et al., 1985; Johnson et al., 1987; Hendry et al., 1988). Os dois grupos apresentam co-circulação durante os surtos, com predominância do grupo A, dependendo do local e do ano (Viegas et al., 2005; Frabasile et al., 2003; Scott et al., 2004; Zlateva et al., 2004; Gilca et al., 2006). Em nosso trabalho, através do sequenciamento parcial do gene da proteína G do Vírus Respiratório Sincicial Humano, com os primers FV⁻ e Gr5⁺, descritos em nossa metodologia, foram geradas 55 sequências. Dentre elas, 45 sequências (84%) pertenceram ao grupo A e 9 (16%) ao grupo B.

A análise da variabilidade genética do gene G permitiu a subdivisão em genótipos. Durante um surto verificou-se a co-circulação de vários genótipos, com predominância de um ou dois que podem tanto persistir no decorrer dos anos, como ter a circulação diminuída até o desaparecimento (Moura et al., 2004; Silva, 2008). A dinâmica de circulação do hRSV pode ser influenciada pela seleção natural, devido à imunidade adquirida da população e aos processos epidemiológicos (Zlateva et al., 2005; Martinez et al., 1999).

Zlateva et al., (2004 e 2005) identificaram sítios sob pressão seletiva positiva no ectodomínio externo da proteína G, de amostras do grupo A e B, sugerindo pressão imune sobre esses códons. As alterações desses sítios podem possibilitar o escape da imunidade preexistente e, conseqüentemente, infecção da população.

Através da análise da variabilidade genética das amostras de hRSV circulantes em 2004, observou-se que, das amostras 55 amostras seqüenciadas, identificamos diferentes genótipos circulantes durante o ano de 2004 e caracterizamos 20 amostras pertencentes ao genótipo GA2, 26 identificadas como GA5, 3 amostras como genótipo SAB1, 4 amostras SAB3, 1 GB3 com inserção e 1 BA *like*.

A amostra BR157-04 que é do tipo B pertence a um genótipo emergente, o BA *like* que tem uma inserção de 60 nucleotídeos na proteína G, também identificado recentemente na cidade de Salvador (Moura et al., 2003).

Viera et al., (2008), investigaram a presença de anticorpos tipo e subtipo específico no soro de crianças e puderam constatar, com seus experimentos, que os anticorpos adquiridos maternalmente não oferecem proteção específica, causada pelos grupos A e B ou por genótipos GA2, GA5 e GA3 em crianças.

Outro trabalho realizado por Queiroz et al., (2002) revelou: 1. que os anticorpos maternos podem interferir na produção de IgG no organismo da criança e mediar uma imunossupressão temporária; 2. que a maioria das crianças menores de 3 meses não estão hábeis para produzir títulos de anticorpos protetores suficientes e 3. na maioria dos casos, os anticorpos maternos não são suficientes para neutralizar o hRSV como causador de infecção.

Para aumentar a quantidade de partículas virais utilizamos o método de cultura celular, que é a *Gold Stantard* para diagnóstico da infecção pelo hRSV, por essa razão, utilizamos esse método para obtenção de controles positivos para reação de *RT-PCR GeneScan* e, num segundo momento, para o isolamento viral das amostras armazenadas em meio de congelamento. No intuito de aumentar a quantidade de partículas virais e posterior amplificação da proteína F, cultivamos 50 amostras e obtivemos 24 resultados positivos com formação de sincícios. Porém, como método diagnóstico rápido ela apresenta limitações devido à sensibilidade diagnóstica, ao tempo dispendido (aproximadamente 15 dias) e à necessidade de controle constante. Mas apesar destas limitações, esta técnica é necessária e utilizada no mundo inteiro (Savon et al., 2000; Kumar et al., 2008; Ward et al., 2008), mas com o avanço das técnicas moleculares de diagnóstico, que contribuiu para maior rapidez e sensibilidade na detecção, ela já não é comumente utilizada para diagnósticos rápidos (Bonroy et al., 2007).

O diagnóstico rápido do hRSV é importante não só para evitar o uso desnecessário de antibióticos em casos de infecções virais, bem como tomar providências, pertinentes a fim de evitar as infecções hospitalares causadas pelo vírus (Aldous et al., 2004).

A RT-PCR é considerada um método rápido de detecção do hRSV, apresentando alta sensibilidade sendo útil no diagnóstico de infecções. Tanto a quantidade quanto o período de excreção do vírus são pequenos, particularmente em idosos (Falsey et al., 2002; Freymuth et al., 2006; Valle et al., 2006; Walsh et al., 2001). Em diversos estudos sobre a etiologia das principais viroses causadoras de doenças agudas do TRI em crianças, inferiu-se que a RT-PCR é mais sensível do que o isolamento viral na detecção do hRSV em amostras clínicas, aumentando a eficiência em até duas vezes (Weinberg et al., 2002; Kuroiwa et al., 2004; Belak e Thoren, 2001; Hakhverdyan et al., 2004).

As doenças respiratórias são responsáveis por altos índices de internações e elevadas taxas de letalidade e morbidade nos países em subdesenvolvidos, como Nigéria, Índia, Argentina, Brasil, Chile (Johnson et al., 2008; Campos et al., 2007; Klein et al., 2006; Yeolekar et al., 2008; Luchsinger et al., 2008).

O hRSV, por ser predominante dentre as etiologias virais, nas doenças do trato respiratório em lactentes e crianças em idade pré-escolar hospitalizadas (Vieira et al., 2001; D'Elia et al., 2005) surgiu o interesse e diversos grupos de pesquisas tem unido esforços para desenvolvimento de uma vacina e/ou tratamento para essas infecções. Dentre essas crianças, aquelas que apresentaram um risco superior de mortalidade para hRSV são as prematuras, com doença pulmonar, doença congênita do coração, imunodeficiência congênita ou adquirida, fibrose cística e transplantados de medula óssea (Puthothu , 2007; Ogra, 1988; Machado, 2003; Eisenhut et al., 2004; DeCarvalho, 2007); dessa forma, os esforços para prevenção e/ou tratamento devem ser voltados para esse grupo de risco.

Crianças, que apresentaram doença cardíaca congênita e receberam profilaticamente o medicamento Palivizumab, proporcionou uma redução no tempo de hospitalização. Segundo diversos trabalhos compilados demonstrados no *The Impact-RSV* (1999), pois crianças prematuras com ou sem doença crônica de pulmão diminuíram seu tempo de hospitalização (Moynihan et al., 2004; Simões et al., 2007).

Para determinar a ocorrência ou não de vírus resistente ou não ao Palivizumab, seqüenciamos 30 amostras clínicas do hRSV no ano de 2004 e seqüenciamos sítios específicos do gene F, com possíveis pontos de mutação nos nucleotídeos 827 e 828 que representam dois diferentes aminoácidos na posição 272 na subunidade 1 (Lisina para Metionina ou Glutamina, respectivamente) e estão diretamente associadas à resistência *in vitro* ao Palivizumab. Esses pontos de mutação levaram à resistência profilática dos efeitos do Palivizumab em *cotton rats* (Zhao et al., 2004).

Zhao X et al. (2006) em posterior trabalho encontrou outro ponto de mutação no nucleotídeo 816 (A em T), gerando a substituição de um aminoácido: Asparagina para Isoleucina na posição 268 na subunidade F1. Esse variante do vírus foi parcialmente resistente ao Palivizumab, mas não conferiu resistência ao medicamento em *cotton rats* tratados.

Variações antigênicas podem contribuir para estabelecimento das infecções por hRSV (Peret et al., 2000, Domingo et al., 1993) e variações dos vírus podem estar envolvidos no surgimento de vírus patogênicos provenientes de ancestrais não patogênicos (Holland et al., 1982; Domingo et al., 1996); além disso, muitos estudos durante as últimas 2 décadas documentaram a imprevisibilidade da variação genética nos vírus (Morse, 1993; Holland et al., 1982; Domingo, 1996).

As populações de vírus RNA consistem em distribuições complexas de genomas mutantes e às vezes também de genomas recombinantes, em um tipo de estrutura populacional conhecida como quasispecies (Domingo, 1997; Eigen et al., 1979; Domingo et al., 1995). Supondo uma distribuição aleatória das mutações entre os genomas, o número de genomas variantes (quasispecies) virais aumentaria drasticamente com o tamanho da população (Domingo et al., 1978; Domingo, 1997; Drake et al., 1999). A distribuição dos vírus mutantes, que compõe as quasispecies virais, é a matéria-prima para forças seletivas na evolução dos vírus RNA (Domingo et al., 1995). A persistência viral em um organismo requer um suprimento de células suscetíveis, replicando no mesmo ritmo viral, e a habilidade de sobreviver à resposta imune.

Os vírus utilizam, com frequência receptores alternativos e co-receptores para infectar uma célula alvo e uma ou poucas substituições de aminoácidos nas proteínas de superfície, podem provocar um *shift* na especificidade do receptor (Domingo, 1997).

A carga viral durante a replicação de vírus RNA, igualmente, tem um forte componente dinâmico. Em pessoas infectadas com HIV-1, HBV, ou HCV, foram estimados 10^{10} ou 10^{12} novos virions produzidos por dia, e o balanço entre as taxas de mutações e as etapas da replicação são umas das razões para ótima adaptabilidade dos vírus RNA (Domingo et al., 1997; Eigen et al., 1979; Domingo, 1997).

Evidências crescentes indicam que a evolução dos genomas quasispecies pode conduzir à seleção de cepas virulentas e a emergência de vírus patogênicos (Lederberg et al., 1992, 1993; Morse, 1993; Murphy et al., 1994; Holland et al., 1982; Domingo et al., 1996, 1997; McKnight et al., 1995).

Em um cavalo infectado com Encefalite eqüina venezuelana, os títulos virais no sangue alcançam um pico de 10^8 unidades infecciosas (i.u) por ml, ou um total de

aproximadamente 3×10^{12} i.u. Estes altos títulos são provavelmente necessários para uma transmissão eficiente do vírus para seus insetos vetores e para complementação do ciclo de vida desses arbovírus (Weaver, 1998). Altos títulos também são alcançados na infecção aguda com HIV-1, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, vírus influenza, e provavelmente de muitos outros vírus (Domingo, 1996; McMichael et al., 1997). Como exemplo, uma localização na região genômica não traduzida do vírus coxsackie B3 foi associada com o seu fenótipo cardiovirulento. A doença suína vesicular, não relatada antes de 1966, pode representar uma variação humana do coxsackie B5 adaptada aos suínos. Uma mutação específica do RNA viral do vírus da coriomeningite linfocítica conferiu ao vírus um tropismo para células neurais ou do sistema imune. As principais pandemias de gripe humana foram associadas à interação entre o genoma do vírus da gripe humana e de um vírus da gripe animal, com conseqüente *shift* antigênico. Outro exemplo é do parvovírus canino, que foi provavelmente derivado de um parvovírus felino como efeito de dois aminoácidos *replacements* no capsídeo viral (Lederberg et al., 1993, 1994; Murph et al., 1994; Domingo, 1996, 1997; McKnight et al., 1995).

Todos os vírus desenvolveram funções comuns e estratégias adaptativas, embora as estratégias usadas pelos vírus DNA e RNA para evadir as defesas do hospedeiro tenham características distintas. Os vírus RNA, por mutações, levam esses vírus a se esquivarem dos anticorpos e da resposta dos CTL do hospedeiro (McMichael et al., 1997; McKnight et al., 1995; Doms RW et al., 1997). Os vírus RNA são geralmente tolerantes a altos índices de mutagênese (Domingo et al., 1997; Eigen et al., 1979; Domingo et al., 1995). Em contraste, numerosos vírus DNA (como os das famílias herpes vírus, poxvírus, iridovírus e adenovírus) têm informações genéticas mais complexas e assim, necessitam manter essas informações, limitando a tolerância a mutações.

Para evitar a extinção e se manter na natureza, os vírus devem ter hospedeiros susceptíveis e ser adaptáveis aos diferentes ambientes biológicos. (Domingo et al., (1997). Se o vírus persistir em um hospedeiro individual, não haverá a constância desse patógeno na natureza por um longo tempo (Ewald, 1994; Levin et al., 1994; Garnett et al., 1994). Se o vírus sofrer um número de influências adicionais, como a possibilidade de transmissão em indivíduos de uma mesma espécie, ele poderá utilizar rotas alternativas de transmissão, como respiratória, sexual, parenteral ou

ainda entre diferentes espécies (Garnett et al., 1994; Ewald PW, 1994). Evidências apontaram que poucos pontos de mutação no genoma viral podem ser suficientes para ocasionar um descompasso em ciclos enzoóticos, levando a uma epizootia com características mais graves (Weaver SC, 1998).

Recentemente, estudos utilizando epítomos neutralizantes específicos da proteína F foram alvos de terapia através de monoclonais específicos desenvolvidos especificamente para imunização passiva anti-hRSV (Gimenez et al., 1984; Wahten et al., 1989).

Em um trabalho de Beeler et al., (1989), utilizou um parente murino do Palivizumab, MAb 1129, foi incapaz de neutralizar um dos isolados clínicos contra o qual ele foi testado, indicando que hRSV selvagens circulantes podem ser intrinsecamente resistentes ao Palivizumab.

Em nossas amostras não ocorreram tais mudanças nos nucleotídeos 816, 827 e 828, indicando que as amostras circulantes no Hospital Universitário na cidade de São Paulo não apresentam resistência ao anticorpo monoclonal Palivizumab. Colabora para isso o fato do medicamento Palivizumab ser administrado somente para populações restritas e muitas das infecções do hRSV não ocorrerem entre os que receberam Palivizumab. Dessa forma, parece que não existe uma vantagem seletiva durante passagens sequenciais na população, pois não houve, em geral, a utilização do medicamento.

Um grande estudo realizado em 139 centros que incluíram Canadá, USA e Reino Unido, avaliou o efeito protetor através de profilaxia com Palivizumab, (IMpact-RSV Study Group, 1998; The Prevent Study Group, 1997). Em estudo multicêntrico realizado pelo IMpact-RSV, 1500 crianças pré-maturas e crianças menores de 2 anos de vida com BPD foram recrutadas e tratadas com injeções de Palivizumab, aplicadas mensalmente durante 5 meses, 15mg/Kg ou equivalente volume de placebo. Usado profilaticamente, houve uma redução de 55% na incidência de hospitalizações ocasionadas pelo hRSV. Baseados nestes resultados destas múltiplas triagens, em 1998 o FDA aprovou o Synagis (Palivizumab) administrado via em injeções mensais intramusculares para imunoprofilaxia de doença respiratória grave em recém-nascidos de alto-risco e lactentes com BPD ou nascidas prematuramente (Wu et al., 2008). Subseqüentemente, o FDA licenciou o Palivizumab para tratamento em crianças com doença cardíaca congênita. O estudo foi liderado

por Feltes et al., (2003) e o grupo tratado teve uma redução de 45% nas hospitalizações quando comparadas a um grupo controle. Os dados deste estudo demonstraram que administração mensal de 15mg/Kg intramuscularmente foi segura, bem tolerada e efetiva para profilaxia de doença grave em crianças.

O Palivizumab foi aprovado na Europa em 1999 e em 2002 no Japão, após testes que avaliaram sua segurança e eficácia nessas populações (Groothuis et al., 2002). Em suma, o Palivizumab é indicado para prevenção de infecção por doença grave no trato respiratório inferior em pacientes pediátricos e de alto-risco, causadas pelo hRSV. Como descrito acima, para estes pacientes foi recomendada uma dose de Synagis (palivizumab) 15/Kg e a primeira dose deve ser antes do período de incidência do hRSV (Wu, 2007).

Um estudo com 700 isolados de hRSV em 19 países demonstrou que o Palivizumab tem habilidade de se ligar e neutralizar aos diferentes subtipos de hRSV (Saez-Llorens et al., 1998). Foi verificado, em outro estudo incluindo amostras do Japão, que o Palivizumab se ligou e neutralizou 47 isolados do subtipo A e 33 isolados do subtipo B (Johnson et al., 1997; Groothuis et al., 2002).

DeVincenzo et al., (2004) realizou um estudo com 371 isolados e foi possível observar que o Palivizumab se ligou a 100% dos isolados de crianças hospitalizadas com doença respiratória causada pelo hRSV, nos EUA. Tais amostras foram coletadas durante 4 anos seguidos à liberação pelo FDA para uso do Palivizumab (1998).

hRSV mutantes resistentes ao Palivizumab emergiram em cultura celular ou em *cotton rats* imunossuprimidos (Beeler e Coelingh., 1989; Crowe et al., 1998a; Zhao et al., 2004); assim, o Palivizumab parece exercer uma pressão seletiva no hRSV em crianças tratadas (DeVincenzo et al., 2003,2004). Mas quando observamos os estudos realizados por diversos grupos, foi verificado que, em pacientes hRSV positivas que receberam mAb e foram hospitalizados, não existiu a rápida seleção viral de mutantes que são resistentes parece ser rápida a seleção viral de mutantes que são resistentes ao mAb. O monitoramento de isolados clínicos não detectou resistência ao Palivizumab. É possível que algumas variantes possam ecludir e se disseminar na população (Zhao et al., 2006), embora, até o presente momento, variantes mAb-resistentes não tenham sido comprovadas na população humana (Crowe et al., 1998a; Zhao et al., 2004,2005) .

Segundo Smith et al., (2002) em um modelo tridimensional da proteína F do hRSV pôde-se observar uma estrutura em forma de cone subdividido em 3 regiões, nomeadas como cabeça, pescoço e haste. Baseado neste modelo, os epítomos do Palivizumab estão localizados no exterior do pescoço da proteína F. Colabora com esse resultado, um estudo realizado por Calder et al., (2000) que observou o comportamento do complexo da proteína F do hRSV, frente vários anticorpos monoclonais observados por microscopia eletrônica, e demonstrou que o site II é localizado próximo a base da cabeça da proteína F, sendo esta região conservada entre os grupos A e B.

Embora se tenha mapeado completamente o epítipo do Palivizumab, o mecanismo molecular com o qual esse anticorpo neutraliza o hRSV ainda não foi explicado. Algumas hipóteses foram sugeridas, que incluem a inibição da ligação da proteína no domínio de fusão nas células infectadas ou em prevenir o rearranjo da proteína F, requerido antes de ocasionar o processo de fusão (Johnson et al., 1999).

Outros anticorpos monoclonais anti-hRSV foram desenvolvidos para prevenir a infecção pelo vírus. Entre estes está RSHZ19, que é um anticorpo IgG1 humanizado, desenvolvido pela Glaxosmithkline. O anticorpo RSHZ19 (Johnson et al., 1999) produziu efeitos curativos e profiláticos na infecção causada pelo hRSV em ratos (Tempest et al., 1991), embora com resultados promissores para uso em humanos (Everitt et al., 1996). Em estudos clínicos de fase III, o anticorpo RSHZ19 falhou em proteger lactentes de alto risco contra infecção pelo hRSV. Em um estudo comparativo indicou que a falta de eficácia do RSHZ19 nos seres humanos foi devida a dois fatores: baixa potência quando comparada ao palivizumab e não afinidade em se ligar à proteína F do hRSV, evitando assim a neutralização e inibição do processo de fusão (Johnson et al., 1999).

O HNK20 é um anticorpo monoclonal IgA de rato e é direcionado contra glicoproteína F do hRSV este anticorpo foi desenvolvido pela empresa OraVaz. Com a administração do mAb na via aérea superior de macacos foi possível observar altos títulos de IgA no soro e em secreções nasais. Esse anticorpo também reduziu significativamente a transmissão do vírus (Weltzin et al., 1996). Nos estudos de fase III ele não demonstrou ser efetivo na neutralização do vírus em seres humanos e seu desenvolvimento foi descontinuado.

Com o uso de fagos, reproduzindo a imagem de fragmentos Fab de humanos, levou à identificação de fragmentos de neutralização direcionados para glicoproteína F do hRSV (Barbas et al., 1992). Um dos fragmentos Fab (Fab19) mostrou-se altamente eficaz para neutralizar o hRSV *in vitro*. Em experimento onde se administrou em ratos RSV-infectados, ele neutralizou o vírus e também ocasionou a diminuição do título de RSV nos pulmões do animal (Crowe et al., 1994). O autor deste trabalho sugeriu que este fragmento Fab possa ser usado profilaticamente em recém-nascidos, com alto risco para infecção com hRSV, por administração nasal direta.

Outro Fab (Fab RSVF2-5) foi eficaz contra os dois subtipos do hRSV (A e B), também foi igualmente eficaz, como descrito acima, e administrado por instilação em ratos contaminados (Crowe et al., 1998b). Mesmo com a expectativa de sucesso, nenhum destes anticorpos ou fragmentos obteve êxito em testes clínicos.

Apesar do grande interesse e dos esforços tanto biotecnológicos como acadêmicos na obtenção de outros anticorpos para tratamento da infecção causada pelo hRSV, o Palivizumab permanece o único anticorpo monoclonal aprovado para prevenção da infecção causada pelo hRSV em crianças prematuras e lactentes de alto risco. Sua segurança é abalizada pelos diversos estudos nessas populações específicas, que são mais facilmente monitoradas e isoladas, impedindo uma possível transmissão de escapes mutantes que possam se desenvolver.

Mais do que isso, comprovar a atividade de bloqueio da infecção por esses anticorpos, proporcionando o tratamento dessa população é importantíssimo para a saúde pública. A possibilidade de o vírus hRSV apresentar mutações de escape do tratamento abre portas para problemas muito maiores, como o uso de ventilação mecânica, UTI e óbito de pacientes. Não termos encontrado resistência em nossas amostras de 2004, por meio das mutações nos aminoácidos 272 da subunidade I da proteína F, que estão relacionadas à resistência *in vitro* ao Palivizumab, é de grande valia para o tratamento médico correto dessas crianças e profilaxia.

6 CONCLUSÕES

● A variabilidade genética da proteína F das amostras de hRSV identificadas na cidade de São Paulo através da análise das seqüências do gene F de diferentes linhagens, no período de 2004, não se mostrou eficiente para genotipagem das diferentes cepas de HRSV, ficando recomendado neste caso o seqüenciamento do gene da proteína G como referencia para tipagem molecular de hRSV circulantes.

● A avaliação dos padrões obtidos através do seqüenciamento de sítios específicos do gene da proteína F, com os sítios de epítópos do monoclonal humanizado Palivizumab® utilizado como tratamento da doença causada pelo hRSV, não foi verificado a existência de escapes mutantes nessas amostras, sendo o mesmo altamente recomendado como medicamento na prevenção da infecção pelo hRSV em crianças abaixo de um ano de idade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Ahmadian G, Chamber P, Easton AJ. Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumovirus. *J Gen Virol.* 1999; 2011-26.
- Aldous WK, Gerber K, Taggart EW, Thomas J, Tidwell D, Daly JA. A comparison of Binax NOW to viral culture and direct fluorescent assay testing for respiratory syncytial virus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 49(4):265-8.
- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C. Antigenic characterizations of Respiratory Syncytial Virus Strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 1985; 151:626-33.
- Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, McIntosh K. Multicenter study of strains of Respiratory Syncytial Virus. *J Infect Dis.* 1991; 163:687-92.
- Arbiza JG, Taylor JA, Lopez J, Furze S, Wyld P, Whyte EJ, et.al. Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1992; 73:2225-34.
- Arlanagic E, Matsumoto M, Suzuki K, Nerome K, Tsutsumi H, Hung T. Maturation of respiratory syncytial virus within HEp-2 cell cytoplasm. *Acta Virol.* 1996;40(4):209-14.
- Artiles- Campelo F, Pérez-González, MC, Caballero-Hidalgo A, Pena-López MJ. Etiology of acute viral respiratory tract infections in children from Gran Canaria Islands (Spain), *Infec Microbiol Clin.* 2006; Nov.24(9):556-61.
- Atkins JT, Karimi P, Morris BH, McDavid G, Shim S. Prophylaxis for respiratory syncytial virus with respiratory syncytial virus-immunoglobulin intravenous among preterm infants of thirty-two weeks gestation and less: reduction in incidence, severity of illness and cost. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19(2):138-43.
- Atreya PL, Peeples ME, Collins PL. The NS1 Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Is a Potent Inhibitor of Minigenome Transcription and RNA Replication. *J Virology.* 1998; 72, (2):1452-61.
- Barbas CF3rd, Crowe JE JR, Cababa D, Jones TM, Zebedee SL, Murphy BR, Chanock RM, Burton DR. Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 1,89(21):10164-8.
- Barik S. Control of nonsegmented negative-strand RNA virus replication by siRNA. *Virus Rev.* 2004; 102:27-35.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Beeler JA, Coeling K. Neutralizations epitopes of respiratory syncytial effect of mutation upon fusion. *J Virol*. 1989; 63:2941-50.

Behera AK, Matsuse H, Kumar M, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Blocking intercellular adhesion molecule-1 on human epithelial cells decreases respiratory syncytial virus infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 280:188-95.

Bermingham A, Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:11259-62.

Belák S, Thorén P. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. *Expert Rev Mol Diagn*. 2001; 1(4):434-43.

Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Yang L, Lamirande EW, Tran KC, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Recombinant human metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *Virology*. 2004; 78:12877-87.

Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Infection of non-human primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies a vaccine candidates. *J Virol*. 2005; 79:12608-13.

Bitko V, Musyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory syncytial viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med*. 2005; Jan.11(1):50-5.

Bonroy C, Vankeerberghen A, Boel A, Beenhouwer H. Use of a multiplex real-time PCR to study the incidence of human metpneumovirus and human respiratory syncytial virus infections during two winter seasons in a Belgian pediatric hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2007; May.13(5):504-9.

Bont L, Versteegh J, Swelsen WT, Heijnen CJ, Kavalaars A, Brus F, Draaisma JM, Pekelharing-Berghuis M, van Diemen-Steenvoorde RA, Kimpen JL. Natural reinfection with respiratory syncytial virus does not boost virus-specific T-cell immunity. *Pediatr Res*. 2002; 52(3)363-7.

Bossert B, Marozin S, Conzelmann KK. Nonstructural proteins NS1 AND NS2 of bovine respiratory syncytial virus block activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*. 2003; 77:8661-8.

Bosso PAR, Candeias JMG, Paduan KS, Ricchetti SMQ, Miranda AFM, Rugolo LMS, Durigon EL, Ventura AM. Human Respiratory syncytial virus detection in Children admitted at a communitu hospital in Botucatu, SP, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2004; 35:348-51.

Botosso VF. Diversidade Genética da glicoproteína G do Vírus respiratório Sincicial Humano (HRSV) entre amostras isoladas na cidade de São Paulo [tese (doutorado

em Ciências Biomédicas)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003.

Bourgeois C, Corvaisier C, Bour JB, Kohli E, Pothier P. Use of synthetic peptides to locate neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus. *J G Virol*, 1991; 71:1051-8.

Bowden RA. Respiratory virus infectious after marrow transplant: the Fred Hutchinson Cancer Research Center experience. *Am J Med*. 1997; 17,102(3A):27-30.

Brandenberg AH, Neijens HL, Osterhaus AD. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine*. 2001; 19:2769-82.

Buckingham SC, Bush AJ, Devincenzo JP. Nasal quantity of respiratory syncytial virus correlates with disease severity in hospitalized infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19(2):113-7.

Buckingham WSC, Jafri HS, Bush AJ, Carubelli CM, Sheeran P, Hardy RD, Ottolini MG, Ramilo O, DeVicenzo JP. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of dexamethasone in severe respiratory syncytial virus (RSV) infection: effects on RSV quantify and clinical outcome. *J Infect Dis*. 2002; May1.185(9):1222-8.

Bukreyev A, Whitehead SS, Murphy BR, Collins PL. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J Virol*. 1997; 89(73): 82.

Burke E, Mahoney NM, Almo C, Barik S. Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *J Virol*. 2000; 74:669-75.

Cabalka AK. Physiologic risk factors for respiratory viral infections and immunoprophylaxis for respiratory syncytial virus in young children with congenital heart disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23(1):S41-5.

Calder LJ, González R, Garcia-Barrero B, Wharton AS, Skehel JJ, Wiley DC, Melero JA. Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology*. 2000; 69:122-31.

Calegari T, Queiroz DAO, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TFM, Luiz LN, Oliveira RC, Diniz FC, Rossi LMG, Carvalho CJ, Lima AC, Mantese OC. Clinical-Epidemiological Evaluation of Respiratory Syncytial Virus Infection In Children Attended in a Public Hospital in Midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005; 9(2):156-61.

Camara AA, Silva JM, Ferriani VP, Tobias KR, Macedo IS, Padovani MA, Harsi CM, Cardoso MR, Chapman MD, Arruda E, Platts-Mills TA, Arruda LK. Risk factors for

wheezing in a subtropical environment: role of respiratory viruses and allergen sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(3):551-7.

Campos ACA, Durigon EL, Leal AL, Silva TS, Bosso PAR, Moraes CTP, Oliveira DBL, Lima HN, Vieira SE, Botosso VF, Zanotto PMA, Stewien KE. Comparison between ectodomain and G2 Region of Glycoprotein for Genotyping of HRSV. *Bras Journ Microbiol*. 2007; 38:413-6.

Cannon MJ, Banghan CR. Recognition of respiratory syncytial virus fusion protein by mouse cytotoxic T cell clones a human cytotoxic T cell line. *J Gen Virology*. 1989; 70:79-87.

Carbonell-Estrany X, Figueira-Aloy J, Law BJ, Infección Respiratoria Infantil por Virus Respiratorio Sincicial Study Group; Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada Group. Identifying risk factors for severe respiratory syncytial virus among infants born after 33 through 35 completed weeks of gestation: different methodologies yield consistent findings. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23(1):193-201.

Carromeu C, Simabuco FM, Tamura RE, Farinha ALE, Ventura AM. Intracellular localization of human respiratory syncytial virus L protein. *Arch Virol*. 2007; 152(12):2259-63.

Chanock RM, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg*. 1957a; 66:281-90.

Chanock RM, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzees coryza agent (CCA). II. Epidemiological aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg*. 1957b; 66.

Chanock RM, Vargosk OHW. Respiratory syncytial virus. - Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia and minor respiratory diseases in children. *J Am Med Assoc*. 1961; 176:647-53.

Chin J, Magoffin RL, Shearer LA, Scheble JH, Lennette EH. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population, *Am J Epidemiol*. 1969; 89(4):449-63.

Chi B, Dickensheets HL, Spann KM, Alston MA, Luong C, Dumoutier L, Huang J, Renauld JC, Kottenko SV, Roederer M, Beeler JA, Donnelly RP, Collins PL, Rabin RL. Alpha and lambda interferon together mediate suppression of CD4 T cell proliferation induced by human respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2006 May; 80(10):5032-40.

Cianci C, Genovese EV, Lamb L, Medina I, Yang Z, Zadjura, Yang H, D'Arienzo C, Sin N, Yu KL, Combrink K, Colonna R, Meanwell N, Clark J, Krystal M, Clark J, Krystal M. Oral efficacy of a respiratory syncytial virus inhibitor in rodent models of infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004a; Jul.48(7):2448-54.

Cianci C, Yu KL, Combrink K, Sin N, Pearce B, Wang A, Civiello R, Voss S, Luo G, Kadow K, Genovesi EV, Venables B, Gulgeze H, Trehan A, James J, Lamb L, Medina I, Roach J, Yang Z, Zadjura L, Collono R, Clark J, Meanwell N, Krystal M. Orally active fusion inhibitor of respiratory syncytial virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004b; Jul.48(7):413-22.

Cianci C, Meanwell N, Krystal M. Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55:289-92.

Cilla G, Sarasua A, Montes M, Arostegui N, Vicente D, Pérez-Yarza E, Pérez-Trallero E. Risk factors for hospitalization due to respiratory syncytial virus infection among infants in the Basque Country, Spain. *Epidemiol Infect.* 2006; 134(3):506-13.

Cintra OAL, Owa MA, Machado AA, Cervi MC, Figueiredo LTM, Rocha GM, Siqueira MM, Arruda E. Occurrence and Severity of Infections Caused by Subgroup A and B Respiratory Syncytial Virus in Children in Southeast Brazil. *J Med Virol.* 2001; 65:408-12.

Collins PL, Mottet G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1993; 74:1445-50.

Collins PL, Hill MG, Fohnson PR. The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: Sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol.* 1990; 71:3015-20.

Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:11563-67.

Collins PL, Hill MG, Cristina J, Grosfeld H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:81-5.

Collins PL, Camargo E, Hill MG. Support plasmids and support proteins required for recovery of recombinant respiratory syncytial virus. *Virology.* 1999; 259:251-5.

Collins PL, Crowe Jr JE. Respiratory Syncytial Virus. In: Fields BN. *Fields Virology.* 5th ed. Philadelphia, PA - Lippincott Williams & Wilkins. 2007; 1602-46.

Connolly SA, Leser GP, Yin Hsien-Shen, Jardetzky TS, Lamb RA. Refolding of paramyxovirus F protein from prefusion to postfusion conformations observed by liposome binding and electron microscopy. *PNAS* published online. 2006 Nov 8.

Committee on Infectious Disease. Revised indications for the use of palivizumab. *Pediatrics.* 2003; 112:1442-46.

Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TFM, Silveira HL, Nepomuceno LL, Moreira LS, Dyonisio G, Rossi LMG, Oliveira RC, Ribeiro LZG, Queiroz DAO. Respiratory viruses in children younger than Five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlandia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(3):301-6.

Crowe JE, Firestone CY, Crim R, Beeler JA, Coelingh KL, Barbas CF, Burton DR, Chanock RM, Murphy BR. Monoclonal antibody-resistant mutants selected with a respiratory syncytial virus-neutralizing human antibody fab fragment (F19) define a unique epitope on the fusion. *Virology*. 1998; 252:373-5.

Crowe JE Jr, Cheung PY, Wallace EF, Chanock RM, Larrick JW, Murphy BR, Fry K. Isolation and characterization of a chimpanzee monoclonal antibody to the G glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994; 1(6):701-6.

Curdy LH, Graham BS. Role of plasma membrane lipid microdomains in respiratory syncytial virus filament formation. *J Virol*. 2003; 77:1747-56.

DaSilva LH C, Spilki FR, Riccetto AG, de Almeida RS, Baracat EC, Arns CW. Genetic variability in the G protein gene of human respiratory syncytial virus isolated from the Campinas metropolitan region, Brazil. *J Med Virol*. 2008 Sep; 80(9):1653-60.

De Carvalho TM, dos Santos HP, dos Santos IC, Vargas PR, Pedrosa J. Newborn screening: a national public health programme in Brazil. *J Inher Metab Dis*. 2007; 30(4):615.

D'Elia C, Siqueira MM, Portes SA, Sant'Anna CC. Respiratory syncytial virus associated lower respiratory tract infections hospitalized infants. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 Jan-Feb; 38(1):7-10.

DeVincenzo JP, Aitken J, Harrison L. Respiratory syncytial virus (RSV) loads in premature infants with and without prophylactic RSV fusion protein monoclonal antibody. *J Pediatr*. 2003; 143(1):123-6.

DeVincenzo JP. Natural Infection of Infants with Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B: Study of Frequency, Disease Severity, and Viral Load. *Pediatr Res*. 2004; 56(6):1-4.

DeVincenzo J. Passive Antibody Prophylaxis for RSV. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; 27.

Dickens LE, Collins PL, Wertz GW. Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1984, Nov. 52(2):364-9.

Domingo E, Sabo DL, Taniguchi T, Weissmann C. Nucleotide sequence heterogeneity of na RNA phage population. *Cell*. 1978; 13:735-44.

Domingo E, Díez J, Martínez MA, Hernández J, Holguín NA, Borrego B. New observation on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J Gen Virol*. 1993; 74:2039-45.

Domingo E, Holland JJ, Biebricher C, Eigen M. Quasispecies: the concept and the word. In: Gibbs A, Calisher C, Garcia-Arenal F, editors. *Molecular basis of virus evolution*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995; 56:171-80.

Domingo E. Biological significance of viral quasispecies. *Viral Hepatitis Rev*. 1996; 2:247-61.

Domingo E. RNA virus evolution, population dynamics, and nutritional status. *Biol Trace Elem Res*. 1997a; 171-80.

Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997b; 51:151-78.

Doms RW, Peipert SC. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology*. 1997; 235:179-90.

doNascimento CA, Leal AL, Souza TS, de Moraes CT, Comone P, Tenório EC, Vedovello D, Quinzani RH, Gilio AE, Vieira SE, Durigon EL, Botoso VF, Sant'Anna OA. One-step reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of respiratory syncytial virus in children. *J Virol Methods*. 2008;148(1-2):115-9.

Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad USA*. 1999; 96:1-13910-30.

Easton AJ, Domachowske, Helene F. Rosenberg. *Animal Pneumovirus: Molecular Genetics and Pathogenesis*. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17(2):390-412.

Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of Viral Membrane Fusion and its Inhibition. *Annu Rev Biochem*. 2001; 70:777-810.

Eigen M, Schuster P. *The hypercycle. A principle of natural self-organization*. Berlin: Springer; 1979.

Eisenhut, M, Sidaras, D, Johnson, R, Newland, P, Thorburn, K. Cardiac Troponin T levels and myocardial involvement in children with severe respiratory syncytial virus lung disease. *Acta Paediatr*. 2004; 93887-90.

ElSaleeby CM, Suzich J, Conley ME, DeVincenzo JP. Quantitative effects of palivizumab and donor-derived T cells on chronic respiratory syncytial virus infection, lung disease, and fusion glycoprotein amino acid sequences in a patient before and after bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(2):17-20.

Elliot AJ, Fleming DM. Influenza and respiratory syncytial virus in the elderly. *Expert Vaccines*. 2008; Mar.7(2):249-58.

Erdman DD, Weinberg GA, Edwards KM, Walker FJ, Anderson BC, Winter J, Gonzalez M, Anderson LJ. GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(9):4298-303.

Escuissato DL, Gasparetto EL, Marchiori E, Rocha GM, Inoue C, Pasquini R, Muller NL. Pulmonary Infections After Bone Marrow Transplantation: High-Resolution CT Findings in 111 Patients. *AJR*. 2005; 185-615.

Everitt DE, Davis CB, Thompson K, DiCicco R, Ilson B, Demuth SG, Herzyk DJ, Jorkasky DK. The pharmacokinetics, antigenicity, and fusion-inhibition activity of RSHZ19, a humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus, in healthy volunteers. *J Infect Dis*. 1996; 174(3):463-9.

Ewald PW. *Evolution of infectious disease*. Oxford: Oxford University Press; 1994.

Falsey AR, Cunningham CK, Barker WH, Kouides RW, Yuen JB, Menegus M, Weiner LB, Bonville CA, Betts RF. Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J Infect Dis*. 1995; Aug. 172(2):389-94.

Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13(3):371-84.

Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(3):817-20.

Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox e Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med*. 2005; 352:1749-59.

Fearn R, Peeples ME, Collins PL. Mapping the transcription and Replication Promoters of Respiratory Syncytial Virus. *Viol J*. 2002; 1663-72.

Feldman SA, Crim RL, Audet SA, Beeler AA. Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex. *Arch Virol*. 2001; 146:2369-83.

Feltes TF, Cabalka AK, Meissner HC, Piazza FM, Carlin DA, Top FH Jr, Connor EM, Sondheimer HM. Cardiac Synagis Study Group-Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodynamically significant congenital heart disease. *J Pediatr*. 2003; Oct. 143(4):532-40.

Figuera-Aloy J, Carbonell-Estrany X, Quero-Jiménez J, Fernández-Colomer B, Guzmán-Cabañas J, Echaniz-Urcelay I, Doménech-Martínez E, IRIS Study Group. FLIP-2 Study: risk factors linked to respiratory syncytial virus infection requiring hospitalization in premature infants born in Spain at a gestational age of 32 to 35 weeks. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; 27(9):788-93.

Flamant C, Hallalel F, Nolent P, Chevalier JY, Renolleau S. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in children: from short mechanical ventilation to extracorporeal membrane oxygenation. *Eur J Pediatr*. 2005;164(2):93-8.

Forter J, Ihorst G, Rieger CH, Stephan V, Frank HD, Gurth H, Berner R, Rohwedder A, Werchau H, Schumacher M, Tsai T, Petersen G. Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infections in children under 3 years of age (the PRI.DE Study). *Eur J Pediatr*. 2004; 164(12):709-16.

Frabasile S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, de Sierra MJ, Ruchansky D, Vitoreira 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*. 2003; 71(2):305-12.

Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol*. 2006; 78(11):1498-504.

Garcia-Barreno B, Palomo C, Penas C, Delgado T, Perez-Brena P, Melero JA. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol*. 1989; 63:925-32.

García-Barreno B, Portela A, Delgado T, López JÁ, Melero JA. Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus. *EMBO*. 1990; 9(12):4181-7.

Garcia J, Garcia-Barreno B, Vivo A. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells. Formations of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein the phosphoprotein and the 22K protein. *Virology*. 1992; 195:243-7.

Garcia J, Garcia-Barreno B, Vivo, Melero JA. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that co-express the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology*. 1993; 195:243-47.

Garcia ML, Calvo C, Pozo F, Pérez-Brena P, Vazquez MC, Casas I. Detection of human bocavirus in ill and healthy Spanish children. A 2-year study. *Arch Dis Child*. 2008; Aug 1.

Garnett GP, Antia R. Population biology of virus-host interactions. In: Morse SS, editor. *The evolutionary biology of viruses*. New York: Raven Press; 1994; 51-73.

Garofalo RP, Patti J, Hintz KA, Hill V, Ogra PL, Welliver RC. Macrophage inflammatory protein-1alpha (note T helper type 2 cytokines) is associated with severe forms of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis*. 2001; 184(4):393-9.

Gern JE, French DA, GRindle KA, Brockman-Schneider RA, Konno S, Busse WW. Double-stranded RNA induces the synthesis of specific chemokines by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; 28(6):731-7.

Gilca R, DeSerres G, Tremblay M, Vachon ML, Leblanc E, Bergeron MG, Dercy P, Boivin G. Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter season. *J Infect Dis*. 2006; 193(1):54-8.

Gimenez HB, Cash P, Melvin WT. Monoclonal Antibodies to Human Respiratory Syncytial Virus and Their Use in Comparison of Different Virus Isolates. *J Gen Virol*. 1984; 65:963-71.

Gower TL, Graham BS. Antiviral activity of lovastatin against respiratory syncytial virus in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45:1231-7.

Gower TL, Pastey MK, Peeples ME, Collins PL, McCurdy LH, Hart TK, Guth A, Johnson TR; Graham BS. Rho A signaling is required for respiratory syncytial virus-induced syncytium formation and filamentous virion morphology. *J Virol*. 2005; 79(9):5326-36.

Grzelishvili VZ, Smallwood S, Tower D, Hall RL, Hunt DM, Moyer SA. A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral mRNA cap methylation. *J Virol*. 2005; 79:7327-37.

Groothuis JR, Gutierrez KM, Lauer BA. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*; 1998;82(2):199-203.

Groothuis JR, Nishida H. Prevention of respiratory virus infections in high-risk infants by monoclonal antibody (palivizumab). *Pediatr Int*. 2002; 44(3):235-41.

Hakhverdyan M, Hägglund S, Larsen LE, Belák. Evaluation of a single-tube fluorogenic RT-PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *J Virol Methods*. 2005; 123(2):195-202.

Hall CB, Geiman JM, Douglas RG Jr, Meagher MP. Control of nosocomial respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics*. 1978; 62(5):728-32.

Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ. Occurrence of Groups A and B of Respiratory Syncytial Virus Over 15 Years: Associated Epidemiologic and Clinical Characteristics in Hospitalized and Ambulatory Children. *J Infect Dis*. 1990; Dec.162(6):1283-90.

Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and Frequency of Reinfection with Respiratory Syncytial Virus. *J Infect Dis*. 1991; 163:693-8.

Hall CB, Long CE, Schnabel KC. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect Dis*. 2001;33(6):792-6.

Hallak LK, Spillmann D, Collins PL, Peeples ME. Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. *J Virol*. 2000; 74:10508-13.

Hammad H, de Vries VC, Maldonado-Lopez R, Moser M, Maliszewski C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Differential capacity of CD8⁺ alpha or CD8⁻ alpha dendritic cell subsets to prime for eosinophilic air-way inflammation in the T-helper type 2-prone milieu of the lung. *Clin Exp Allergy*. 2004; Dec.34(12):1834-40.

Han LL, Alexander JP, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J Infect Dis*. 1999;179(1):25-30.

Harmon SB, Wertz GW. Transcriptional termination modulated by nucleotides outside the characterized gene end sequence of respiratory syncytial virus. *Virology*. 2002; 300:304-15.

Hercyk N, Horikami SM, Moyer SA. The vesicular stomatitis virus L protein possesses the mRNA methyltransferase activities. *Virology*. 1988; 163:222-5.

Heminway BR, Yu Y, Tanaka Y. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell cell fusion. *Virology*. 1994; 200:801-5.

Hendry RM, Burns JC, Walsh EE, Anderson LJ, Fernie BF, McIntosh K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J Infect Dis*. 1986; 153:291-7.

Hendricks DA, McIntosh K, Patterson JL. Further characterizations of soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1988; 62:2228-33.

Hendry RM, Burns JC, Walsh EE, Wright PT, Hemming VG, Rodriguez WJ, Kim HW, Prince GA, McIntosh K. Strain-specific serum antibody responses in infants undergoing primary infection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*. 1988; 157:640-7.

Herrera-Rodríguez, Hoz de La F, Mariño C, Ramízes E. Virus Respiratorios em Menores de Díez Años com Militar Central de Bogotá 2000-2001. *Rev Salud Pública*. 2007; 9(4):576-86.

Hickling TP, Malhotra R, Bright H, McDowell W, Blair ED, Sim RB. Lung surfactant protein A provides a route of entry for respiratory syncytial virus into host cells. *Viral Immunol*. 2000; 13:125-35.

Hoesktra D. Membrane fusion of enveloped viruse especially a matter of proteins. *J Bioenerg Biomembr*. 1990; 22:121-55.

Holland JJ, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. 1982; 215:1577-85.

Huang YT, Wertz GW. The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J Virol*. 1982;43(1):150-7.

Huang YT, Collins, PL, Wertz GW. Characterization of the proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res.* 1985; 2:157-73.

Huntley CC, Weiss WJ, Gazumyan A, Buklan A, Feld B, Hu W, et al. RFI- 641, a potent respiratory syncytial virus inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:841-7.

Hurk S Van Drenen Little-Van Den, Mapletoft JW, Arsic N,. Immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication. *Rev Med Virol.* 2007; 17:5-34.

Iwane MK, Edwards KM, Szilagyi PG, Walker FJ, Griffin MR, Weinberg GA, Coulen C, Poehling KA, Shone LP, Balter S, Hall CB, Erdman DD, Wooten K, Schwartz B. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children. *Pediatrics.* 2004; 113(6):1758-64.

Jeffree CE, Rixon HW, Brown G, Aitken J, Sugrue RJ. Distribution of the attachment (G) glycoprotein and GM1 within the envelope of mature respiratory syncytial virus filaments revealed using field emission scanning electron microscopy. *Virology.* 2003; 306:254-67.

Johnson AW, Osinusi K, Aderole WI, Gbadero DA, Olaleye OD, Adeyemi-Doro FA. Etiologic agents and outcome determinants of community-acquired pneumonia in urban children: a hospital-based study. *J Natl Med Assoc.* 2008; 100(4):370-85.

Johnson S, Griego SD, Pfarr DS, Doyle ML, Woods R, Carlin D, Prince GA, Koenig S, Young JF, Dillon SB. A direct comparison of the activities of two humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibodies: MEDI-493 and RSHZ19. *J Infect Dis.* 1999; 180(1):35-40.

Johnson PR Jr, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, Collins PL. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol.* 1987; 61:3163-6.

Johnson S, Oliver C, Prince GA, Hemming VG, Pfarr DS, Wang SC, Dormitzer M, O'Grady J, Koenig S, Tamura JK, Woods R, Bansal G, Couchenour D, Tsao E, Hall WC, Young F. Development of humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1997; Nov.176(5):1215-24.

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(4):251-62.

Kahn JS, Schnell MJ, Buonocore L, Rose JK. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoprotein: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology*. 1999; 254:81-91.

Kallewaard NL, Bowen AL, Crowe JE. Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus. *Virology*. 2005; 331:73-81.

Kamasaki H, Sutsumi HT, 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*. 2001; 146:457-66.

Kawai M, Ikematsu H, Kawashima T, Maeda T, Hirotsu N, Nishimura M, Kashiwagi S. Detection of respiratory syncytial virus with nested-PCR and a new rapid detection test kit in patients with influenza-like illness, including elderly adults. *Kansenshogaku Zasshi*. 2008; Jan.82:(1)1-5.

Karron RA, Wright PF, Belshe RB. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *J Infect Dis*. 2005; 191:1093-104.

Kim SH, Huh JH, Kim JS, Yoon SY, Lim CS, Sho Y, Kim YK, Lee KN, Lee CK. Epidemiology of respiratory viral infection in 2004-2006. *Korean J Lab Med*. 2006; Oct.26(5):351-7.

Klein MI, Coviello S, Bauer G, Benitez A, Serra ME, Schiatti MP, Delgado MF, Melendi GA, Novalli L, Pena HG, Karron RA, Kleeberger SR, Polack FP. The impact of infection with human metapneumovirus and other respiratory viruses in young infants and children at high risk for severe pulmonary disease. *J Infect Dis*. 2006; Jun.1(193)11:1544-51.

Kosaka IM, Ventura AM, Carromeu C, Durigon EL. Construction of adenoviral vectors expressing F and G glycoproteins of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV). *Braz J Microbiol*. 2004; 35:167-72.

Krillov LR, Mandel FS, Barone SR, Fagin JC. Follow-up of children with respiratory syncytial virus bronchiolitis in 1986 and 1987: potential effect of ribavirin on long term pulmonary function. The Bronchiolitis Study Group. *Pediatr Infect Dis J*. 1997; Mar.16(3): 273-6.

Kumar S, Wang L, Fan J, Kraft A, Bose ME, Tiwari S, Van Dyke M, Haigis R, Luo T, Ghosh M, Tang H, Haghnia M, Mather EL, Weisburg WG, Henrickson KJ. Detection of 11 common viral and bacterial pathogens causing community-acquired pneumonia or sepsis in asymptomatic patients by using a multiplex reverse transcription-PCR assay with manual (enzyme hybridization) or automated (electronic microarray) detection. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(9):3063-72.

Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Ukae S, Mori T, Hotsubo T, Tsutsumi H. Comparison of an immunochromatography test with multiplex reverse transcription-PCR for rapid

diagnosis of respiratory syncytial virus infections. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4812-4.

Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, PA. Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 1475-83.

Larcher C, Jeller V, Fischer H, Huemer HP. Prevalence of respiratory viruses, including newly identified viruses, in hospitalized children in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006; Nov.25(11):681-6.

Law BJ, Carbonell-Estrany X, Simoes EA. An update on respiratory syncytial virus epidemiology: a developed country perspective. 2002;96,B:S1-7.

Lederberg J, Shope RE, Oaks SC. *Emerging infections. Microbial threats to health in the United States*. Washington: National Academy Press; 1992.

Lederberg J. Viruses and humankind: intracellular symbiosis and evolutionary competition. In: Morse SS, editor. *Emerging viruses*. Oxford: Oxford University Press; 1993. p.3-9.

Legg Jp, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(6):633-9.

Leonov SV, Waris M, Norrby E. Linear antigenic and immunogenic regions of human respiratory syncytial virus N protein. *J Gen Virol*. 1995; 76:357-64.

Levin BR, Bull JJ. Short-sighted evolution and the virulence of pathogenic microorganism. *Trends Microbiol*. 1994; 2:76-81.

Levine S, Klaiver FR, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*. 1987; 68:2521-4.

Linette Pei-Chi Sehk; Bee-Wah Lee. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Pediatric Resp Rev*. 2003; 4:105-11.

Liuzzi M, Mason SW, Cartier M, Lawetz C, McCollum RS, Dansereau N, Bolger G, Lapeyre N, Gaudette Y, Lagacé L, Massariol MJ, Dô F, Whitehead P, Lamarre L, Seouten E, Bordeleau J, Landry S, Rancourt J, Fazal G, Simoneau B. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA quanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*. 2005; 79:13105-15.

Long CE, Voter, KZ, Barker WH, Hall CB. Long term follow-up of children hospitalized with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection and randomly treated with ribavirin or placebo. *Pediatr Infect Dis J*. 1997; Nov.16(11):1023-8.

Lopez JA, Penas C, Garcia-Barreno B, Melero JA, Portela A. Location of a highly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1990; 64:927-30.

López JA, Puas C, Garcia-Barreno B, Melero JA, Portela A. Location of a highly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Virol*. 1993; 64:927-30.

López JA, Bustos R, Orvell C, Berois M, Arbiza J, Garcia-Barreno B, Melero JA. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol*. 1998; 72:6922-8.

Luchsinger V, Noy AE, Avendaño LF. Human respiratory syncytial virus genomic and antigenic variants isolated in two hospitals during one epidemic, in Santiago, Chile. *J Clin Virol*. 2008; 42(3):260-3.

Machado CM, Boas LS, Mendes AV, Santos MF, Da Rocha IF, Sturaro D, Dulley FL, Pannuti CS. Low mortality rates related to respiratory virus infections after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2003; Apr.31(8):695-700.

Malhotra R, Ward M, Bright H, Priest R, Foster MR, Hurle M, Blair E, Bird M. Isolation and Characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor on epithelial cells. *Microbes Infect*. 2003; Feb.5(2):123-33.

Martinello RA, Chen MD, Wibel C, Kahn JS. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis*. 2002; 186(6):839-42.

Martinez I, Dopazo J, Melero JA. Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants. *J Gen Virol*. 1997; 78:2419-29.

Martinez I, Valdes O, Delfraro A, Arbiza J, Russi J, Melero JA. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. *J Gen Virol*. 1999; 80:125-30.

Mason SW, Aberg E, Lawetz C, DeLong R, Whitehead P, Luizzi M. Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P protein is required for reconstitution of M2-1- dependent RSV minigenoma activity. *J Virol*. 2003; 77:10670-6.

Mazzuli T, Peret TC, McGeer A, Cann D, MacDonald KS, Chua R, Erdman DD, Anderson LJ. Molecular characterization of a nosocomial outbreak of human respiratory syncytial virus on an adult leukemia/lymphoma ward. *J Infect Dis*. 1999;180(5):1686-9.

McCarthy AJ, Kingman HM, Kelly C, Taylor GS, Caul EO, Grier D, Moppett J, Foot AB, Cornish JM, Oakhill A, Steward CG, Pamphilon DH, Marks DI. The outcome of

26 patients with respiratory syncytial virus infection following allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24(12):1315-22.

McDonald TP, Pitt AR, Brown G, Rixon HW, Sugrue RJ. Evidence that the respiratory syncytial virus polymerase complex associates with lipid rafts in virus-infected cells: a proteomic analysis. *Virology*. 2004; 330:147-57.

McKnight A, Weiss RA, Shotton C, Takenchi Y, Hoshino H, Chapham PR. Change in tropism upon immune escape by human immunodeficiency virus. *J Virol*. 1995; 69:3167-70.

McMichael AJ, Phillips RE. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15:271-96.

Mejias A, Chavez-Bueno S, Rios AM, Aten MAF, Raynor B, Peromingo E, et al. Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: time versus potency. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:4700-7.

Melero JA, Martinez I. A model for the generation of multiple A to G transitions in the human respiratory syncytial virus genome: predicted RNA secondary structures as substrates for adenosine deaminases that act on RNA. *J Gen Virology*. 2002; 83:1445-1455.

Miyao CR, Gilio AE, Vieira S, Hein N, Pahl MM, Betta SL, Durigon EL, Stewien KE, Queiroz DA, Botosso VF, Gomes MC, Lopes CL, Ejzenberg B, Okay Y. Viral Infections in hospitalized children affected by acute lower respiratory tract disease. *J Pediatr*. 1999;75(5):334-44.

Moore ML, Peebles RS Jr. Respiratory syncytial virus disease mechanisms implicated by human, animal, and in vitro data facilitate vaccine strategies and new therapeutics. *Pharmacol Ther*. 2006, 112(2):405-24.

Morris JA, Bolunt RE, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956; 9:544-50.

Morse SS. *Emerging Viruses*. Oxford: Oxford University Press; 1993.

Morton CJ, Cameron R, Ce LJ, Lin B, Lowe M, Luttick A, Mason A, McKimm B, Parker MW, Ryan J, Smout M, Sullivan J, Tucker S, Young P. Structural characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay. *Virology*. 2003; 31:275-88.

Moudy MA, Sullender WM, Wertz GW. Variations in intergenic region sequences of human respiratory syncytial virus clinical isolates: analysis of effects on transcriptional regulation. *Virology*. 2004; 327:121-33.

Moura FEA, Borges LC, Portes SAR, Ramos EAG, Siqueira MM. Respiratory syncytial vírus Infections during na Epidemic Period in Salvador, Brazil. Viral Antigenic Group Analysis and Description of Clinical an Epidemiological Aspects. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(6):739-43.

Moura FE, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, de Sierra MJ, Tome L, Ramos EA, Siqueira MM, Arbija J. Genetic diversity of respiratory syncytial vírus isolated during na epidemic period from children of northeastern Brazil. J Med Virol. 2004; Sep.74(1):156-60.

Moura EAF, Nunes IFS, Silva Jr GB, Siqueira MM. Short Report: Respiratory Syncytial Virus Infections In Northeastern Brazil: Seasonal Trends and General Aspects. Am J Trop Med Hyg. 2006; 74(1):165-67.

Moynihan JA, Kim TY, Young T, Checchia PA. Rate of palivizumab administration in accordance with current recommendations among hospitalized. J Pediatr Health Care. 2004;18(5):224-7.

Mufson MA, Orvell C, Rafinar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. J Gen Virol. 1985; 66:2111-24.

Mufson MA, Belhe RB, Orvell C, Norrby E. Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children. J Infect Dis. 1988; 157:143-8.

Murphy FA, Nathanson N. The emergence of new virus diseases: an overview. Semin Virol. 1994; 5:87-102.

Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. Clin Immunol. 2000; 97(1):43-9.

Nagai K, Kamasaki H, Kuroiwa Y, Okita L, Tsutsumi H. Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. J Med Virol. 2004;74(1):161-5.

Nascimento JP, Siqueira MM, Sutmoller F, Krawczuk MM, de Farias V, Ferreira V, Rodrigues MJ. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991; 33(4):287-96.

Ogino T, Kobayashi M, Iwama M, Mizumoto K. Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA. J Biol Chem. 2005; 280:4429-35.

Olmsted RA, Collins PL, Elango N, Prince GA, Murphy BR, Johnson PR, Moss B, Chanock RM, Collins PL. Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83:7462-6.

Olmsted RA, Collins PL. The 1 A protein of respiratory syncytial virus is a integral membrane protein present as multiple, structurally distinct species. *J Virol.* 1989; 63:2019-29.

Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5(A:S):119-26.

Ostler T, Hussell T, Surh CD, Openshaw P, EHL S. Long-term persistence and reactivation of T cell memory in the lung of mice infected with respiratory syncytial virus. *Eur J Immunol.* 2001; 31(9):2574-82.

Pastey MK, Crowe JE, Graham BS. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol.* 1999; 73:7262-70.

Pastey MK, Gower TL, Spearman PW, Crowe Jr, Graham BS. A RhoA-A-derived peptide inhibits syncytium formation induced by respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3. *Nat Med.* 2000; 6:35-40.

Peret TCT, Hall CB, Sshnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in community. *J Gen Virol.* 1998; 79:2221-9.

Peret TC, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. 2000;181(6):1891-6.

Perez M, Garcia-Barreno B, Melero JA, Carrasco L, Guinea R. Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology.* 1997; 235:342-51.

Piedimont G, Renzetti G, Auais A, Di Marco A, Tripodi S, Colistro F, Villani A, Di Ciommo V, Cutrera R. Leukotriene synthesis during respiratory syncytial virus bronchiolitis: influence of age and atopy. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40(4):285-91.

Pitkäranta A, Virolainen A, Jero J, Arruda E, Hayden FG. Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Pediatrics.* 1998;102(2):291-5.

Pohl C, Green M, Wald ER, Ledesma-Medina J. Respiratory syncytial virus infections in pediatric liver transplant recipients. *J Infect Dis.* 165(1):166-9.

Polack FP, Karron RA. The future of respiratory syncytial virus vaccine development. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(1):S65-73.

Polack FP, Irusta PM, Hoffman SJ, Schiatti MP, Melendi GA, Delgado MF, et al. The cysteine-rich region of respiratory syncytial virus attachment protein inhibits innate immunity elicited by the virus and endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:8996-9001.

Polak AG, Mroczka J. Nonlinear model for mechanical ventilation of human lungs. *Comput Biol Med.* 2006;36(1):41-58.E]

Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol Res.* 2004; 199:227-50.

Puhothu B, Forster J, Heinze J, Heinzmann A, Krueger M. Surfactant protein B polymorphisms are associated with severe respiratory syncytial virus infection, but not with asthma. *BMC Pulm Med.* 2007;11:7-6.

Queiroz DA, Durigon EL, Botosso, VF, Ejzemberg B, Vieira SE, Mineo JR, Yamashita C, Hein N, Lopes CL, Cacharo AL, Steview KE. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(10):1183-93.

Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, Platts-Mills TAE, Heymann. Rhinovirus and Respiratory Syncytial Virus in Wheezing Children Requiring Emergency Care. *Am J Res Crit Care Med.* 1999; 159(3):785-90.

Reyes-Gonzalez L, Argüello-Ruiz B, Barreno-Garcia B, Calder L, López AR, Albar JP, Skehel JJ, Wiley DC, Melero JA. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *J Gen Virol.* 2001; 98:59-64.

Ribeiro LZG, Tripp RA, Rossi LMG, Palma PVB, Yokosawa J, Mantese CO, Oliveira TFM, Nepomuceno LL, Queiroz DAO. Serum Mannose-Binding Lectin Levels are Linked with Respiratory Syncytial Virus (RSV) Disease. *J Clin Immunol.* 2008; 28:166-73.

Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA, Wertz GW. The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol.* 1994; 68:4538-46.

Roberts SR, Compans RW, Wertz GW. Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol.* 1995; 69:2667-73.

Robertson SE, Roca A, Alonso P, Simoes EA, Kartasasmita CB, Olaleye DO, Odaibo GN, Collinson M, Venter M, Zhu Y, Wright PF. Respiratory syncytial virus infection: denominator-based studies Indonesia, Mozambique, Nigeria and South Africa. *Bull World Health Organ.* 2004; Dec.82(12):914-22.

Sáez-Llorens X, Castaño E, Null D, Steichen J, Sánchez PJ, Ramilo O, Top FH Jr, Connor E. Safety and pharmacokinetics of an intramuscular humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. The MEDI-493 Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17(9):787-91.

Saleeby CMEI, Suzich J, Conley ME, DeVicenzo JP. Effects of Palivizumab and Donor-Derived T Cells in a Bone Marrow Transplant Recipient. *Clin Infect Dis*. 2004; 39.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004; 745-63.

Sano H, Nagai K, Tsutsumi H, Kuroki Y. Lactoferrin and surfactant protein A exhibit binding to F protein and differently modulate respiratory syncytial virus infection. *Eur J Immunol*. 2003; 33:2894-902.

Sanz MC, Kew OM, Anderson LJ. Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein G among group A respiratory syncytial viruses. *Virus Res*. 1994;33(3):203-17.

Savón C, Goyenechea A, Valdivia A, Chacón D, Cancio R, Angel-Pérez L, González G, Gavilondo J. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by 24-well plate precentrifugation assay using monoclonal antibody against F protein. *Arch Med Res*. 2000; 31(1):93-6.

Schlender J, Zimmer G, Herrler G, Conzelmann K. Respiratory Syncytial virus (RSV) Fusion Protein Subunit F₂, Not Attachment Protein G, Determines the Specificity of RSV Infection. *J Virol*. 2003; 4609-16.

Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF, Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol*. 2004; 74(2):344-54.

Silvestri M, Sabatini F, Defilippi AC, Rossi GA. The Wheezy infant-immunological and molecular considerations. *Paediatr Respirat Rev*. 2004;(A)81-7.

Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes EA. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *Pediatr Infect Dis*. 2003;22(2):21-32.

Serafino RL, Gurgel RQ, Dove W, Hart CA, Cuevas LE. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus in children over two seasons with a high incidence of respiratory infections in Brazil. *An Trop Paediatr*. 2004; 24:213-7.

Siqueira MM, Nascimento JP, Anderson LA. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brasil. *J Clin Microbiol*. 1991; 29:557-9.

Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*. 1999; Oct. 20, 282(15):1440-6.

Silva LHA, Spilki FR, Riccetto AGL, Almeida RS, Baracat ECEB, Arns CW. Genetic Variability in the G Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus Isolated From the Campinas Metropolitan Region, Brazil. *J Med Virol*. 2008; 80:1653-60.

Smith BJ, Lawrence MC, Colman PM. Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus. *Protein Eng.* 2002; 15:365-71.

Simoës EA, Groothuis JR, Carbonell-Estrany X, Rieger CH, Mitchel I, Fredrick LM, Kimpen JP, Palivizumab Long-Term Respiratory Outcomes Study Group. Palivizumab prophylaxis, respiratory syncytial virus, and subsequent recurrent wheezing. *J Pediatr.* 2007;151(1):34-42.

Souza LS, Ramos EA, Carvalho FM, Guedes VM, Rocha CM, Soares AB, Velloso LF, Macedo IS, Moura FE, Siqueira M, Fortes S, de Jesus CC, Santiago CM, Carvalho AM, Arruda E. Viral respiratory infections in Young children attending Day care in urban Northeast Brazil. *Pediatr Pulmonol.* 2003.35(3):184-91.

Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL, Collins PL. Suppression of the induction of alpha, beta and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *J Virol.* 2004; 78:4363-9.

Spann KM, Tran KC, Collins PL. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and proinflammatory cytokines. *J Virol.* 2005; 79:5353-62.

Stec DS, Hill MG, Collins PL. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology.* 1991; 183:273-87.

Stein RT, Duane S, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussing LM, Wright AL, Martinez FD. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet.* 1999; 354:541-45.

Sutmoller F, Maia PR. Acute respiratory syncytial infections in children living in two low income communities of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995;90(6):665-74.

Straliootto SM, Siqueira MM, Machado V, Maia TMR. Respiratory Viruses in the Pediatric Intensive Care Unit: Prevalence and Clinical Aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 99(8):883-7.

Straliootto SM, Nestor SM, Siqueira MM. Respiratory syncytial vírus Groups A and B in Porto Alegre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(2):155-8.

Straliootto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Jul-Aug; 35(4):283-91.

Sugrue RJ, Brown C, Brown G, Aitken J, McL Rixon HW. Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not a requirement for its transport to the surface of virus- infected cells. *J Gen Virol.* 2001; 82:1275-1386.

Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of attachment protein of subgroup B respiratory viruses. *J Virol.* 1991; 65:5425-34.

Sullender WM. Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(1):1-15.

Sung L, Alonzo TA, Gerbing RB, Aplenc R, Lange BJ, Woods WG, Feusner J, Franklin J, Patterson MJ, Gamis AS. Respiratory syncytial virus infections in children with acute myeloid leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2008; Aug.4.

Struck A, Forster J, Ihorst G, Werchau H, König W, König B. Respiratory syncytial virus: G gene genotype and disease severity. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Nov; 23(11):1000-2.

Täger FM, Zolezzi RP, Folatre BI, Navarrete CM, Rojas PJ. Respiratory virus infections in children with acute lymphoblastic leukemia and febrile neutropenia: a prospective study. *Rev Chilena Infectol.* 2006 Jun; 23(2):118-23.

Taylor G, Stott EBJ, Bew M. Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology.* 1984; 52:137-42.

Techaarpornkul S, Barreto N, Peebles ME. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and or attachment glycoprotein gene. *J Virol.* 2001; 68:25-34.

Techaarpornkul S, Collins PL, Peebles ME. Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus. *Virology.* 2002; 294:296-304.

Tekkanat KK, Maassab H, Miller A, Berlin AA, Kunkel SL, Lukacs NW. RANTES (CCL5) production during primary respiratory syncytial virus infection exacerbates airway disease. *Eur J Immunol.* 2002; 32(11):3276-84.

Tempest PR, Bremner P, Lambert M, Taylor G, Furze JM, Carr FJ, Harris WJ. Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo. *Biotechnology (NY).* 1991; 9:266-71.

Teng MN, Collins PL. Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol.* 1998; 57:7-16.

Teng MN, Whitehead SS, Bermingham A, St Claire M, Elkins WR, Murphy BR, Collins PL. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. *J Virol.* 2000; 74:9317-21.

Teng MN, Whitehead SS, Collins PL. Contribution of the respiratory syncytial virus G glycoprotein and its secreted and membrane-bound forms to virus replication in vitro and in vivo. *Virology*. 2001; 289:283-96.

Teng MN, Collins PL. The central conserved cystine noose of the attachment G protein of human respiratory syncytial virus is not required for efficient viral infection in vitro or in vivo. *J Virol*. 2002; 76:6164-71.

The Impact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial infection in high risk infants. *Pediatrics*. 1998; 102:531-7.

The Prevent Study Group. Reduction of respiratory syncytial virus hospitalization among premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia using respiratory syncytial virus immune globulin prophylaxis. *Pediatrics*. 1997; 99:93-9.

Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Souza TS, Oliveira DB, Golono MA, Gilio AE, Stewien KE, Erdman DD, Durigon EL. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr*. 2007; Sep-Oct.83(5), 83:422-8.

Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*. 2003; Jan.8, 289(2):179-86.

Torres HA, Aguilera EA, Mattiuzzi GN, Cabanillas ME, Rohatgi N, Sepulveda CA, Kantarjian HM, Jiang Y, Safdar A, Raad II, Chemaly RF. Characteristics and outcome of respiratory syncytial virus infection in patients with leukemia. *Hematologica*. 2007; 92(9):1216-23.

Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, Melero JA. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J Virol*. 2006; 80(2):975-84.

Tripp RA, Jones LP, Haynes LM, Zheng H, Murphy PM, Anderson LJ. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol*. 2001; 2:732-8.

Tripp RA, Moore D, Barskey A 4th, Jones L, Moscatiello C, Keyserlig H, Anderson LJ. Peripheral blood mononuclear cells from infants hospitalized because of respiratory syncytial virus infection express T helper-1 and T helper-2 cytokines and CC chemokine messenger RNA. *J Infect Dis*. 2002;185(10)1388-94.

Tristram DA, Wwilliver RC. Respiratory syncytial virus. In Lennette DH. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*, 7th ed. Washington: American Public Health; 1996. p. 539-52.

Trudel CM, Nadon C, Seguin C, Dionne, Lacroix M. Identification of a synthetic peptide as part of a major neutralization epitope of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1987; Sep. 68:2273-80.

Tsutsumi H, Onuma M, Suga K, Honjo Y, Chiba S, Ogra PL. Occurrence of respiratory virus subgroup A and B strains in Japan, 1980-1987. *J Clin Microbiol.* 1998; 26:1171-4.

Valle L, Amicizia D, Bacilieri S, Banfi F, Riente R, Durando P, Sticchi L, Gasparini R, Esposito C, Icardi G, Ansaldi F. Performance testing of two new one-step real time PCR assays for detection of human influenza and avian influenza viruses isolated in humans and respiratory syncytial virus. *J Prev Hyg.* 2006; 47(4):127-33.

Van Elden LJ, van Kraaij MG, Nijhuis M, Hendriksen KA, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, van Loon AM. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2002; 34(2):177-83.

Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: Identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol.* 2001; 82:2117-24.

Ventre K, Randolph A. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database System Rev.* 2004 Oct;18(4):CD000181.

Vieira CE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Torok TJ, Anderson LJ, Miyao CR, Hein, Botosso VF, Pahl MM, Gilio AE, Ejzenberg B, Okay Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2001; 43:25-31.

Vieira SE, Gilio AE, Durigon EL, Ejzenberg B. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus in infants: the role played by specific antibodies. *Clinics.* 2007;62(6): 709-16.

Viegas M, Mistchenko AS. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup a over a six-year period (1999-2004) in Argentina.

Visser A, Delport S, Venter M. Molecular epidemiological analysis of nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus associated pneumonia in a Kangaroo mother care unit in South Africa. *J Med Virol.* 2008; 80(4):724-32.

Waal L, Wyatt LS, Yüksel, Amerongen G Van, Moss B, Niesters HG, Osterhaus ADME, Swart RL. Vaccination of infant macaques with a recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the respiratory syncytial virus F and G genes does not predispose for immunopathology. *Vaccine.* 2004; 22:923-6.

Walsh E, Hruska J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Virol*. 1983; 47:171-7.

Walsh EE, Brandriss MW, Schlesinger JJ. Purification and characterization of the respiratory syncytial fusion protein. *J Gen Virol*. 1985; 66:409-15.

Walsh EE, Hall CB, Briselli M, Brandriss MW, Schlesinger JJ. Immunization with glycoprotein subunits of respiratory syncytial virus to protect cotton rats against viral infection. *J Infect Dis*. 1987; 155:1198-204.

Walsh EE, Falsey AR, Sullender WM. Monoclonal antibody neutralization escape mutants of respiratory syncytial virus with unique alterations in the attachment (G) protein. *J Gen Virol*. 1998;79(3):479-87.

Walsh EE, Falsey RA. Age related differences in humoral immune response to Respiratory Syntytial virus infection in Adults. *J Med Virol*. 2004; 73:295-9.

Walsh EE, Peterson DR, Falsey AR. Risk factors for severe respiratory syncytial virus in elderly person. *J Infect Dis*. 2004;189(2):233-8.

Wang SZ, Rosenberger CL, Bao YX, Stark JM, Harrod K. Clara Cell Secretory Protein Modulates Lung Inflammatory and Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Immunol J*. 2003; 1051-60.

Wahten MW, Brideau RJ, Thomsen DR. Immunization of cotton rats with the human respiratory syncytial virus F glycoprotein produced using a baculovirus vector. *J Infect Dis*. 1989; 159(2):255-64.

Ward KA, Labden PR, Ogilvie MM, Watt PJ. Antibodies to respiratory syntycial virus polypeptides and their significance in human infection. *J Gen Virology*. 1983; 64:1867-76.

Weaver SC. Recurrent emergence of Venezuelan equine encephalomyelitis. In: Sheld WM, Hughes J, editors. *Emerging infections I*. Washington; American Society for Microbiology Press; 1998. p. 27-42.

Ward TM, Traina-Dorge V, Davis KA, Gray WL. Recombinat simian varicella viruses expressing respiratory syncytial virus antigens are immunogenic. *J Gen Virol*. 2008; 89(3):741-50.

Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health*. 1998; Apr.3(4):268-80.

Weinberg A, Zamora MR, Li S, Torres F, Hodges TN. The value of polymerase chain reaction for the diagnosis of viral respiratory tract infections in lung transplant recipients. *J Clin Virol*. 2002;25(2):171-5.

Weiss WJ, Murphy T, Lynch ME, Frye J, Buklan A, Gray B, Lenoy E, Mitelman S, 'O Connell J, Quartuccio S, Huntley C. Inhalation efficacy of RFI- 641 in an African green monkeys model of RSV infection. *J Med Primatol.* 2003; Apr.32(2):82-8.

Welliver RC. Review of epidemiology and clinical risk factors for severe respiratory syncytial virus (RSV) infection. *J Pediatr.* 2003;143(5):112-7.

Weltzin R, Traina-Dorge V, Soike K, Zhang JY, Mack P, Soman G, Drabik G, Monath TP. Intranasal monoclonal IgA antibody to respiratory syncytial virus protects rhesus monkeys against upper and lower respiratory tract infection. *J Infect Dis.* 1996 Aug;174(2):256-61.

Wertz GW, Kreiger M, Ball LA. Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O-glycosylation. *J Virol.* 1989; 63:4767-76.

Wertz GW, Moudy R. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus. *J Pediatr Infect Dis.* 2004; Jan.23(1S):19-24.

Winther B, Hayden FG, Arruda E, Dutkowski R, Ward P, Hendley JO. Viral Respiratory Infection in Schoolchildren: Effects on Middle Ear Pressure. *Pediatrics.* 2002; pp.826-32.

Wyde PR. Respiratory syncytial virus (RSV) disease and prospects for its control. *Antiviral Rev.* 1998; 39(2):63-79.

Wu H, Pfarr DS, Tang Y, An LL, Patel NK, Watkins JD, Hudde WD, Kiener PA, Young JF. Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization. *J Mol Biol.* 2005; 350:126-44.

Wu H, Pfarr DS, Losonsky GA, Kiener PA. Immunoprophylaxis of RSV Infection: Advancing from RSV-IGIV to Palivizumab and Motavizumab. *Human A Therap for Viral Dis.* 2007; 103.

Wu H, Pfarr DS, Losonsky GA, Kiener PA. Immunoprophylaxis of RSV Infection: Advancing from RSV-IGIV to Palivizumab and Motavizumab Human Antibody. *Ther Viral Dis.* 2008; 317:103:23.

Yeolekar LR, Damle RG, Kamat AN, Khude MR, Simha V, Pandit AN. Respiratory syncytial virus in acute respiratory tract infections in Western India. *Indian J Pediatr.* 2008; 75(4):341-5.

Zhang W, Yang H, Kong X, Mohapatra S, Juan-Vergara H, Hellermann G, Behera S, Singan R, Lockey RF, Mohapatra SS. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med.* 2005; Jan.11(1):56-62.

Zhao X, Singh M, Malashkevich VN, Kim PS. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; (97)26:14172-7.

Zhao X, Chen FP, Megaw AG, Sullender WM. Variable resistance to palivizumab in cotton rats by respiratory syncytial virus mutants. *J Infect Dis*. 2004; Dez1.190(11):1941-6.

Zhao X, Sullender WM. In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab. *J Virol*. 2005; Apr.79(7):3962-8.

Zhao X, Lui E, Chen FP, Sullender WM. In Vivo Fitness of Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody Escape Mutants. *J Virol*. 2006, Dec.11651-7.

Zheng H, Peret TCT, Randolph VB, Crowley JC, Anderson LJ. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strain of respiratory syncytial virus. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(2):334-7.

Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment G glycoprotein. *J Virol*, 2004; 78:4675-83.

Zlateva KT, Lemey P, Moës E, Vandamme AM, Van Ranst M. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J Virol*. 2005;79(14):9157-67.

<i>Data de coleta</i>	<i>Inscrição no ICB</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-PCR- F</i>	<i>Sequen. Gen F</i>
21/04/2004	6	PA	5m	-			
21/04/2004	7	PA	3a	-			
23/01/2004	8	PA	3a	+			
23/01/2004	9	PA	4m	-			
23/01/2004	10	Enfermaria	4a	-			
23/01/2004	11	Enfermaria	1a	-			
23/01/2004	12	UTI	1m16d	-			
27/01/2004	13	Enfermaria	1a10m10d	-			
27/01/2004	14	PA	8m	-			
27/01/2004	15	Enfermaria	3a	-			
28/01/2004	16	Enfermaria	1a2m11d	-			
30/01/2004	17	Enfermaria	7m26d	-			
30/01/2004	18	UTI		-			
02/02/2004	19	Enfermaria	2a9m	-			
02/02/2004	20	Enfermaria	1a3m3d	-			
03/02/2004	21	PA	3a1m2d	-			
03/02/2004	22	PA	10m11d	-			
04/02/2004	23	PA	2m	-			
05/02/2004	24	UTI	1m2d	+			
05/02/2004	25	PA	1m2d	-			
05/02/2004	26	PA	11m	-			
05/02/2004	27	PA	4a10m5d	+			
05/02/2004	28	PA	1m	-			
09/02/2004	29	Enfermaria	1m7d	-			
09/02/2004	30	Enfermaria	8m5d	-			
09/02/2004	31	PA		-			
10/02/2004	32	PA	1a10m	-			
12/02/2004	33	UTI	1m6d	-			
16/02/2004	34	Enfermaria	4a7m28d	-			
16/02/2004	35	PA	1m7d	+			
17/02/2004	36	PA	4a8m	-			
18/02/2004	37	Enfermaria	5m26d	-			
19/02/2004	38	UTI	5m28d	-			
19/02/2004	39	Enfermaria	3m27d	+			
26/02/2004	40	UTI	11m9d	+		+ /cc ⁺	-
p26/02/2004	41	PA	4m20d	-			
26/02/2004	42	Enfermaria	2a6m9d	-			
26/02/2004	43	Enfermaria	2m9d	-			
26/02/2004	44	PA	10m12d	+		+	-
26/02/2004	45	PA	4a8m27d	-			
27/02/2004	46	PA	8m	-			
27/02/2004	47	Enfermaria	2m19d	-			
27/02/2004	48	PA	2m4d	-			
01/03/2004	49	PA	2m18d	-			
01/03/2004	50	PA	2a11m	-			
01/03/2004	51	PA	3a11m	-			
02/03/2004	52	UTI	1m4d	-			

<i>Data de coleta</i>	<i>Inscrição no ICB</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-PCR- F</i>	<i>Sequen. Gen F</i>
02/03/2004	53	PA	2m3d	-			
02/03/2004	54	PA	11m20d	-			
04/03/2004	55	Enfermaria	1a3m29d	-			
04/03/2004	56	PA	4m11d	-			
05/03/2004	57	PA	1a11m	-			
05/03/2004	58	UTI	2m6d	+	GA5	+	+
08/03/2004	59	Enfermaria	2m18d	-			
09/03/2004	60	Enfermaria	1a1m4d	-			
09/03/2004	61	Enfermaria	8m10d	-			
11/03/2004	62	Enfermaria	3m	+			
11/03/2004	63	Enfermaria	4m13d	+			
11/03/2004	64	PA	5m11d	+		+	-
12/03/2004	65	Enfermaria		-			
12/03/2004	66	Enfermaria	7m23d	-			
12/03/2004	67	Enfermaria	1a5m	+			
12/03/2004	68	Enfermaria	11m20d	+	GA2	+	+
12/03/2004	69	Enfermaria		-			
12/03/2004	70	Enfermaria	6m28d				
12/03/2004	71	PA	4a1m	-			
15/03/2004	72	PA	9m8d	-			
15/03/2004	73	PA	8m5d	+	SAB3	-	
15/03/2004	74	Enfermaria	1m28d	-			
15/03/2004	75	Enfermaria	6m2d	-			
15/03/2004	76	Enfermaria	4a4m6d	-			
15/03/2004	77	Enfermaria	7m30d	+	GA5	+	+
17/03/2004	78	Enfermaria	1m	+		+	-
17/03/2004	79	Enfermaria	4 ^a 7m	-			
17/03/2004	80	Enfermaria	1a4m12d	-			
17/03/2004	81	Enfermaria	1a6m13d	+		-/cc ⁻	
18/03/2004	82	Enfermaria	2m1d	+	SAB1	+	-
18/03/2004	83	PA	6m29d	+		+	-
18/03/2004	84	PA	2m11d	+		+	+
19/03/2004	85	Enfermaria	1m3d	+		-	
19/03/2004	86	Enfermaria	21d	+		+	+
19/03/2004	87	PA	8m	+		+	+
19/03/2004	88	UTI	1a8m	-		-	
19/03/2004	89	PA	6m10d	-			
19/03/2004	90	PA	1a4m	-			
19/03/2004	91	PA	3a11m	-			
22/03/2004	92	UTI	4m18d	+		+	+
22/03/2004	93	PA	5m13d	+	GB3 inserção	+	+
22/03/2004	94	UTI	11m5d	-			
23/03/2004	95	PA	2a3m	-			
23/03/2004	96	UTI	3m6d	-			
23/03/2004	97	UTI	20d	-			
25/03/2004	98	UTI	22d	-			
25/03/2004	99	Enfermaria	1a8m	+		-/cc ⁻	

<i>Data de coleta</i>	<i>Inscrição no ICB</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-PCR- F</i>	<i>Sequen. Gen F</i>
25/03/2004	100	PA	6m	+		+	+
25/03/2004	101	Enfermaria	1a10m27d	-			
25/03/2004	102	Enfermaria	1m14d	+			
25/03/2004	103	PA	3a2m	-		+cc ⁻	
25/03/2004	104	PA	9m27d	+		+cc ⁺	
25/03/2004	105	PA	7m18d	-			
26/03/2004	106	Enfermaria	7m	-		-cc ⁻	
26/03/2004	107	Enfermaria	8m9d	-			
29/03/2004	108	UTI	13d	+		-	
30/03/2004	109	Enfermaria	1m27d	-			
30/03/2004	110	PA	8m1d	-			
31/03/2004	111	UTI	1m22d	+	GA2	+	-
01/04/2004	112	Enfermaria	2a4m	-			
01/04/2004	113	Enfermaria	2m1d	+		-	
01/04/2004	114	UTI		-			
01/04/2004	115	Enfermaria	2m	+	GA2	+cc ⁻	+
01/04/2004	116	UTI	1m4d	-			
01/04/2004	117	Enfermaria	1a8m	+		-	
01/04/2004	118	Enfermaria	4m21d	+		-	
01/04/2004	119	Enfermaria	1m29d	+		+cc ⁻	
01/04/2004	120	Enfermaria	1a1m27d	+		+cc ⁻	
02/04/2004	121	Enfermaria	7m	-			
02/04/2004	122	Berçário	16d	-			
06/04/2004	123	PA	4m	+	GA5	+cc ⁻	
06/04/2004	124	PA	3m	-			
06/04/2004	125	Enfermaria	10m3d	+		+ /cc ⁺	
06/04/2004	126	Enfermaria	10m28d	+	GA2	+	+
06/04/2004	127	PA	3m	+	GA2	+cc ⁺	+
06/04/2004	128	PA	3m	+	GA2	+	
06/04/2004	129	PA	5m	+	SAB3	+cc ⁻	
06/04/2004	130	Enfermaria	5m11d	+		+cc ⁻	
06/04/2004	131	Enfermaria	4m27d	+			
06/04/2004	132	Enfermaria	8m25d	-			
06/04/2004	133	UTI	1m21d	+		+cc ⁺	
06/04/2004	134	PA	2a4m	+		-cc ⁻	
07/04/2004	135	UTI	1a3m	-		+cc ⁺	-
07/04/2004	136	PA	5m	+		+	+
07/04/2004	137	Enfermaria	2a6m13d	-			
07/04/2004	138	Enfermaria	1a1m21d	+	GA5	+	-
07/04/2004	139	PA	1a1m1d	+		+	
08/04/2004	140	UTI	10m	+			
08/04/2004	141	PA	4a10m	-			
08/04/2004	142	UTI	1m12d	+	GA5	+	-
08/04/2004	143	Enfermaria	9m	+		+cc ⁺	-
08/04/2004	144	PA	10m	+	GA5	+cc ⁺	-
08/04/2004	145	UTI	1m	+			
12/04/2004	146	UTI	2d	+	GA5	+	-

<i>Data de coleta</i>	<i>Inscrição no ICB</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-PCR- F</i>	<i>Sequen. Gen F</i>
12/04/2004	147	Enfermaria	6m9d	-		-	-
12/04/2004	148	Enfermaria	6m23d	+		+	+
12/04/2004	149	PA	10m23d	-			
12/04/2004	150	PA	7m3d	-			
12/04/2004	151	Enfermaria	2a8m8d	-			
12/04/2004	152	Enfermaria	2a11m17d				
12/04/2004	153	PA	5m	-			
12/04/2004	154	Enfermaria	8m12d	+	GA5	-/cc ⁻	
13/04/2004	155	PA	4m	+	GA5	+	-
13/04/2004	156	PA	9m	+		+ /cc ⁻	-
13/04/2004	157	PA	5m	+	BA like	+ /cc ⁺	+
13/04/2004	158	PA	2m	+		+ /cc ⁺	-
13/04/2004	159	PA	3m	+	GA5	+	-
14/04/2004	160	Enfermaria	1m18d	+		+ /cc ⁻	-
14/04/2004	161	PA	5m19d	+		+ /cc ⁺	-
14/04/2004	162	PA	1a1m	+		-	
14/04/2004	163	UTI	7m3d	-			
14/04/2004	164	PA	1a	+		-	
14/04/2004	165	PA	8m	-			
15/04/2004	166	PA	3m	+	GA2	+	
15/04/2004	167	PA	9m	+	GA2	+ /cc ⁺	-
15/04/2004	168	PA	22d	+		+ /cc ⁺	-
15/04/2004	169	PA	7m29d	+	GA2	+	+
19/04/2004	170	Berçário	18d	+		-	
20/04/2004	171	PA	2m15d	+	SAB1	+	-
20/04/2004	172	Enfermaria	9m	-			
20/04/2004	173	UTI	5m	+		+ /cc ⁻	-
20/04/2004	174	UTI	1a7m	-			
20/04/2004	175	Enfermaria	3m	+		+ /cc ⁺	-
20/04/2004	176	UTI	3m15d	+		+	-
22/04/2004	177	UTI	18d	+	GA2	+	+
22/04/2004	178	UTI	1m24d	+	GA5	+	+
22/04/2004	179	UTI	22d	-			
23/04/2004	180	Enfermaria	5m7d	+		-	
23/04/2004	181	Enfermaria	1a3d	+			
24/04/2004	182	UTI	1a3m	+			
26/04/2004	183	UTI	1m1d	+			
26/04/2004	184	PA	1a3m	+			
26/04/2004	185	PA	7m	+			
26/04/2004	186	PA	5m	+			
26/04/2004	187	Enfermaria	1m	+			
26/04/2004	188	PA	8m8d	+			
27/04/2004	189	UTI	4m6d	+	GA5	+	+
27/04/2004	190	PA	8m7d	+			
27/04/2004	191	UTI	2m29d	+			
28/04/2004	192	UTI	5a3m	+			
28/04/2004	193	PA	7m21d	+			

<i>Data de coleta</i>	<i>Inscrição no ICB</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-PCR- F</i>	<i>Sequen. Gen F</i>
28/04/2004	194	PA	3m3d	+			
28/04/2004	195	PA	1m26d	+			
29/04/2004	196	PA	1m17d	+	GA5		
29/04/2004	197	PA	6m21d	-		+	+
29/04/2004	198	Enfermaria	5m1d	+	GA5	+ /cc ⁺	-
29/04/2004	199	Enfermaria	3m21d	+		-	
29/04/2004	200	PA	1m2d	+		-	
30/04/2004	201	PA	28d	+			
30/04/2004	202	PA	5m	+		-	
30/04/2004	203	UTI	7m30d	+	GA2		
03/05/2004	204	UTI	2a3m	+			
03/05/2004	205	UTI	1a2m	+			
03/05/2004	206	UTI	2m10d	+	GA5	+	+
04/05/2004	207	Enfermaria	3m8d	-			
05/05/2004	208	Enfermaria	2m24d	+		- /cc ⁻	
05/05/2004	209	Enfermaria	4m	+		+	-
05/05/2004	210	UTI	20d	+		-	
05/05/2004	211	Enfermaria	5m	+		-	
05/05/2004	212	Enfermaria	5m6d	+		-	
05/05/2004	213	Enfermaria	8m16d	+		-	
06/05/2004	214	Enfermaria	3m20d	+		-	
06/05/2004	215	Enfermaria	6m20d	+	GA2	+	+
06/05/2004	216	Enfermaria	6m22d	+		+ /cc ⁺	
07/05/2004	217	UTI	22d	+		+ /cc ⁺	-
07/05/2004	218	UTI	6m23d	+		+ /cc ⁺	-
07/05/2004	219	Enfermaria	1m13d	+		- /cc ⁻	
10/05/2004	220	Enfermaria	3m9d	+		-	
10/05/2004	221	Enfermaria	4m29d	+	GA5	+	+
10/05/2004	222	UTI	1m10d	+		+ /cc ⁺	+
10/05/2004	223	Enfermaria	2m13d	+		+ /cc ⁺	-
10/05/2004	224	UTI	4m	+		+	+
10/05/2004	225	PA	2m1d	+	GA5	+	+
10/05/2004	226	PA	5m27d	+		+ /cc ⁻	
11/05/2004	227	PA	1m4d	+		+ /cc ⁻	
11/05/2004	228	PA	3m4d	+	GA2	-	
12/05/2004	229	PA	5m	+		+ /cc ⁻	-
12/05/2004	230	PA	10m	+	GA2	+ /cc ⁺	-
12/05/2004	231	PA	6m29d	+		-	
12/05/2004	232	PA	11m	-		-	
17/05/2004	233	Berçário	19d	+	GA5	+ /cc ⁻	
18/05/2004	234	PA	4m12d	+	SAB3	-	
18/05/2004	235	Enfermaria	3m4d	+		+ /cc ⁻	
19/05/2004	236	PA	2a3m	+			
19/05/2004	237	UTI	4m15d	+			
19/05/2004	238	UTI	4m	+		+	
19/05/2004	239	UTI	5m9d	+	GA2	+	-
19/05/2004	240	UTI	29d	+	GA5	+ /cc ⁺	-
19/05/2004	241	UTI	11m18d	-			

<i>Data de coleta</i>	<i>Inscrição no ICB</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-PCR- F</i>	<i>Sequen. Gen F</i>
20/05/2004	242	Enfermaria	5m16d	+		-	
20/05/2004	243	UTI	1a7m	-			
20/05/2004	244	UTI	3m25d	+		-	
20/05/2004	245	UTI	1m17d	+	SAB3	+/-cc ⁺	
24/05/2004	246	Berçário	0a	+		+/-cc ⁻	
26/05/2004	247	UTI	2a3m	-			
26/05/2004	248	UTI	3a	-			
26/05/2004	249	UTI		-			
26/05/2004	250	Berçário	28d	+	GA5	-	
27/05/2004	251	UTI	15d	+	GA5	-	
27/05/2004	252	PA	7m	+		+	
27/05/2004	253	Enfermaria	2m	+	GA5	+	
27/05/2004	254	Enfermaria	1m30d	+		-	
27/05/2004	255	Berçário	3m	-			
27/05/2004	256	Berçário	1m	+		-/-cc ⁻	
27/05/2004	257	Berçário	1m1d	+		+/-cc ⁺	
27/05/2004	258	PA	8m23d	+		+/-cc ⁺	
27/05/2004	259	PA	1m5d	+		-	
31/05/2004	260	Enfermaria	10m12d	-			
31/05/2004	261	Enfermaria	1a9m22d	+		+	
31/05/2004	262	Enfermaria	3m5d	-			
31/05/2004	263	UTI	1m13d	-			
01/06/2004	264	UTI	22d	-			
01/06/2004	265	UTI	11m22d	-			
01/06/2004	266	PA	3m4d	+		-	
01/06/2004	267	Enfermaria	1m	-			
02/06/2004	268	PA	2m24d	+	GA2	+	+
02/06/2004	269	UTI	2a2m	-			
03/06/2004	270	UTI	1m16d	+	GA5	-	
08/06/2004	271	Enfermaria	3m10d	-			
14/06/2004	272	UTI	6m17d	-			
14/06/2004	273	UTI	2m16d	+	GA2		
14/06/2004	274	UTI	1m15d	+			
14/06/2004	275	UTI	10d	-			
14/06/2004	276	UTI	11m23d	-			
14/06/2004	277	Enfermaria	8m7d	-			
14/06/2004	278	PA	4m28d	+	GA2	-	
14/06/2004	279	PA	4m9d	+		-	
14/06/2004	280	Enfermaria	1m2d	-			
14/06/2004	281	Enfermaria	4m9d	+		-	
16/06/2004	282	Enfermaria	2m4d	-			
16/06/2004	283	Enfermaria	4m25d	+	GA2	+	
16/06/2004	284	PA	2m16d	-			
16/06/2004	285	UTI	5m28d	+		-	
17/06/2004	286	Berçário	1m	+		-	
18/06/2004	287	PA	6m24d	-			
18/06/2004	288	Enfermaria	3m28d	-			

<i>Data de coleta</i>	<i>Inscrição no ICB</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-PCR- F</i>	<i>Sequen. Gen F</i>
18/06/2004	289	PA	1a8m4d	+		-	
21/06/2004	290	Enfermaria	4m11d	-			
21/06/2004	291	PA	5m10d	-			
22/06/2004	292	PA	3m1d	-			
22/06/2004	293	UTI	6m2d	+	GA5	+	-
22/06/2004	294	Berçário	28d	+			
23/06/2004	295	UTI	1m20d	+	GA2	+	
24/06/2004	296	Enfermaria	6m4d	+		+	
24/06/2004	297	PA	2m23d	-			
24/06/2004	298	UTI	19d	-			
24/06/2004	299	PA	7m	-			
24/06/2004	300	PA	6m22d	-			
28/06/2004	301	Enfermaria	1m22d	-			
28/06/2004	302	PA	2m23d	-			
28/06/2004	303	Enfermaria	1m17d	+	SAB1	+	+
29/06/2004	304	PA	1m28d	+	GA5	+	+
29/06/2004	305	PA	3m4d	-			
30/06/2004	306	PA	1m8d	-			
30/06/2004	307	PA	1m2d	+		-	
01/07/2004	308	PA	7m	-			
01/07/2004	309	UTI	1m19d	+		+	-
02/07/2004	310	PA	28d	-			
02/07/2004	311	PA	1a2m	-			
05/07/2004	312	UTI	9d	-			
05/07/2004	313	Enfermaria	2m15d	+		-	
05/07/2004	314	Enfermaria	2m4d	+	GA5		
06/07/2004	315	PA	9m	+		+	+
07/07/2004	316	PA	3m28d	+		-	
07/07/2004	317	PA	1a5m	-			
07/07/2004	318	PA	1a7m	-			
08/07/2004	319	PA	3m	-			
08/07/2004	320	PA	5m14d	-			
08/07/2004	321	Enfermaria	3m19d	-			
08/07/2004	322	UTI	2m22d	-			
12/07/2004	323	UTI	13d	+		-	
12/07/2004	324	Enfermaria	5m26d	-			
12/07/2004	325	Enfermaria	4m12d	+			
14/07/2004	326	Berçário	16d	+			
14/07/2004	327	UTI	22d	+			
15/07/2004	328	Enfermaria	1m25d	+			
15/07/2004	329	Enfermaria		-			
15/07/2004	330	Enfermaria	8m2d	+			
20/07/2004	331	UTI	1m20d	+			
20/07/2004	332	UTI	23d	-			
20/07/2004	333	Enfermaria	1a1m	-			
20/07/2004	334	Enfermaria	1m5d	+			
21/07/2004	335	UTI	1a2m	+			

<i>Data de coleta</i>	<i>Inscrição no ICB</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-PCR- F</i>	<i>Sequen. Gen F</i>
22/07/2004	336	Enfermaria	3m13d	-			
27/07/2004	337	Enfermaria	9m5d	+			
27/07/2004	338	Enfermaria	1m5d	-			
27/07/2004	339	Enfermaria	8m16d	+			
28/07/2004	340	UTI	1m28d	+			
29/07/2004	341	UTI	3m15d	-			
29/07/2004	342	UTI	2a2m23d	-			
29/07/2004	343	UTI	1a9m24d	-			
29/07/2004	344	UTI	1a6m22d	-			
30/07/2004	345	Enfermaria	9m8d	-			
03/08/2004	346	Enfermaria	10m	-			
04/08/2004	347	PA	8m9d	-			
04/08/2004	348	PA	10m20d	-			
09/08/2004	349	Enfermaria	11m16d	-			
09/08/2004	350	Enfermaria	2m22d	-			
09/08/2004	351	Enfermaria	1a	-			
09/08/2004	352	Enfermaria	3m5d	-			
09/08/2004	353	Enfermaria	1m24d	-			
10/08/2004	354	UTI	4m2d	-			
10/08/2004	355	UTI	1m16d	-			
10/08/2004	356	Enfermaria	5m18d	-			
11/08/2004	357	Enfermaria	1m10d	-			
11/08/2004	358	Enfermaria	1a10m8d	-			
11/08/2004	359	Enfermaria	1am2d	-			
12/08/2004	360	Enfermaria	10m	-			
12/08/2004	361	PA	3m29d	-			
13/08/2004	362	Enfermaria	10m29d	-			
13/08/2004	363	Enfermaria	1a3m23d	-			
16/08/2004	364	UTI	2m	-			
16/08/2004	365	Enfermaria	2m28d	-			
17/08/2004	366	UTI	4m9d	-			
18/08/2004	367	Enfermaria	3a3m24d	-			
19/08/2004	368	Enfermaria	8m6d	-			
19/08/2004	369	Enfermaria	1m25d	-			
19/08/2004	370	Enfermaria	2m28d	-			
20/08/2004	371	Enfermaria	1a2m24d	-			
24/08/2004	372	Enfermaria	4a6m	-			
24/08/2004	373	Enfermaria	8m5d	-			
24/08/2004	374	Enfermaria	1m2d	-			
26/08/2004	375	UTI	17d	-			
31/08/2004	376	Enfermaria	1a2m	-			
31/08/2004	377	PA	4m26d	-			
31/08/2004	378	UTI	1a7m23d	-			
31/08/2004	379	PA	11d	+			
01/09/2004	380	Enfermaria	5m7d	+			
01/09/2004	381	Enfermaria	2m16d	-			
01/09/2004	382	Enfermaria	3m10d	-			

<i>Data de coleta</i>	<i>Inscrição no ICB</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-PCR- F</i>	<i>Sequen. Gen F</i>
01/09/2004	383	Enfermaria	3m20d	-			
01/09/2004	384	Enfermaria	3m23d	-			
09/09/2004	385	UTI		-			
09/09/2004	386	UTI	1m4d	-			
13/09/2004	387	Enfermaria	4m24d	-			
13/09/2004	388	Enfermaria	1a7m	-			
13/09/2004	389	Enfermaria	1a2m	-			
13/09/2004	390	Enfermaria	3a10m25d	-			
13/09/2004	391	PA	7m4d	-			
13/09/2004	392	Enfermaria	9m24d	-			
16/09/2004	393	Enfermaria	1m	-			
16/09/2004	394	Enfermaria	1m19d	-			
16/09/2004	395	Enfermaria	6m19d	-			
16/09/2004	396	Enfermaria	4a8m1d	-			
16/09/2004	397	Enfermaria	6m	-			
21/09/2004	398	Enfermaria	7m	-			
21/09/2004	399	Enfermaria	1a1m	-			
21/09/2004	400	Enfermaria	7m6d	-			
21/09/2004	401	UTI	20d	-			
22/09/2004	402	Enfermaria	4m11d	-			
22/09/2004	403	Enfermaria	11m	-			
23/09/2004	404	Enfermaria	3m29d	-			
28/09/2004	405	UTI	9m13d	-			
30/09/2004	406	Enfermaria	2a6m9d	-			
30/09/2004	407	Enfermaria	1a14d	-			
30/09/2004	408	Enfermaria	5m11d	-			
30/09/2004	409	Enfermaria	8m17d	-			
30/09/2004	410	Enfermaria	6m20d	-			
01/10/2004	411	UTI	4m11d	-			
05/10/2004	412	Enfermaria	1a2m	-			
05/10/2004	413	Enfermaria	7m5d	-			
05/10/2004	414	Enfermaria	10m	-			
06/10/2004	415	Berçário	6d	-			
06/10/2004	416	Berçário	1m1d	-			
08/10/2004	417	Enfermaria	2m25d	-			
08/10/2004	418	Enfermaria	4m2d	-			
08/10/2004	419	Enfermaria	6m29d	-			
08/10/2004	420	UTI	2a17d	-			
13/10/2004	421	Enfermaria	3m24d	-			
13/10/2004	422	Enfermaria	3m15d	-			
13/10/2004	423	Enfermaria	3m7d	-			
18/10/2004	424	UTI	1a6d	-			
22/10/2004	425	UTI	9m10d	-			
22/10/2004	426	Berçário	1m2d	-			
25/10/2004	427	Enfermaria	10m5d	-			
25/10/2004	428	Enfermaria	5m22d	-			
25/10/2004	429	Enfermaria	6m10d	-			
<i>Data de</i>	<i>Inscrição</i>	<i>Procedência</i>	<i>Idade</i>	<i>PCR-GS</i>	<i>Genótipo</i>	<i>RT-</i>	<i>Sequen.</i>

<i>coleta</i>	<i>no ICB</i>				<i>PCR- F</i>	<i>Gen F</i>
29/10/2004	430	UTI	4m21d	-		
29/10/2004	431	UTI	7m20d	-		
29/10/2004	432	UTI	2m10d	-		
01/11/2004	433	Enfermaria	10m13d	-		
05/11/2004	434	Enfermaria	9m20d	-		
05/11/2004	435	Enfermaria	3a2m21d	-		