

ERICK GUSTAVO DORLASS

Vírus Sincicial Respiratório circulantes em pacientes pediátricos: epidemiologia molecular e caracterização genotípica de resistência frente ao Palivizumabe.

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

ERICK GUSTAVO DORLASS

Vírus Sincicial Respiratório circulantes em pacientes pediátricos: epidemiologia molecular e caracterização genotípica de resistência frente ao Palivizumabe.

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Microbiologia

Orientador: Danielle Bruna
Leal de Oiveira

Versão Original.

São Paulo

2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Dorlass, Erick Gustavo

Vírus Sincicial Respiratório circulantes em
pacientes pediátricos: epidemiologia molecular e
caracterização genotípica de resistência frente ao
Palivizumabe. / Erick Gustavo Dorlass; orientadora
Danielle Bruna Leal de Oliveira. -- São Paulo,
2020.

79 p.

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

1. Vírus Sincicial Respiratório. 2. Proteína G. 3.
Proteína F. 4. Palivizumab. I. Oliveira, Danielle
Bruna Leal de , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Erick Gustavo Dorlass

Título da Dissertação: Vírus Sincicial Respiratório circulantes em pacientes pediátricos: epidemiologia molecular e caracterização genótipica de resistência frente ao Palivizumabe.

Orientador: Dra. Danielle Bruna Leal de Oliveira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

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

Examinador (a): Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia e Caracterização Molecular do Vírus Respiratório Sincicial em Pacientes Pediátricos em São Paulo.

Pesquisador: Erick Gustavo Dorlass

Área Temática:

Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP)

Versão: 1

CAAE: 79683917.1.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.395.464

Apresentação do Projeto:

Título de projeto: Epidemiologia e Caracterização Molecular do Vírus Respiratório Sincicial em Pacientes Pediátricos em São Paulo.

Pesquisador responsável: ERICK GUSTAVO DORLASS

Instituição onde se realiza: Departamento de Microbiologia – ICBII -USP.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é determinar os diferentes genótipos e subtipos das cepas e Vírus Sincicial Respiratório (VSR) circulantes em crianças apresentando Infecções Respiratórias Agudas (IRA) utilizando técnicas de biologia molecular para caracterizar a glicoproteína G, e monitorar as mudanças evolutivas da proteína F que podem promover a insuscetibilidade do vírus ao o anticorpo murínico humanizado (mAb) Palivizumab (PZ) que é a única medida profilática ao VSR aprovada para uso em grupos de risco pela Food and Drug Administration (FDA) – USA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este é um estudo de variabilidade genética viral de relevância, pois visa estabelecer padrões de resistência viral ao PZ, o que vai ser útil na racionalização da sua aplicação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sumário do projeto. Este projeto visa estudar marcadores de resistência virais para o Palivizumab em crianças infectadas por VSR. Descrição e caracterização da amostra. Amostras são de aspirado de nasofaringe (ANF), congeladas por criogenia e mantidas a -70°C, após coletadas, após pedido médico, de crianças com idade inferior a seis anos, que apresentaram Infecção Respiratória Aguda (IRA) e que serão atendidas no pronto atendimento, ambulatório ou internadas na pediatria do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

(HU-USP). Neste estudo, serão utilizadas amostras de ANF coletadas de janeiro de 2017 a Dezembro de 2018 que possuam imunofluorescência para VSR. Para estas coletas prospectivas será coletado TCLE.

Critérios de inclusão e exclusão. Este estudo incluirá amostras de crianças menores de 5 anos com sinais clínicos de IRA e resultados positivos para positivas por imunofluorescência para VSR. Não serão utilizados para esse estudo amostras de crianças maiores de 5 anos e amostras de crianças menores de 5 anos porém negativas para VSR. **Adequação de Metodologia e protocolo experimental.** A metodologia é canônica e vem sendo aplicada com sucesso há décadas. **Adequação das condições de amostragem.** As amostras advém de um serviço de caracterização viral de crianças com Infecções Respiratórias Agudas, que vem sendo prestado com sucesso pelo laboratório de virologia clínica do Prof. Durigon no ICB II. **Justificativa de uso de placebo e suspensão terapêutica (wash-out), se for o caso.** Não se aplica.

Informação adequada quanto ao financiamento. Não foi possível determinar a origem do financiamento a partir do material apresentado no processo.

Avaliar atividades de outros centros, no caso de estudos multicêntricos. Não há envolvimento de outros centros de pesquisa neste projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

todos os documentos foram apresentados

Recomendações:

Este é um projeto interessante que pode prover informações importantes sobre a única estratégia terapêutica efetiva sendo utilizada contra o RSV. O projeto não interfere diretamente nos sujeitos de pesquisa pois utiliza secreções (aspirado naso-faríngeo) que são coletadas de forma rotineira para a identificação de viroses respiratórias infantis.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado

De acordo com o parecer de relator e parecer consubstanciado já constante no processo e dada a explicação para pendência dada pelo pesquisador, o Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação `as amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto `a plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer de relator e parecer consubstanciado já constante no processo e dada a explicação para pendência dada pelo pesquisador, o Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação `as amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto `a plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_959680.pdf	01/11/2017 12:48:50		Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoErick.pdf	01/11/2017 12:48:12	ERICK GUSTAVO DORLASS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_USP_Erick_2017.pdf	31/10/2017 19:48:50	ERICK GUSTAVO DORLASS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Carta_Anuencia_Biorrepositorio.pdf	24/10/2017 09:39:27	ERICK GUSTAVO DORLASS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	24/10/2017 09:38:53	ERICK GUSTAVO DORLASS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 14 de Janeiro de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos meus colegas de trabalho do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular, em especial minha orientadora Dra. Danielle Bruna por ter me acolhido e visto meu potencial, assim como o Professor Edison Luis Durigon

Agradeço ao Luciano Thomazelli e Flavio Mesquita por sempre me apontarem o caminho correto enquanto trilhava o errado

Agradeço ao gradíssimo José Maria pela dedicação ao trabalho e pontualidade crucial para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao grupo do Hospital Universitário pelo esforço diário em ajudar pessoas. Esforço do qual esse trabalho não seria possível

Agradeço a minha família por acreditar e incentivar o meu caminho acadêmico.

Agradeço à minha namorada Priscila pelo carinho e paciência intermináveis durante toda duração desse projeto

Esse trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES), processo número: 1742355.

RESUMO

DORLASS, EG. Vírus Sincicial Respiratório circulantes em pacientes pediátricos: epidemiologia molecular e caracterização genotípica de resistência frente ao Palivizumabe. 2020. 79f [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2020.

O Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) é o principal causador de infecções respiratórias em crianças, responsável por 3.8 milhões de admissões hospitalares resultantes em 74.500 mortes por ano. O HRSV é um membro da família *pneumoviridae*, com um genoma expressando 10 genes e codificando 11 proteínas e com dois subtipos conhecidos (A e B). A única profilaxia e tratamento para o vírus é o MAb Palivizumab (PVZ) que impossibilitam a infecção. Mutações de resistência ao PVZ já foram reportadas no mundo, mas no Brasil estes dados são desconhecidos. O Objetivo deste trabalho foi determinar os genótipos circulantes e possíveis mutantes de escapes ao PVZ nos anos 2017 a 2019. Neste estudo, recebemos 3.038 amostras de ANF de pacientes pediátricos atendidos no Hospital Universitário da USP, previamente testados para HRSV por IF. Destas, 817 (26,9%) foram positivos para o vírus e 383 (46,9%) dessas amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger que resultou em 219 (57,1%) amostras de HRSV do subtipo A e 164 (42,9%) do HRSVB. O subtipo A foi predominante em 2017 e 2019 enquanto o subtipo B em 2018. A análise filogenética mostrou a dominância dos genótipos ON1 e BA9. Uma inserção de dois aminoácidos em uma região nunca descrita foi encontrada em uma amostra do genótipo ON1 e a predição de sua estrutura mostrou alterações conformacionais importantes na proteína G. Pelo método de Pyrosequenciamento não foi encontrada nenhuma amostra com perfil de resistência ao PVZ. O HRSV é um vírus de grande importância para saúde pública e nosso trabalho demonstrou que hoje em SP, somente circulam 2 genótipos do HRSV, com alternância anual de predominância e com uma glicoproteína de superfície maleável capaz de resistir a mutações, garantindo escape imunológico. Além disso, a utilização do Palivizumab como profilaxia, parece ainda ser eficiente, pois não foram encontrados mutantes de escape ao monoclonal em nossas amostras.

Palavras-Chave: *Vírus Sincicial Respiratório. Glicoproteína G. Pyrosequenciamento. Palivizumab.*

ABSTRACT

DORLASS, EG. Circulating Respiratory Syncytial Virus in pediatric patients: molecular epidemiology and genetic characterization resulting Palivizumab resistance. 2020. 79p [Dissertation (Masters in Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2020.

The Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is a leading cause of respiratory infections in pediatric patients, responsible for 3,8 million hospital admissions resulting in 74,500 deaths each year. HRSV is a member of the pneumoviridae family expressing 10 genes coding 11 proteins. There is two HRSV subtypes (A and B), each one of them containing different genotypes through analysis of the surface glycoprotein G. The only prophylactic and treatment measurement for HRSV infections is the MAb Palivizumab (PVZ) that binds to the F protein site impossibilitating virus infection. Mutations generating Palivizumab resistance have already been reported worldwide, but there is no current data regarding escape mutants in Brazil. The objective of this study was analyse the HRSV circulation in the city of São Paulo identifying the circulating genotype and possible Palivizumab escape mutants through 2017 to 2019. A total of 3308 nasopharyngeal aspirates were received from the University Hospital. Those samples were previously tested of HRSV by immunofluorescence assay, resulting in 817 (24,7%) positive samples for HRSV and 383 (46,9%) of those were analyse by Sanger sequencing resulting in 219 (57,1%) HRSVA samples and 164 (42,9) HRSVB. Subtype A was predominant in 2017 and 2019, while subtype B in 2018. Phylogenetic analysis showed dominance of the genotypes ON1 and BA9. A never reported two aminoacids insertion was found in the Heparin Binding Region of the G protein. Structural prediction showed conformational changes in the G protein. Pyrosequencing method was used for search of Palivizumab previously reported resistance mutations, none of them were found. In conclusion, HRSV have a major public health importance, containing a plastic surface glycoprotein capable of resistance multiple mutations ensuring immunologic evasion. Furthermore, Palivizumab applications should remain efficient since no mutations were found in this study

Keywords: *Respiratory Syncytial Virus. G Protein. Resistance. Palivizumab*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – A: Representação estrutural do HRSV. B: Representação da organização genômica do HRSV fonte: Silva, 2018.....	18
Figura 2 - Conformação estrutural da proteína NS1.....	20
Figura 3 - Estrutura da proteína N conjugada com RNA viral (destacada pela seta), formando o completo N-RNA. Adaptado de Tawar.....	21
Figura 4: Estrutura conformacional da proteína SH. Destaca-se seu formato cilíndrico.....	22
Figura 5 - A: Organização genômica da proteína G. Observa-se a região conservada ao lado da região ligante a heparina intercalada por duas regiões Mucin-like, HVR 1 e HVR2. A organização das pontes de sulfeto entre as cisteínas 1-4 e 2-3 também é observada, assim como o sítio CX3C entre as duas últimas cisteínas. B: Estrutura da região conservada, observa-se o <i>loop</i> gerado pelas ligações de cisteína.....	23
Figura 6 - Conformação estrutural da proteína F nas fases de pré - fusão do envelope viral (A) e pós - fusão (B)	25
Figura 7 - Conformação estrutural da proteína M2-1.....	26
Figura 8 - Conformação estrutural da proteína L.....	26
Figura 9 - Ciclo de replicação do HRSV.....	28
Figura 10 - Brotamento do HRSV, demonstrado por micrografia eletrônica....	29
Figura 11 - Representação do teste direto de imunofluorescência.....	32
Figura 12 - Representação do teste indireto de imunofluorescência.....	32
Figura 13 - Ilustração de um resultado de IFI para o HRSV.....	33
Figura 14 – A: Representação estrutural do Mab Palivizumabe B: Esquema representativo da sequencia de AA e NT no sítio de ação do Palivizumabe.....	34
Figura 15 - Fluxo de trabalho utilizado para a elaboração desse trabalho. A linha pontilhada marca a divisória das atividades realizadas no Hospital Universitário e no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM).....	40
Figura 16 - Alinhamento realizado no Aliview contendo um sequencia HRSVA de 2019 (BRSP_10352_2019), uma sequência com uma inserção de 6 nucleotídeos, ou dois aminoácidos (BRSP_10532_2019) e uma sequência mutante Gly195Glu (BRSP_8110_2017). O item A representa o alinhamento de	

nucleotídeos (554 a 606) das amostras citadas enquanto o ítem B representa o alinhamento de Aminoácidos (164 – 211).....	52
Figura 17 - Alinhamento de aminoácidos das sequências HRSVA em comparação com a sequência ON1.....	53
Figura 18 - Árvore Filogenética das amostras do subtipo A. Todas as sequencias apresentaram a duplicação de 72nt, portanto se agruparam clado ON1, marcado em vermelho.....	56
Figura 19 - Comparação entre a estrutura do RSV G (PDB 6BLH) e o modelo baseado na sequência com inserção de 2 aminoácidos (NK ou Asn e Lys).....	57
Figura 20 - Demonstração de mudanças conformacionais e de cargas decorrentes da inserção dos resíduos NK na sequência de RSVG 10636.....	58
Figura 21 - Alinhamento de aminoácidos das sequências HRSVB em comparação com a sequência BA.....	61
Figura 22 - Árvore Filogenética das amostras do subtipo B. Os cladoss marcados em azul são pertencentes ao genótipo BA, ou seja, possuem a duplicação de 60nt,. Todas as sequencias incluídas nesse projeto se encontram no clado BA9, marcado em vermelho.....	63
Figura 23 - Pirograma da amostra BRSP_8923_2017 na região AA268.....	64
Gráfico 1 - Representação sazonal do HRSV no Brasil. A: sazonalidade do HRSV na cidade de São Paulo. Observa-se uma sazonalidade característica do hemisfério Sul com maior número de infecções durante o Outono. B: Sazonalidade na cidade de Fortaleza, observa-se acompanhamento de casos de infecções com o índice pluviométrico.....	31
Gráfico 2 - Prevalência de HRSV em ANF de pacientes pediátricos, atendidos no HU-USP, durante os 3 anos de estudo.....	47
Gráfico 3, 4 e 5: Amostragem dos anos 2017 (1) , 2018 (2) e 2019 (3)	48
Gráfico 6 e 7: Representação da distribuição de cada subtipo de HRSV ao longo dos anos estudados.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos primers utilizados, suas respectivas sequências, gene alvo e métodos e referências.....	42
Tabela 2 - Primers utilizados no Pirosequenciamento, suas respectivas sequências e posições no gene F.....	45
Tabela 3 - Relação do número de amostras positivas para HRSV de acordo com o local de procedência, que os pacientes pediátricos foram atendidos no HU-USP, nos anos de 2017 a 2019	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A – Adenina

A, ALA – Alanina

AA – Aminoácido

C – Citosina

C, Cys, - Cysteina

CCA – Chimpanzee Coriza Agent

D, Asp – ácido Aspartico

DNA – Acido Desoxiribonucleico

E, Glu, - Acido Glutamico

EUA – Estados Unidos da America

F, Phe – Fenilalanina

FDA – Food and Drug Administration

G – Guonina

G, Gly – Glicina

GE – Gene End

GS – Gene Start

H, His – Histidina

HRSV- Vírus Sincicial Respiratório Humano

HVR – Região hipervariável

I, Ile – Isoleucina

ICTV - International Comittee on Taxonomy of Viruses

K, Lys – Lisina

L, Leu - Leucina

LVCM – Laboratório de Virologia Clínica e Molecular

M, Met – Metionina

Mt – Mutante

N, Asn, - Asparagina

NT – Nucleotídeo

ORF- Open Reading Frame

P, Pro – Prolina

Pb – Par de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDB – Protein Data bank

PZV – Palivizumabe

Q, Gln – Glutamina

R, Arh – Argenina

RNA – Acido Ribonucleico

RT – PCR – Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase

S, Ser – Serina

SNP – Sigle Nucleotide Polimorfism

T – Timina

T, Thr - Theorina

V, Val – Valina

W, Trp, - Triptofano

Wt – Selvagem

Y, Tyr, - Tirosina

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
1.1 Histórico	17
1.2 Classificação e Estrutura	18
1.3 Genôma	19
1.4 Replicação	27
1.5 Aspectos Clínicos	29
1.6 Sazonalidade	30
1.7 Diagnóstico	31
1.8 Profilaxia e tratamento.....	33
2. Justificativa e relevância do trabalho.	36
3. Objetivos	38
4. Metodologia	39
4.1 Casuística	39
4.2 Fluxo de trabalho	40
4.3 Extração do ácido nucléico total (RNA e DNA).....	41
4.4 Amplificação do Ácido Nucleico	41
4.5 Sequenciamento	43
4.5.1 Sanger.....	43
4.5.2 Alinhamento e Edição das amostras	44
4.5.3 Análise Filogenética	44
4.5.4 Pirosequenciamento	44
4.6 Modelagem	46
5.Resultados	47
5.1 Amostragem.....	47
5.2 Análise da proteína G	49
5.2.1 Subtipagem	49
5.3.1 Análise de Genotipagem do HRSVA.....	51
5.3.2 Análise de Genotipagem do HRSVB.....	58
5.4 Pirosequenciamento	64
6. Discussão	65
7. Conclusão	68
8. Referências Bibliográficas	69

1. Introdução

1.1 Histórico

Em 1955 no *Walter Reed Army Institute Research* em Washington D.C (Estados Unidos da America- EUA) o Vírus Sincicial Respiratório Humano (HRSV) foi isolado pela primeira vez por Morris e colaboradores (1) ao investigarem um surto de doença respiratória em uma colônia de chimpanzés. Os animais apresentavam sintomas comuns de resfriado como tosse, espirros e coriza. O vírus foi nomeado de “*Chimpanzee coryza agent*” (CCA). Quase 100% dos animais da colônia estavam infectados pelo agente, assim como alguns humanos contactantes que apresentaram infecção mais branda (2).

Um ano após o isolamento, no condado de Baltimore (EUA), pesquisadores isolaram o patógeno de dois pacientes infantis, um com pneumonia e o outro com crupe. Devido a formação de sincícios nas culturas celulares, o CCA foi renomeado Vírus Sincicial Respiratório Humano (3,4).

O vírus foi associado a infecções respiratórias das vias superiores e inferiores apenas a partir de 1960, com importância nas infecções em crianças menores de 5 anos, principalmente nos 6 primeiros meses de vida (5,6). Em 1985, Glezen *et al.* (7) demonstrou o HRSV sendo o principal causador de hospitalizações pediátricas por infecções respiratórias no mundo, sendo que 100% das crianças tiveram sua primo-infecção até 2 anos de idade e 50% delas, sofreram com uma re-infecção no mesmo período. O primeiro isolamento do HRSV no Brasil ocorreu em 1967 (8)

Diversos estudos se realizaram a partir da década de 1960, incluindo a tentativa de uma vacina a partir da inativação viral por formamida em 1967 (9). O resultado não foi o esperado, com infecções mais graves no grupo de crianças vacinadas.

Estudos recentes sugerem o HRSV como o vírus humano mais infeccioso (10) e de grande importância clínica, especialmente pediátrica. Foi estimado em 2015 que o RSV infectou aproximadamente 33.1 milhões de pessoas, houveram

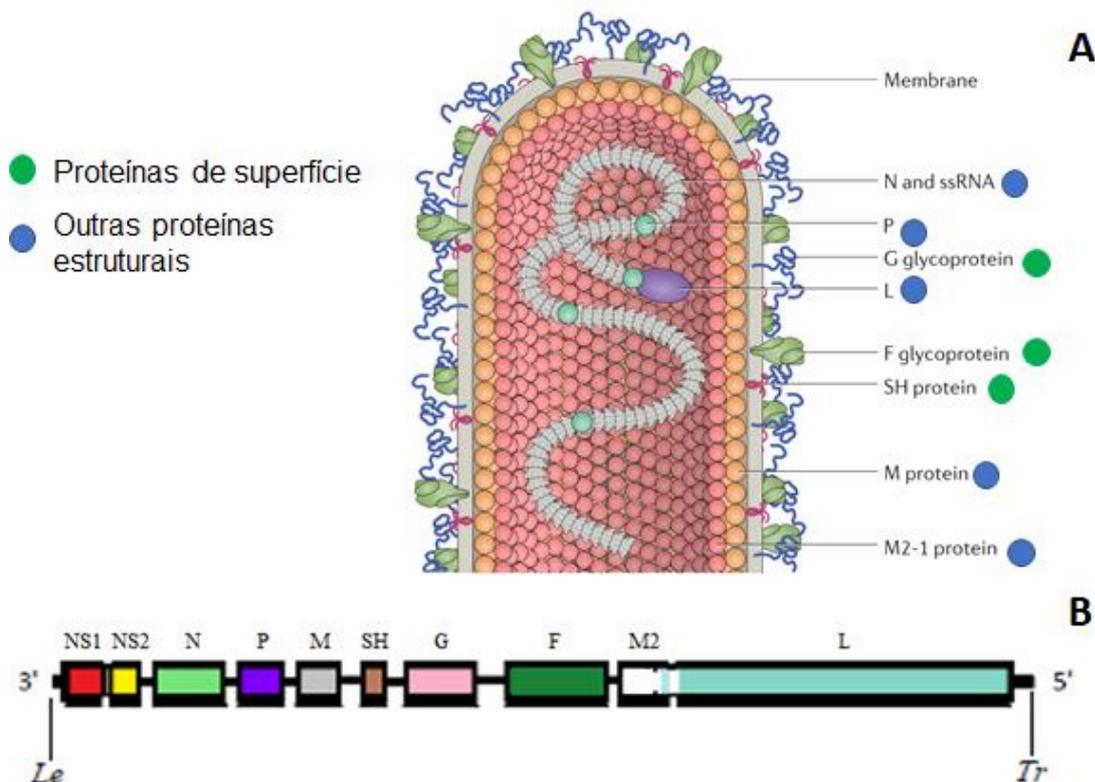
até 3.8 milhões de admissões hospitalares e 74.500 mortes de crianças menores de 5 anos em todo o Mundo. Em crianças de até 6 meses, estima-se 1.7 milhões de admissões hospitalares resultando em 36.200 mortes (11)

1.2 Classificação e Estrutura

O HRSV é um vírus pertencente à ordem Mononegavirales, família pneumoviridae e gênero orthopneumovirus. Em 2016, o vírus foi renomeado para Orthopneumovirus Humano pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

O HRSV possui entre 100 a 350 nanômetros (nM) e é composto por um nucleocapsídeo envelopado com formato esférico ou filamentososo, proveniente da membrana da célula hospedeira. Seu genoma é composto por uma única fita de ácido ribonucleico (RNA) de polaridade negativa com um tamanho de 15,2 Kb, contendo 10 genes codificantes para 11 proteínas e é organizado na ordem: 3' – NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L – 5' (2,12) (Figura 1).

Figura 1 – A: Representação estrutural do HRSV, adaptado de Battles, 2019 (12). **B:** Representação da organização genômica do HRSV fonte: Silva, 2018



1.3 Genôma

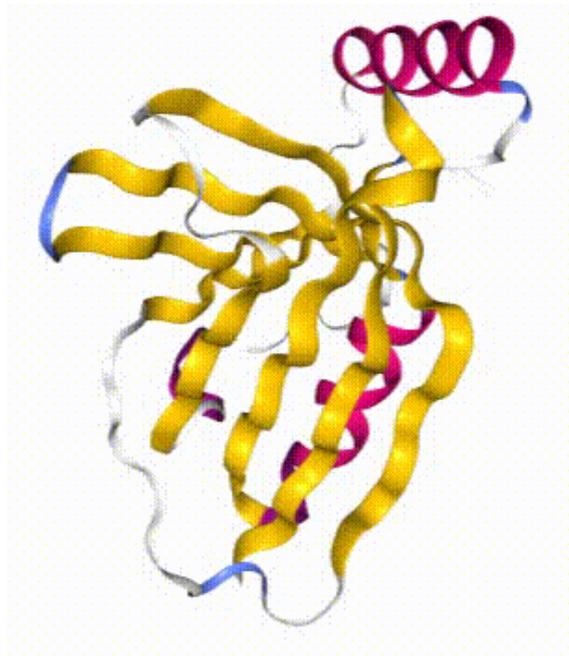
O genoma do vírus é flanqueado por duas regiões extra-gênicas, *Leader* e *Trailer*, sendo a primeira composta por 44 nucleotídeos (nt) localizada na porção 3' do genoma e possui a função de sinalização de início de transcrição do genoma viral e recrutamento da polimerase. A região *Trailer* se localiza na porção 5' do genoma, possui 155 nt e tem como função a sinalização de transcrição do anti-genoma e inibição da apoptose (13)

Cada gene também é intercalado por uma região de início de transcrição (*gene-start signal* – GS) de 9 nt na porção 3' e de término de transcrição na porção 5' (*gene-end signal* – GE) de 12 a 14 nt com até 7 uracilas (U) para poliadenilação (14)

Todos os genes compreendidos entre NS1 e M2 possuem entre eles uma região inter-gênica sem nenhuma função regulatória da replicação viral. Essa região não é conservada e possui um tamanho variável chegando até 52 nt (14) e não esta presente entre as proteínas M2 e L, onde ocorre uma sobreposição de 68 nucleotídeos entre os dois genes (15).

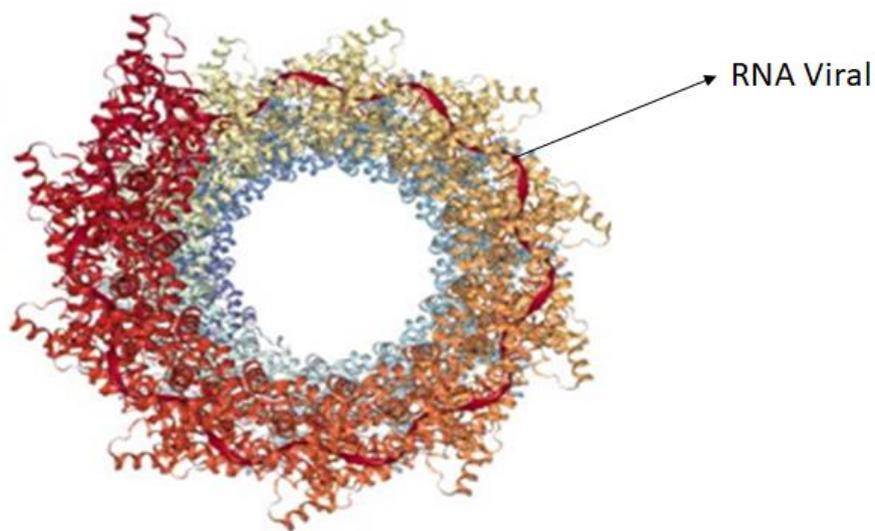
As primeiras proteínas a serem traduzidas são as não estruturas, NS1 e NS2 de 139 e 124 aminoácidos (AA) respectivamente. Ambas inibem a apoptose e antagonizam a produção de Interferon I e III (2,16,17), promovendo maior tempo de vida da célula infectada e concomitante maior replicação viral (14). A proteína NS1 (Figura 2) também possui ação inibitória a replicação e transcrição do RNA viral. Essa função ainda é inexplicada (18).

Figura 2 - Conformação estrutural da proteína NS1, fonte: Groskreutz, 2010(19)



O gene N transcreve a Nucleoproteína de 391 AA, sendo essa a principal proteína estrutural do vírus. O RNA viral forma um complexo com a proteína N (Complexo N-RNA, figura 3) (2,12) ligando-se a 7 nucleotídeos específicos gerando uma volta helicoidal e assim um molde para a síntese do RNA inibindo possíveis estruturas secundárias de RNA como *Loops* e *Hairpins* (20). Ainda existe uma função inibitória do sistema inato promovido pela proteína N ao ligar-se a uma proteína quinase reguladora da transcrição da transcrição de RNA (*dsRNA – activated protein kinase*) (19)

Figura 3 - Estrutura da proteína N conjugada com RNA viral (destacada pela seta), formando o completo N-RNA. Adaptado de Tawar, 2009 (20)



A fosfoproteína (P), codificada pelo gene P, possui 241 AA e é um componente essencial para a transcrição e replicação viral. A sua função consiste no recrutamento de proteína N para genomas e anti-genomas, formando o complexo N-RNA (14), além de também recrutar e posicionar a polimerase para iniciar a transcrição e replicação do genoma viral (12,21).

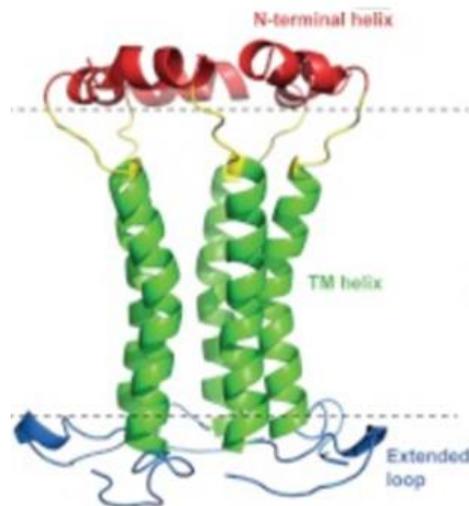
O gene M codifica a proteína de Matriz que possui 256 AA. Ao início da infecção essa proteína é encontrada no núcleo celular e no final é encontrada no citoplasma. Sua função no núcleo ainda é desconhecida (22) entretanto no citoplasma, a proteína tem a função de ordenar a montagem viral e seu brotamento. Um estudo da estrutura da proteína M descrito por Money e colaboradores em 2009 mostrou, por cristalografia, sítios de polaridade positiva na proteína que pode ter a função de associar o nucleocapsídeo à membrana celular (23).

O gene SH (*Small Hidrofobic*) traduz uma proteína de superfície ancorada ao envelope viral de 64 a 65 AA (dependendo do subtipo viral) sendo 27 desses hidrofóbicos. Essa proteína possui sua porção C-terminal localizada na porção extracelular e alto grau de N-glicosilação. Existem quatro variantes dessa proteína de acordo com o grau de glicosilação: SH₀, SH₉, SH₆ e SH₁. A variante SH₁ é uma variante da SH₀ com início de tradução no segundo códon AUG (14). A completa função da proteína é desconhecida, mas já foi associada a fusão do

envelope viral e inibição da apoptose celular (24,25). Utilizando o método de cristalografia, foi atribuída uma função de viroporina devido sua forma de canal iônico (Figura 4), alterando a permeabilidade celular (26).

Figura 4: Estrutura conformacional da proteína SH. Destaca-se seu formato cilíndrico.

Fonte: Gan, 2012 (26)

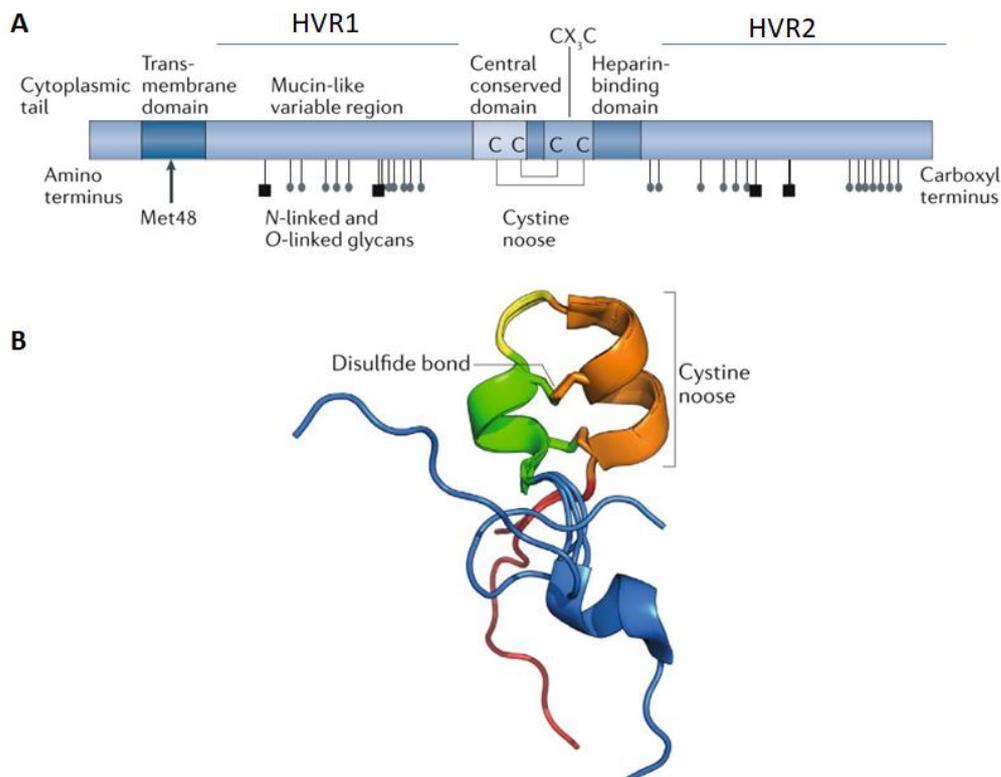


A proteína G é uma glicoproteína de superfície tipo II de aproximadamente 296 AA, variando de acordo com o subtipo viral (14). Ela é dividida em três domínios: citoplasmático, transmembrânico e extracelular. O domínio citoplasmático e transmembrânico são relativamente conservados entre os subtipos e se estendem do AA 1–38 e 39–66 respectivamente. O domínio extracelular por sua vez se estende do AA 67 ao 300 e é altamente variável com exceção de uma região conservada compreendida entre os AA 164 a 198, sendo os primeiros 13 AA (164 a 176) estritamente conservados entre todos os subtipos do HRSV (27).

A região conservada é situada entre duas regiões variáveis (HVR1 e HVR2) e é composta por quatro cisteínas (Cys173, Cys176, Cys182 e Cys186) ligadas na conformação 1-4 e 2-3, por ligações de dissulfeto formando um *loop* (Figura 5A e 5B) As duas últimas cisteínas, Cys 182 e 186 formam um motif CX3C semelhante a fractalkina (CX3CL1) (28). Acredita-se que o motif CX3C seja responsável pela adesão celular utilizando o mesmo receptor ligante a fractalkina (CX3CR1), porém um estudo realizado por Jones e colaboradores em 2018 (29) mostrou uma diferença entre as disposições das ligações de dissulfeto

presentes na fractalkina e a proteína G, sugerindo que outro receptor pode estar envolvido.

Figura 5 - A: Organização genômica da proteína G. Observa-se a região conservada ao lado da região ligante a heparina intercalada por duas regiões Mucin-like, HVR 1 e HVR2. A organização das pontes de sulfeto entre as cisteínas 1-4 e 2-3 também é observada, assim como o sítio CX₃C entre as duas últimas cisteínas. **B:** Estrutura da região conservada, observa-se o *loop* gerado pelas ligações de cisteína. Adaptado de Battles, 2019 (12)



Além disso, a região compreendida entre os AA 184 a 198 é uma região ligante a heparina (*Heparin Biding Domain* – HBD) composta por aminoácidos carregados positivamente mediadores da adesão com sulfato de heparina e outros glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na membrana celular (30). A HBD facilita a adesão do HRSV em células imortalizadas, porém sua função não é tão clara em células do trato respiratório, uma vez que estas possuem baixa expressão de GAGs em sua membrana celular (31)

A proteína G é a mais variável do HRSV, divergindo em até 47% entre os subtipos A e B e até 20% entre variações do mesmo subtipo. A divergência da proteína G, no mesmo subtipo viral, classifica o HRSVA e B em diferentes genótipos, essa classificação é realizada pela análise da HVR2. Os genótipos do

HRSV descritos hoje são GA1 a GA7 (32,33), SAA1 (34), NA1 a NA4 (35,36) e ON1 (37) para o HRSV-A e GB1 a GB4 (32), SAB1 a SAB3 (34), URU1 e URU2 (38) e BA1 a BA14 (39–43) para o HRSVB.

Uma característica da proteína G é a sua flexibilidade permitindo uma alta variabilidade de aminoácidos sem perda de função, assim como deleções e inserções. Em 1999, o genótipo BA foi descrito pela primeira vez, apresentando uma duplicação de 60nt na porção C-terminal da HVR2 (37). Em 2010, Eshaghi e colaboradores descreveram pela primeira vez em Ontário o genótipo ON1 com uma duplicação de 72nt também na porção C-terminal da HVR2 (37). Desde 2014, esses dois genótipos são predominantes na população, com raras publicações demonstrando a co-circulação com outros genótipos. No Brasil, o genótipo ON1 e BA9 foram relatados como predominantes desde esta mesma época (44). A alta plasticidade da proteína G facilita ao vírus um escape imunológico e garante sua re-infecção e estudos atribuem essa característica ao sucesso evolutivo dos genótipos contendo duplicações (14).

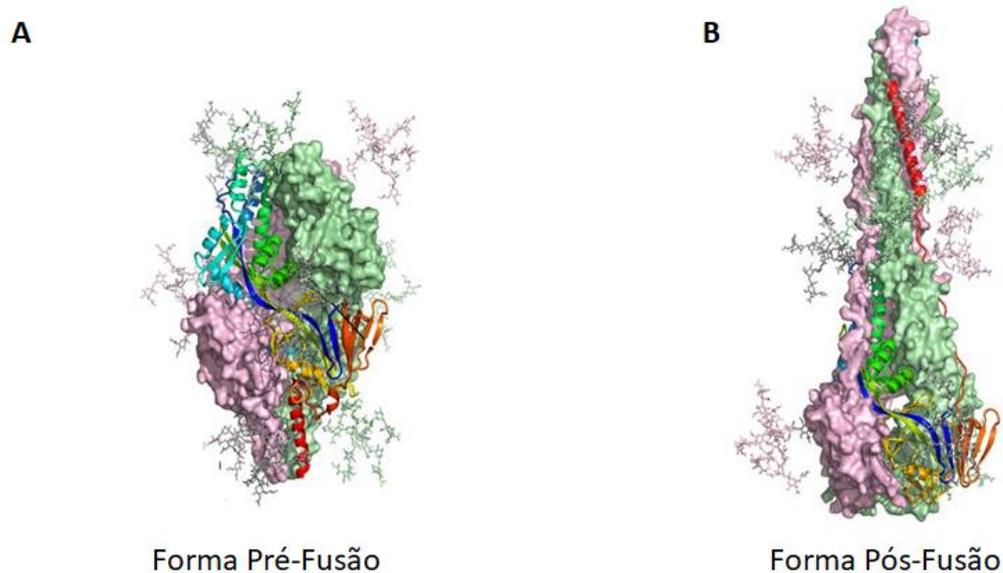
A proteína G pode ser apresentada de duas formas, sendo uma glicoproteína de superfície ancorada ao envelope e uma forma solúvel (sG). A sua forma solúvel, se deve a um códon AUG alternativo no início de sua síntese (45), como visto na forma variante SHt da proteína Hidrofóbica SH. Esse códon se localiza na porção transmembrânica da proteína G (Met48), gerando uma proteína de tamanho menor (aproximadamente 240 AA) que é secretada ao meio. A função da forma solúvel não é completamente entendida, mas já foi demonstrado como um agente de evasão imunológica, diminuindo a resposta antiviral na célula infectada (46,47).

O gene F codifica a proteína responsável pela fusão celular e consequentemente a formação de sincícios das células infectadas (14) Ela possui 575 AA que são primeiro codificados em um precursor inativo F0. Esse precursor possui um sítio de clivagem de 27 AA (região N-terminal). A clivagem do precursor gera uma proteína com duas porções ligadas por duas pontes de dissulfeto denominadas F2 (AA 1 – 130) e F1 (AA 136 – 574), sendo a primeira localizada na região C-terminal e a segunda na N-terminal (48,49)

A proteína F sofre uma alteração estrutural não reversível após o contato com receptores celulares e fusão celular, podendo ser então encontrada em duas formas: pré-fusão e pós-fusão, vista pelo alongamento da haste estrutural

junto a inserção de peptídeos na membrana celular(12,49) (Figura 6). O papel da mudança conformacional não está claro.

Figura 6 - Conformação estrutural da proteína F nas fases de pré - fusão do envelope viral **(A)** e pós - fusão **(B)**. Adaptado de: McLellan, 2013 (50)



Em relação a proteína G, a proteína F é conservada, chegando a 90% de similaridade entre os subtipos HRSVA e B (50). Pela sua característica conservada, a proteína se tornou o principal alvo de estratégias de prevenção da infecção, como ao exemplo temos o monoclonal humanizado, denominado de Palivizumabee. Após a descrição da mudança conformacional da proteína, novos monoclonais específicos entraram em desenvolvimento (51).

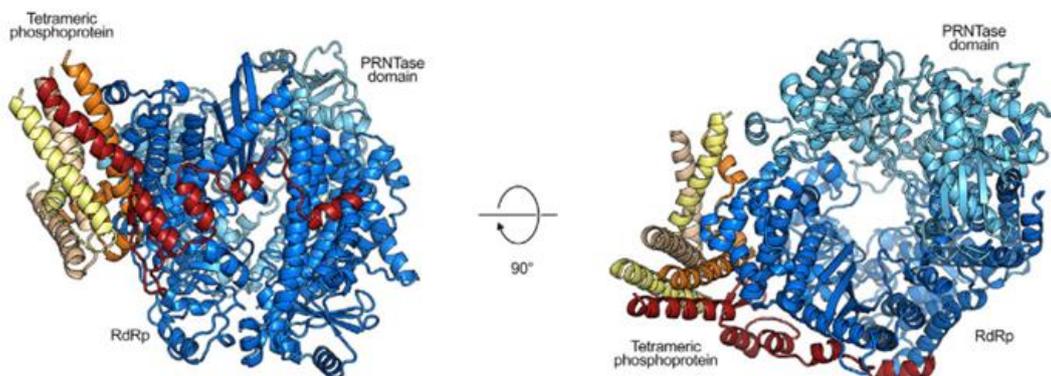
O gene M2 codifica duas proteínas: uma estrutural, M2-1 (Figura 7), e uma não estrutural, M2-2. Estas proteínas possuem 194 e 90 AA respectivamente. A proteína M2-1 interage com as proteínas N, P e L prevenindo a terminação precoce do genoma viral atuando como um fator de transcrição(14,52). A proteína M2-2 é transcrita pelo mesmo genoma mas em uma diferente ORF(2,14). Seu papel não está completamente elucidado, porém sabe-se do seu potencial inibitório de replicação viral quando ela é expressa em grandes quantidades (53)

Figura 7 - Conformação estrutural da proteína M2-1. Fonte: Tanner, 2014 (54)



A proteína L refere-se a polimerase viral (Figura 8) e é transcrita pelo gene L com 2165 AA, sendo essa a maior proteína deste vírus. Esse gene se sobrepõe ao gene M2 em um fragmento de 68 nt (15). Ainda não se sabe como a transcrição desse gene ocorre, visto a presença do domínio de iniciação GS ainda no gene M2.

Figura 8 - Conformação estrutural da proteína L. Fonte: Gilman, 2019 (55)



Essa proteína possui seis regiões conservadas numeradas de I a VI comuns entre vírus de RNA de polaridade negativa. Sua função é principalmente

polimerização do genoma viral durante a replicação e transcrição, mas também é associada a metilação, *capping* e poliadenilação (56,57).

1.4 Replicação

O processo de infecção e replicação viral se inicia na interação do vírus com células epiteliais ciliadas do trato respiratório superior (2,10,12,14,58)

. A adesão se inicia pelo contato da glicoproteína de superfície G na porção CX3C ao receptor de membrana CX3CR ou a interação de glicosaminoglicanos de superfície celular ao domínio de ligação de Heparina HBD. A fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática ocorre logo depois, através do receptor nucleolína. Após a interação com o receptor a proteína F altera sua morfologia de pré para pós fusão. O nucleocapsídeo viral, então é liberado no citoplasma da célula hospedeira. (12,29,58)

O genoma viral tem sua transcrição iniciada pela interação da polimerase viral à região *leader* na porção 3'. A região *Trailer* também interage com a polimerase e é sintetizado o anti-genoma, uma molécula de RNA complementar ao RNA viral, no sentido 5' – 3', que atua como molde para replicação do RNA viral.(59)

A proteína N interage primeiramente com o RNA genômico (formando complexo N-RNA) e posteriormente é associado às proteínas P e L e inicia a formação do capsídeo viral. As glicoproteínas de superfície são sintetizadas no Retículo Endoplasmático e processadas do complexo golgiense onde são glicosiladas. Estas são então transportadas para membrana celular onde são ancoradas. A proteína M sintetizada é acumulada na porção interna da membrana celular e ao entrar em contato com o cápsídeo, ocorre o brotamento da partícula viral levando a membrana celular com as glicoproteínas de superfície, como envelope do vírus (Figura 9 e 10).(14,59)

Figura 9 - Ciclo de replicação do HRSV. **1 e 2:** início da infecção da célula viral pela adesão realizada pela proteína G mediada por pelo receptor Cx3CR1 e GAG's de superfície, seguida pela fusão viral mediada pela proteína F em interação com a nucleolina de superfície. A fusão do envelope viral pode ser realizada no endossoma se a infecção por mediada por endocitose ou diretamente pela membrana celular. **3.** A replicação das proteínas virais ocorrem no citoplasma a partir da transcrição direta do RNA viral. Um complexo formado pela proteína N e o RNA viral interagem com as proteínas P e L para a transcrição de proteínas. Uma fita complementar ao RNA viral é sintetizada (antigenoma) para replicar o RNA viral. **4:** As proteínas G, F e SH são levadas à superfície celular onde há depósito da proteína M e se ancoram na membrana. O nucleocapsídeo viral entra em contato com a proteína M e inicia o bortamento viral. Adaptado de Battles, 2019 (12).

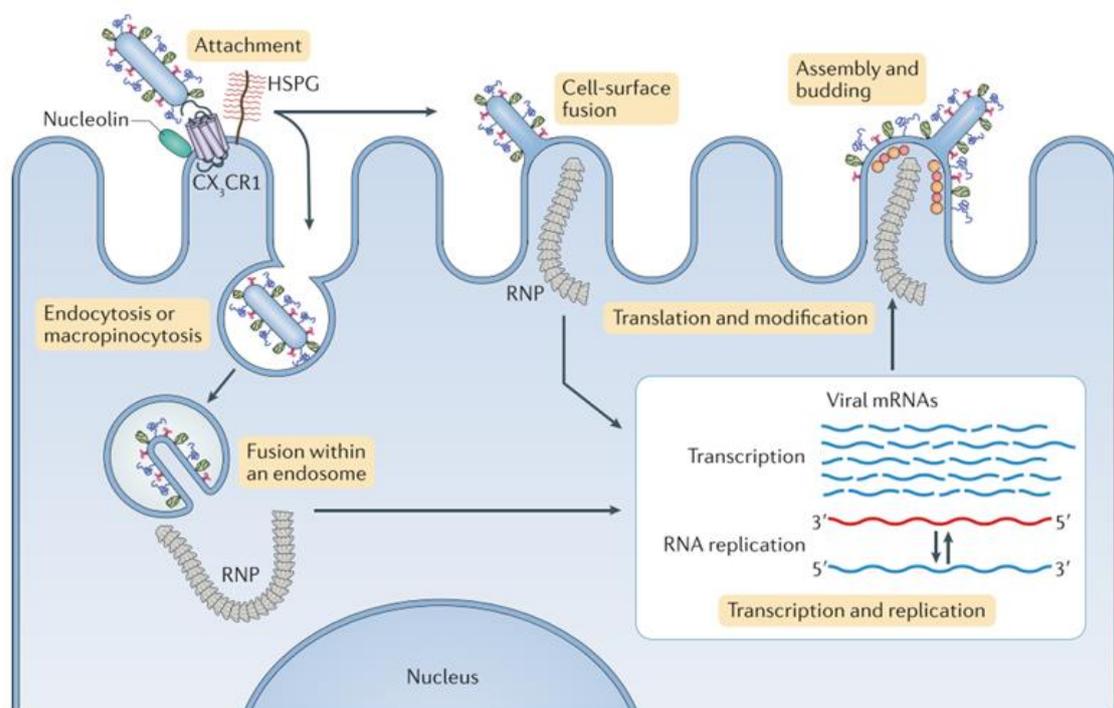
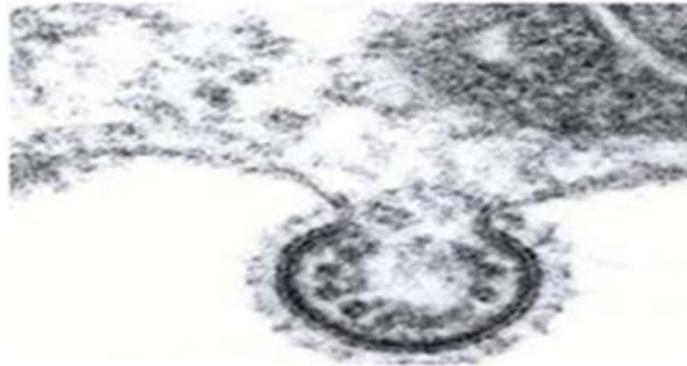


Figura 10 - Brotamento do HRSV, demonstrado por micrografia eletrônica.
Fonte: Garofalo, 2013 (60)



1.5 Aspectos Clínicos

O HRSV pode ser o vírus mais infeccioso do mundo com 100% dos indivíduos infectados até 2 anos de idade e 50% destes apresentam pelo menos uma re-infecção no mesmo período da vida (11)

A infecção ocorre a partir do contato com secreções via aerossol ou fômites contaminadas. O período de incubação do HRSV varia de 3 a 5 dias com o desaparecimento dos sintomas normalmente em 7 dias mas podendo se estender a 14 dias de acordo com os aspectos clínicos do paciente (61)

O vírus é o principal causador de doença infecciosa da trato respiratórias superiores (ITRS), apresentando sintomas de tosse, espirro, rinorreia e febre. Em grupos de risco incluindo cardiopatas, imunossuprimidos, prematuros, portadores de Síndrome de Down, portadores de má formação congênita, portadores de fibrose cística e transplantados, a infecção por HRSV pode evoluir para doença mais grave, tais como pneumonia, ao infectar células do trato respiratório inferior (ITRI) (62)

A ITRI é o principal motivo de hospitalização pelo HRSV, chegando até a 1.7 milhões de hospitalizações por ano.(11) O vírus infecta o epitélio bronquiolar

gerando inflamação e formação de muco, obstruindo as vias respiratórias e levando a um quadro de hipóxia e necrose do epitélio. O quadro de ITRI causado por HRSV já foi associado com morbidades futuras como desenvolvimento de asma em mais de 70% dos pacientes que apresentaram quadro de bronquiolite por infecção do HRSV no primeiro ano de vida (63)

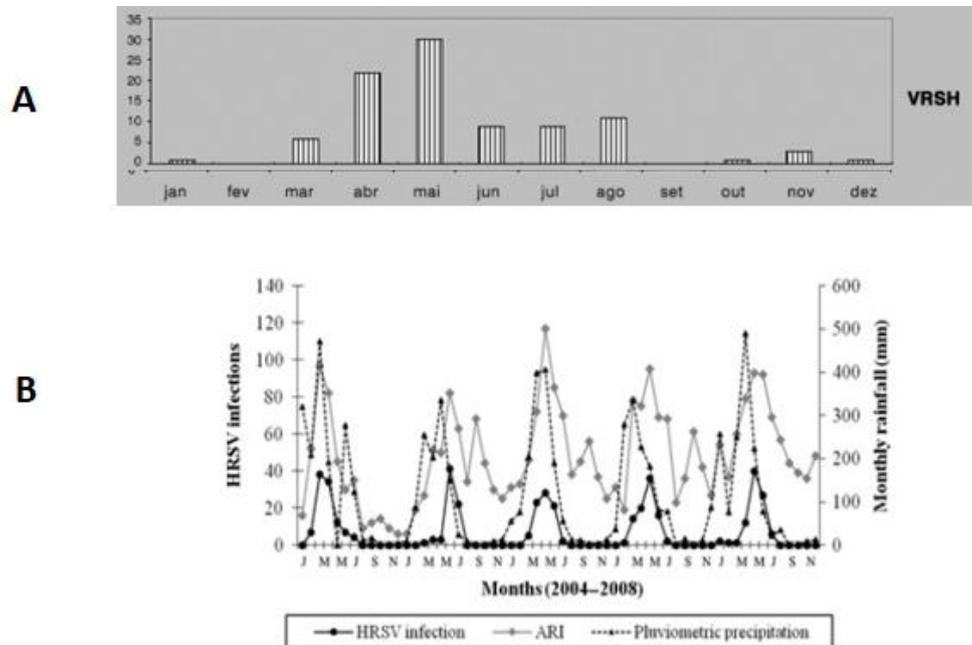
Em adultos, o HRSV causa infecções mais leves, muitas vezes assintomáticas, podendo levar a quadros de resfriado com rinorreia, cefaleia, tosse e irritação das vias respiratórias superiores. Em idosos, a infecção pode levar a quadros de pneumonia importantes (64)

1.6 Sazonalidade

O HRSV possui uma sazonalidade bem definida, circulando durante o ano todo mas com pico no número de casos do início do outono até início do inverno nos dois hemisférios do globo, mais precisamente entre Maio e Julho no hemisfério Sul, e Outubro a Janeiro no hemisfério Norte, coincidindo com o Período de inverno (Gráfico 1A) (65)

Um estudo realizado no nordeste do Brasil acompanhou a circulação viral durante quatro anos e mostrou como o HRSV mantém a sazonalidade em regiões mais próximas ao equador, acompanhando as estações com maior volume pluviométrico (Gráfico 1B) (66)

Gráfico 1 - Representação sazonal do HRSV no Brasil. **A:** sazonalidade do HRSV na cidade de São Paulo. Observa-se uma sazonalidade característica do hemisfério Sul com maior número de infecções durante o Outono. **B:** Sazonalidade na cidade de Fortaleza, observa-se acompanhamento de casos de infecções com o índice pluviométrico. fontes: Thomazelli, 2002 (65) e Moura, 2013. (66)



1.7 Diagnóstico

O diagnóstico do HRSV pode ser realizado de duas maneiras: direta e indireta. A maneira direta inclui técnicas de detecção de antígenos (Ag) ou ácido nucleico viral e compreende ensaios de imunofluorescência (IF), testes rápidos de imunofluorescência para detecção de Ag e técnicas de biologia molecular como RT-PCR e Real-time RT-PCR (atual padrão ouro) (67) As técnicas indiretas incluem testes sorológicos (ELISA), testes rápidos de imunofluorescência para detecção de anticorpos (IgG e/ou IgM), Western Blot e cultura celular.(68,69)

Os ensaios de imunofluorescência tem vantagem em relação as técnicas de PCR devido a sua rapidez e valor, porém necessitam de uma quantidade viral alta e podem ser subjetivos ao analista. As técnicas de PCR são mais sensíveis a presença viral porém são mais demoradas e com maior custo. Em ambos os casos, amostras de aspirados de nasofaringe (ANF), secreções respiratórias e swab traqueal são as amostras clínicas mais usadas para detecção direta do HRSV. (68)

A Imunofluorescência (IF) é uma técnica que consiste na capacidade de um anticorpo (Ac) se ligar a fluorocromos (substâncias que emitem fluorescência) sem perder a capacidade de se ligar ao antígeno (Ag). A junção do Ac com o fluorocromos é chamada de conjugado. A IFD é utilizada na pesquisa de antígenos, onde o conjugado se fixará aos Ag's presentes emitindo assim a fluorescência (figura 11). (70)

A IFI é utilizada tanto na pesquisa de Ag quanto na pesquisa de Ac. É adicionado um conjugado que se ligará ao Ac após esse já ter entrado em contato com o Ag (figura 8). Na figura 9 pode-se observar um resultado positivo e negativo para o HRSV. (70)

Figura 11 - Representação do teste direto de imunofluorescência. Fonte: FERREIRA, 2011. (70)

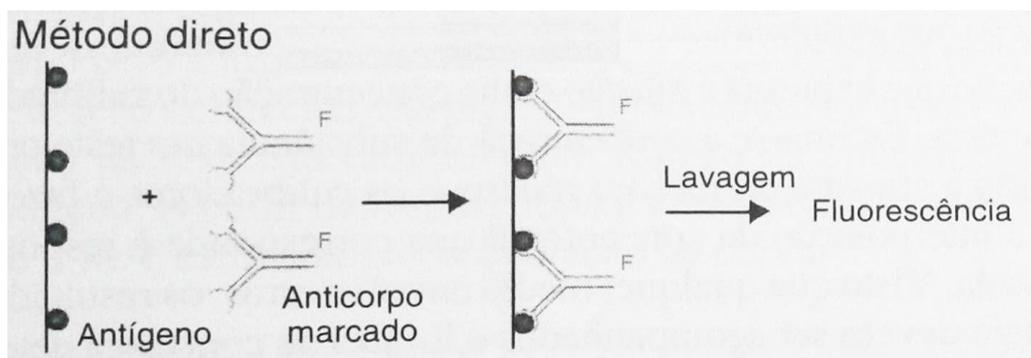


Figura 12 - Representação do teste indireto de imunofluorescência. Fonte: FERREIRA, 2011(70)

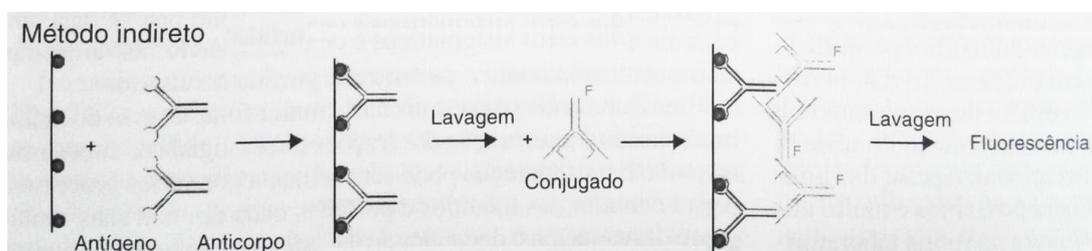
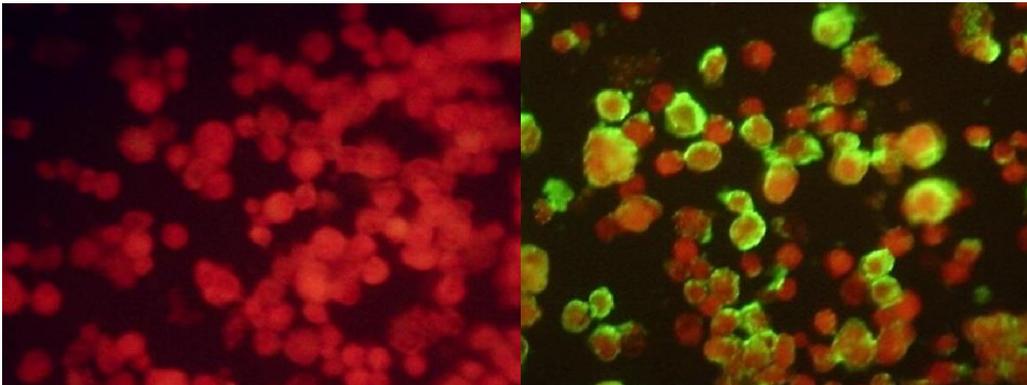


Figura 13 - Ilustração de um resultado de IFI para o HRSV. Legenda: Esquerda: negativo; direita: positivo. Fonte: Thomazelli *et al.*, 2004.(71)



1.8 Profilaxia e tratamento

A primeira tentativa de uma profilaxia contra o HRSV foi o desenvolvimento de uma vacina em 1967. A vacina era composta por vírus atenuado por formalina, e os resultados obtidos não foram satisfatórios, com infecções por HRSV mais graves no grupo vacinado (9)

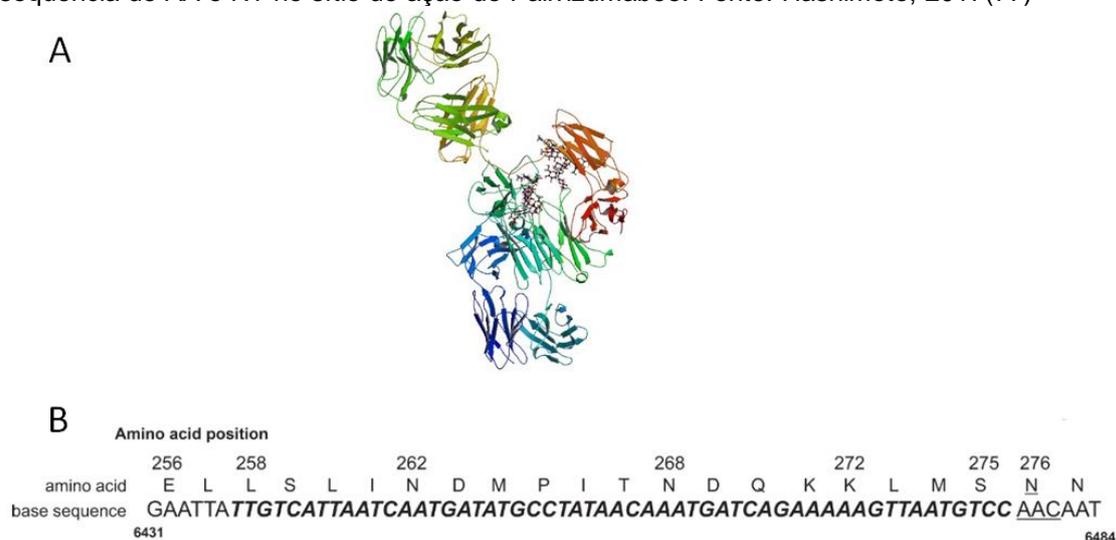
Ainda não há vacina disponível para o HRSV, mas diversos estudos estão em desenvolvimento e muitos candidatos já se encontram em testes clínicos. A maior dificuldade encontrada é a falta de imunidade a longo prazo devido a escapes das proteínas virais mais imunogênicas (G e F) e ainda a falta de total compreensão da resposta imunológica perante a infecção (51)

Dentre os tipos de profilaxias, se encontram em fases de teste clínico vacinas atenuadas ou quiméricas, vetoriais, de subunidades e nanopartículas. Além disso, novos monoclonais também estão em fase clínica (72–74)

A única medida profilática e de tratamento disponível é o monoclonal (MAb) Palivizumabe (Synagis) (75), aprovado desde 1998 pelo *Food and Drug Administration* adotado pelo Brasil (São Paulo) em 2007 mas com aprovação da ANVISA em 1999. (76)

O Palivizumabe é um anticorpo monoclonal Humanizado desenvolvido para inibir a fusão do vírus com a célula alvo, aderindo-se a proteína F na porção F1 nos aminoácidos 258 a 275 (77) (Figura 14). A aplicação de Palivizumabe chegou a diminuir em mais de 50% o número de hospitalizações no Mundo (78).

Figura 14 – A: Representação estrutural do Mab Palivizumabe. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00110>> **B: Figura 11 –** Esquema representativo da sequencia de AA e NT no sítio de ação do Palivizumabee. Fonte: Hashimoto, 2017(77)



Seu uso baseia-se em até cinco aplicações em pacientes pediátricos (uma por mês) inclusas no grupo de risco segundo critério da Secretaria de Saúde, ou seja, crianças prematuras (28 semanas) com até um ano de idade, crianças com até dois anos portadoras de má formações congênitas, doenças pulmonares crônicas, doentes cardíacos e transplantados. A aplicação pode ser feita como profilaxia ou tratamento (79)

A aplicação profilática é conduzida nos meses anteriores à sazonalidade do HRSV. Sendo estabelecido pela secretaria de saúde (2018) os meses de Fevereiro a Julho para a aplicação profilática do MAb para as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, Janeiro a Junho para a região Norte e Março a Agosto para o Sul.(79)

O uso do Palivizumabe é de alto custo, chegando a US\$ 900,00 cada 100mg. No Brasil, estudos recentes mostram que a cobertura é pequena, porém eficaz, sendo o principal problema falhas na aplicação de pelo menos uma dose do monoclonal, aumentando a hospitalização em 29% dos casos. (76)

O uso contínuo do Palivizumabe pode gerar seleção de cepas mutantes como já foi descrito por Crowe *et al* (80) . Até agora, oito substituições de AA da proteína F na região ligante ao Palivizumabe já foram reportadas, sendo elas

Asn262Asp, Asn268Ile, Lys272Asn/Glu/Met/Thr/Gln, Ser275/Phe/Leu e Asn276Ser. Dessas mutações, foram encontradas somente em isolados de cultura celular Asn268Ile e Lys272Asn/Thr (80–86)

A mutação Asn276Ser ocorre somente no subtipo A, uma vez que o AA Asn272 é natural no subtipo B selvagem. Foi concluído que a substituição do AA adjacente ao sítio de ligação do Palivizumabe, Asn276Ser, sozinha não é capaz de gerar resistência, porém o vírus se torna resistente quando essa mutação Lys272Glu(87)

Essa mutação já foi descrita como dominante no Canadá durante 2010 e hoje é prevalente em todos os vírus do subtipo A (84). O motivo dessa prevalência ainda não foi elucidado. No Brasil, não há nenhum estudo recente monitorando a circulação de HRSV resistentes.

2. Justificativa e relevância do trabalho.

As estratégias terapêuticas e preventivas disponíveis hoje em dia contra os vírus respiratórios ainda são muito limitadas. A imunização passiva com anticorpo monoclonal contra o HRSV (Palivizumabe) podem ajudar a reduzir as infecções pelo vírus, bem como causar uma redução significativa na morbidade desta doença. Porém, tem sido demonstrado que o PVZ por ter um custo muito elevado no Brasil, passa a ser inacessível na maior parte da população de alto risco deste País.

Crianças com doenças ou fatores de risco subjacente, com ênfase naqueles com história de parto prematuro, cardiopatia congênita e doença pulmonar, estão em maior risco de desfechos desfavoráveis quando infectado com um vírus respiratório. Por isso, a maioria dos medicamentos preventivos e de tratamento disponíveis são dirigidos para esta população especial, embora a maioria destas estratégias têm custo elevado e / ou eficácia limitada. A vigilância ativa de pesquisa de vírus e associada a um planejamento de sazonalidade da circulação desses vírus acessíveis para definição etiológica das síndromes respiratórias pode levar a um uso mais racional dessas estratégias.

Infelizmente no Brasil, ainda existe uma sub-utilização da profilaxia já disponível para os vírus RSV na população pediátrica. Vários estudos têm demonstrado uma redução em taxas de hospitalização e mortalidade em pacientes de alto risco que receberam profilaxia passiva contra a infecção por RSV. Nos últimos cinco anos, houve uma extensão nos critérios de inclusão desta profilaxia no Brasil, com grandes mudanças em a partir de 2014. O Palivizumabe foi incorporado como um programa nacional e não se limita mais a apenas uma minoria dos estados brasileiros. Essa mudança, tem resultado na melhoria do sistema de vigilância de vírus respiratório em todo o país. Nosso estudo vem exatamente de encontro com a necessidade de um melhor monitoramento das cepas de HRSV circulantes em pacientes pediátricos, nessa era pós imunização e tratamento, com um enfoque de avaliação do perfil de resistência `a prevenção existentes para que não sejamos surpreendidos por um uso inadequado dessas estratégias antivirais, acarretando num aumento significativo de cepas resistentes ao únicos tratamentos antivirais existentes em nosso meio para o HRSV.

Uma análise epidemiológica molecular mostra-se necessária para melhor entendimento evolutivo do vírus. Além disso, uma análise molecular do sítio de ação da única medida profilática disponível é necessária para avaliar sua efetividade.

3. Objetivos

- Determinar os genótipos do HRSV circulantes na população pediátrica, através do sequenciamento do gene que codifica a glicoproteína de Adesão (G) do vírus.
- Utilizando-se da técnica de Pirosequenciamento, objetivamos estudar as mudanças evolutivas na proteína F, porção parcial F1 (262 a 276 AA), do HRSV, particularmente mutações de potencial resistência nos epítomos de ligação do Palivizumabee (Asn262Asp, Asn268Ile, Lys272Asn/Glu/Met/Thr/Gln, Ser275/Phe/Leu para os dois tipos de RSV e Asn276Ser para o RSV-A em amostras provenientes de pacientes pediátricos que podem ter feito ou não, uso do monoclonal humanizado.

4. Metodologia

4.1 Casuística

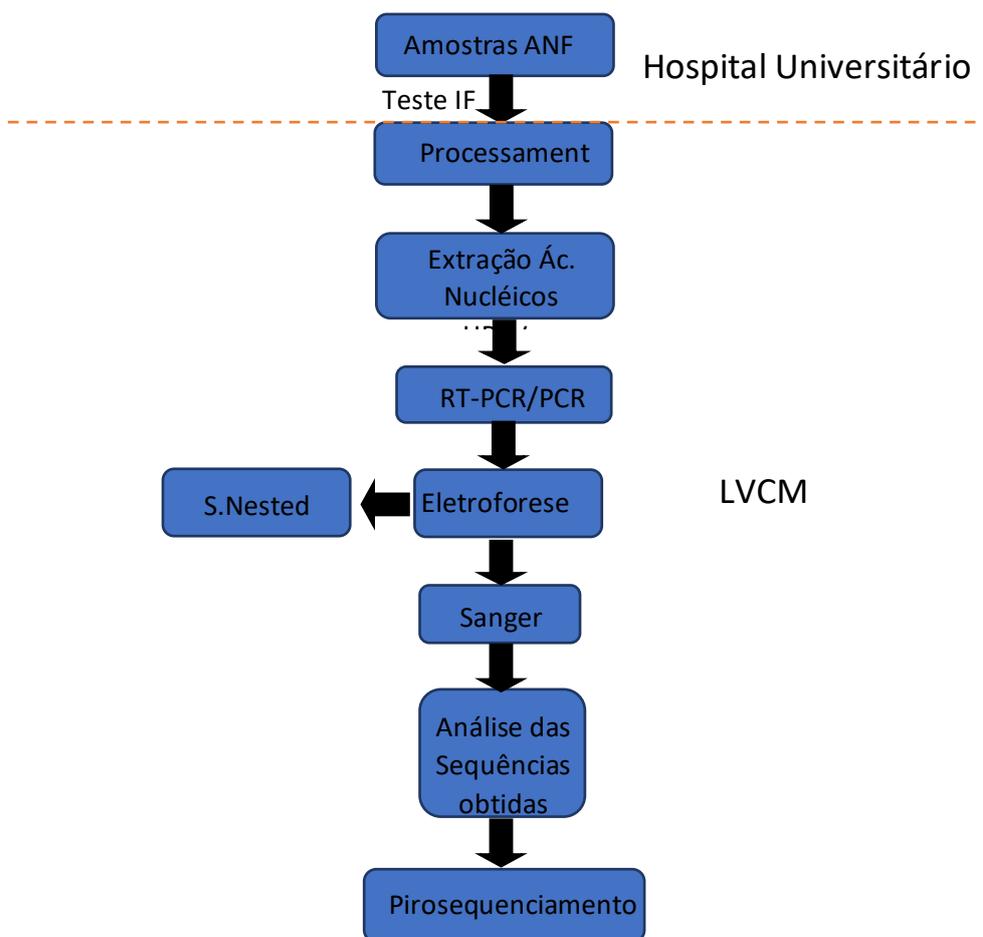
Amostras de Aspirado de nasofaringe (ANF) coletadas de 3.038 pacientes pediátricos que foram atendidos no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), de 1 de janeiro de 2017 a agosto de 2019, apresentando quadro de Infecção do trato Respiratório Inferior e/ou superior, foram previamente testadas, no Laboratório Clínico do HU, por IFD para os principais patógenos respiratório, tais como: Adenovírus, Influenza A e B, Parainfluenza 1 e 3, Metapneumovírus e HRSV utilizando o Light Diagnostic™ Respiratory Panel Viral Screening and identification IFA kit (Millipore UK Ltda) seguindo as instruções do fabricante.

Todas as amostras (positivas ou negativas) foram transportadas refrigeradas (4 °C) ao Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM) onde até 2mL do volume da amostra foi transferido em até 2h para um criotubo (SARSTEDT AG & Co. KG) devidamente identificado. Após o processamento, os criotubos são congelados em Nitrogênio Líquido, e armazenados em caixas de papelão em freezer a -80°C até o uso. Esse projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob o número CAAE 74683917.1.0000.5467

4.2 Fluxo de trabalho

Para realizar esse trabalho, as atividades experimentais propostas foram feitas na ordem temporal descrita pelo fluxograma da figura 15.

Figura 15 - Fluxo de trabalho utilizado para a elaboração desse trabalho. A linha pontilhada marca a divisória das atividades realizadas no Hospital Universitário e no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM)



4.3 Extração do ácido nucléico total (RNA e DNA)

Os ácidos nucléicos totais das amostras positivas para HRSV por IF foram extraídos de modo semi automatizado utilizando o extrator *EasyMag* com o *Nuclisens® Iso Kit (BioMerieux – Lyon, France)*. Onde, resumidamente, trezentos microlitros da amostra foram transferidos a um *vessel* e adicionado 700uL de buffer de Lise celular (Lysis Buffer) e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente (T.A) (método *off board*). Trinta microlitros de sílica magnética (*Beads*) foram adicionados ao mix e posteriormente a mistura foi levada ao equipamento. A extração seguiu com uma série de lavagens para retirada de macro e micromoléculas presentes na amostra (*Washing Buffer 1 e Washing Buffer 2*) e por fim o ácido nucléico total foi eluído em 100 µL de buffer de eluição (Elution Buffer 3) e transferido para um tubo de 0,6 mL, armazenado em freezer -80°C até o uso.

4.4 Amplificação do Ácido Nucleico

A obtenção do DNA complementar (cDNA) se realizou a partir da reação de transcriptase reversa (RT- PCR) com o kit High – Capacity (Applied Biosystems – Califórni) seguindo as instruções do fabricante. Onde, 10uL do material extraído foram diluídos em uma solução contendo tampão para RT [10x], Random Primers [10x], dNTP mix [100mM], Rnase Inhibitor [40U] Multiscribe Reverse Transcriptase [50U] e água UltraPure Gibco® para completar o volume de 20 µL. A reação ocorreu no termociclador Veriti (Applied Biosystems – California) seguindo a ciclagem de 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos. O cDNA obtido foi amplificado em seguida ou armazenado a -80°C.

A amplificação parcial da proteína G ocorreu a partir de uma reação de PCR com primers modificados de Sanz *et al.* (88) e Zheng *et al.* (89) (GR5+ e FV-, respectivamente) e uma reação de Semi-Nested PCR com os primers GAB+ (33)e FV-. A PCR teve como alvo toda região codificadora da porção citoplasmática da proteína G e os primeiros 180 nucleotídeos da proteína F, gerando um fragmento de aproximadamente 1009 pb. A Semi-nested ocorreu com a finalidade de amplificar a segunda região hipervariável da proteína G, e gerou um fragmento de aproximadamente 656 pb (Tabela 1)

A PCR foi conduzida com o kit Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), onde 5 µL do cDNA obtido na etapa anterior foi diluído em solução tampão (10x PCR Buffer), MgCl₂ [12,5mM], dNTP [5pM], 10 pM de cada primer (GR5+ e FV-), 2 U de Platinum *Taq* DNA Polimerase e água UltraPure Gibco® para completar o volume de 25 µL.

A reação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems) seguindo a ciclagem: 95°C por 1 minuto (desnaturação inicial), seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 52°C por 45 segundos (pareamento dos primers) e 72°C por 1 minuto (extensão da fita de DNA). Após os ciclos, manteve-se a temperatura de 72°C por 5 minutos (extensão final) e em seguida 4°C até a retirada das amostras do equipamento.

A Semi Nested PCR teve como alvo a amplificação da porção hipervariável da proteína G, e utilizou os primers GAB+ e FV-. O protocolo foi o mesmo da PCR, utilizando 3 µL do produto da PCR. A ciclagem diferenciou-se no tempo de extensão, modificado para 45 s devido a diferença de tamanho do fragmento alvo. A reação ocorreu no termociclador MiniAmp (Applied Biosystems) e toda manipulação dos produtos pós amplificados (PCR e Semi – Nested) se deu em uma sala separada, apenas para pós-amplificados.

Tabela 1 – Relação dos primers utilizados, suas respectivas sequências, gene alvo e métodos e referências

Primer	Sequência (5'-3')	Posição	Gene	Método	Referência
GR5 +	TGG-CAA-TGA-TAA-TCT-CAA-C	151 - 173	G	PCR/ Sequenciamento	Sanz <i>et al.</i> 1994
GAB +	CAY-TTY-GAA-GTG-TTC-AAY-TT	504 - 534	G	S.Nested/ Sequenciamento	Peret <i>et al.</i> 2000
FV -	GTT-ATR-ACA-CTR-GTA-TAC-CAA-CC	163 - 186	F	PCR/ Sequenciamento	Zheng <i>et al.</i> 1996

Para validação da PCR ou Semi-Nested, foi feito eletroforese em gel de Agarose (Invitrogen) a 1,5%. Utilizou-se TAE 50x (LGC – Biotecnologia) diluído

em [0,5x]. Dez microlitros do produto da PCR ou Semi-Nested, com 2 µl de brometo de etídio, foram corridos a 110V e 185mA por aproximadamente 1h.

4.5 Sequenciamento

As amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento pelo método de Sanger para genotipagem e ao Pirosequenciamento para detecção de mutantes de resistência ao Palivizumabe.

4.5.1 Sanger

As amostras que apresentaram banda na altura esperada de cada reação da PCR, tiveram 5 µL do produto amplificado, purificados com 2 µL de Exosap-IT (Applied Biosystems) e incubados no MiniAmp Thermocycler (Applied Biosystems) a 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos para remoção de primers e nucleotídeos não incorporados. Após a reação, o produto da PCR purificado foi acrescido de 5 µL de Água UltraPure Gibco®.

Foi utilizado o kit BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) para a marcação do produto amplificado por ddNTP's (reação de sequenciamento). Seis microlitros da PCR purificada foram acrescidos de 1µL do reagente BigDye Terminator V3.1, 3uL de de BigDye Sequencing Buffer e 1 µL de Primer a 3,2 µM. O mix foi incubado a 96°C por 1 minuto seguido de 40 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Foi utilizado o termociclador MiniAmp Thermocycler (Applied Biosystems).

A remoção dos nucleotídeos marcados não incorporados foi feita com o BigDye X-Terminator Purification kit (Applied Biosystems), onde, para cada amostra sequenciada, foram adicionados 10 µL de X-Terminator solution e 45 µL de tampão SAMS. O mix foi levado ao vortex digital IKA MS 3 a 3000 rpm por 30 minutos e em seguida centrifugado a 1000 rpm por 2 minutos pela centrífuga Eppendorf 5804 de acordo com as instruções do fabricante. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços de 0,2 mL e levados ao sequenciador ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems) para eletroforese em polímero POP-7 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram editadas com o Software SeqMan (DNASTAR). Foram formados *contigs* de aproximadamente 980 pb (PCR) e 620 pb (Semi Nested), cada sequência de nucleotídeos foi analisada pela ferramenta *Basic local Alignment Search Tool* (BLAST - NCBI) otimizado para procura de sequências altamente similares (megablast) para determinação do subtipo viral.

4.5.2 Alinhamento e Edição das amostras

O alinhamento das sequências obtidas pela PCR foi realizado no Software Alieview (90) pelo algoritmo Muscle a partir do primeiro códon da região conservada da proteína, sendo “CAC” (nt 490) correspondente a His164 ao códon de parada “TGA” (nt 970, AA324) no subtipo A e a partir do códon “CAT” (nt 484) correspondente a His162 ao códon de parada TAA (nt 931, AA 311) ou “TAG” (nt 952, AA 318) no subtipo B. A análise da segunda porção hipervariável se deu a partir do códon “AAA” correspondente a Lys212 no subtipo A e ao mesmo aminoácido na posição 207 no subtipo B

4.5.3 Análise Filogenética

Foi utilizado a segunda porção hipervariável (HVR2) da proteína G para a elaboração da árvore filogenética. Foi utilizado o método de verasemelhança no software MEGA 7.0 (91) com bootstrap de 1000 vezes para significado estatístico.

4.5.4 Pirosequenciamento

Para a procura de mutações SNP (*single nucleotide polymorfism*) conferentes de resistência ao Palivizumabe, foi utilizado o método de pirosequenciamento.

O ácido nucléico extraído das amostras subtipadas pela proteína G, foi amplificado com o kit PyroMark OneStep RT-PCR (Qiagen, Hilden, Germany) seguindo as instruções do fabricante utilizando primers específicos para amplificação da região ligante ao Palivizumabe na porção F1 da proteína F dos subtipos A e B (Tabela 2), produzindo fragmentos de 140 pb e 123 pb

respectivamente. Os primers “forward” de cada subtipo foram biotinilados na porção 5’ (92).

Tabela 2 - Primers utilizados no Pirosequenciamento, suas respectivas sequências e posições no gene F * indica primers biotinilados

Primer	Sequência (5'-3')	Posição	Gene	Referência
RSVA/fwd2*	TAA-CTA-CAC-CTG-TAA-GCA-C	721 - 749	F	
RSVA/rev2	ACA-TGA-TAG-AGT-AAC-TTT-GC	871 - 852	F	
RSVB/fwd3*	AGC-ACY-TAC-ATG-TTA-ACA-AAC	742 - 764	F	Oliveira <i>et al.</i> 2014
RSVB/rev3	TGA-TAG-AAT-AAC-TTT-GTT-GCC	865 - 845	F	

O produto da PCR foi misturado a pérolas de sepharose (GE) revestidas por estreptavidina em tampão do kit (Binding Buffer), que facilita a ligação da biotina dos primers na estreptavidina. Deste modo, o produto amplificado será facilmente manipulado, por imobilização das pérolas de sepharose na etapa de purificação realizada com o auxílio do Pyromark Vacuum Work Station (Qiagen, Hilden, Germany). Este produto purificado foi levado ao equipamento Pyrosequencing PyroMark Q24 (Qiagen, Hilden, Germany). A análise dos resultados foi realizada com o software Pyromark Q24 no modo de análise AQ, que identifica as mutações de SNP e quantifica a proporção das cepas variantes selvagens (WT) e/ou mutantes (MT) presentes nas amostras.

Foram procurados SNP's geradores das substituições: Asn262, Asn268Ile, Lys272Asn/Glu/Met/Thr/Gln, Ser275/Phe/Leu e Asn276Ser nas amostras do subtipo A e as mesmas nas amostras do subtipo B com exceção da substituição no AA276. O Cut-Off estabelecido de detecção de cada SNP mutante foi de $MT_{<12\%}$ como determinado por Oliveira *et al* (92).

A ordem de dispensação gerada pelo software para o subtipo A foi: 3' - CTAGTCTACTACTGACACTGACTGACATAGCTACGTTCTGATGCATGTATA GCATATCATCGCATCAGTGTACTGACTGACTCAC – 5' e para o subtipo B: 3' CTACTATCATGACATGCGTGACACTATGCGTCACGTTCTGATGCATGTATA GCATATCGATCGAT 5'

4.6 Modelagem

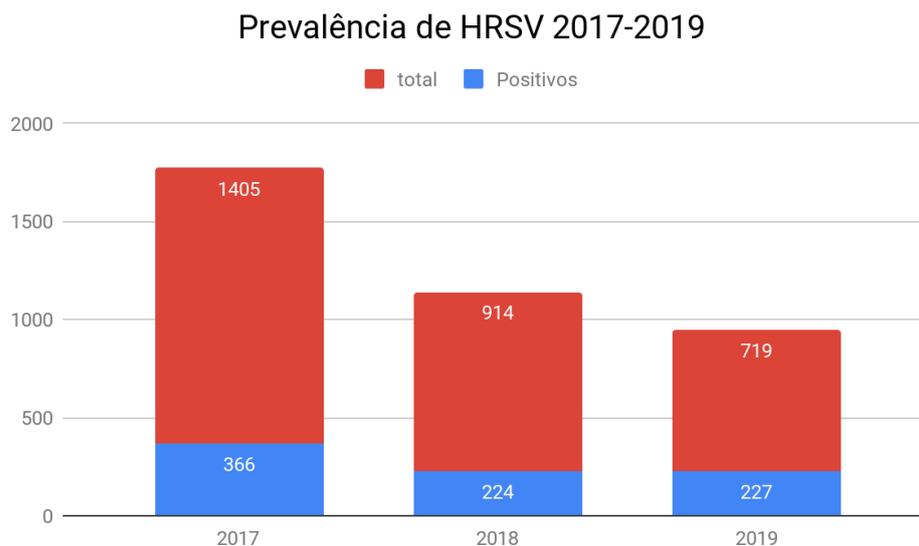
Um estudo estrutural da região conservada da proteína G foi realizado utilizando os programas de análise estrutural Swiss Model e I-Tasser, além do software PyMol. A análise foi feita a partir do modelo de PDB 6BLH que consiste na região conservada da proteína G conjugada com o anticorpo CB0017.5. Esse estudo foi realizado junto com o grupo da professora Andreia Balan do Laboratório de Estruturas de Proteínas.

5.Resultados

5.1 Amostragem

Foram obtidas um total de 3.038 amostras de Aspirado de Nasofaringe durante os 3 anos estudados com 26,9% (817) de positividade para HRSV pelo teste de IF. O maior número de amostras de ANF coletadas foi em 2017 com o total de 1405 (46,2%) e com 26% (366) positividade para HRSV neste ano. Em 2018 foram coletadas 914 (30,1%) amostras com 24,5% (224) de positividade. Em 2019, apesar do estudo ter ocorrido apenas de 01 de Janeiro a 19 de Agosto, 719 (23,7%) amostras foram coletadas e 31,5% (227) foram positivas para o vírus estudado (gráfico 2).

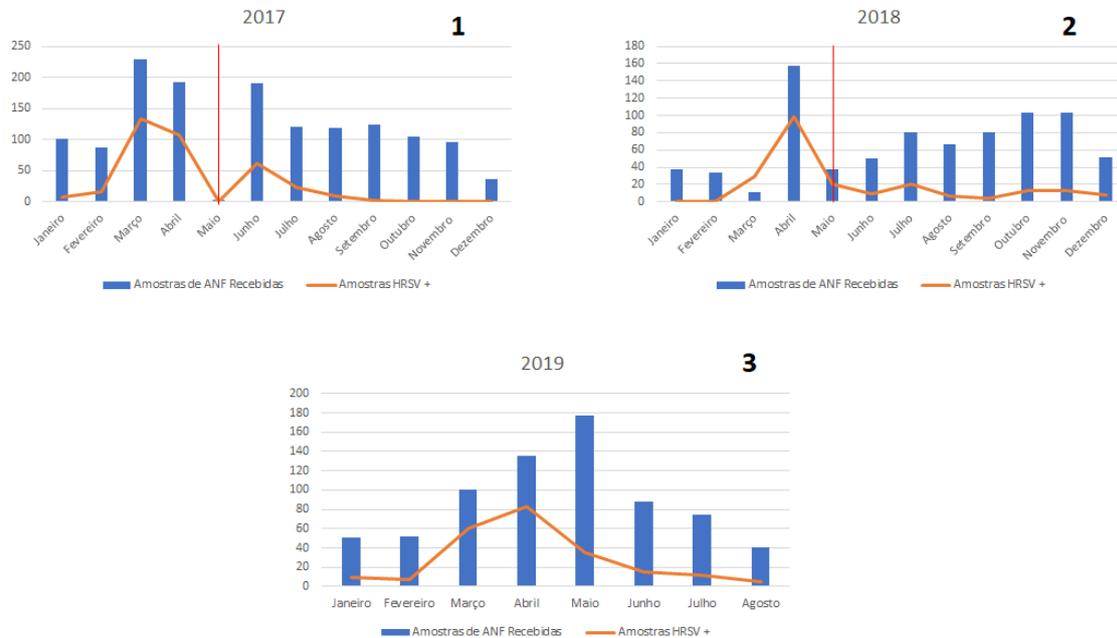
Gráfico 2 - Prevalência de HRSV em ANF de pacientes pediátricos, atendidos no HU-USP, durante os 3 anos de estudo.



Os anos 2017 e 2018 tiveram o gênero masculino como o principal número de infectados, com 199 e 124 amostras positivas respectivamente, equivalente a 54,3% e 55,3%. Em 2019, o gênero feminino apresentou o maior número de infectados até a data analisada, com 119 amostras positivas, equivalente a 52,4%. Mas esta diferença não foi significativa.

O HRSV circulou durante os meses de Março a Julho (outono-inverno) nos 3 anos de estudo com 711 (87,0%) amostras positivas neste período. (Gráfico 3, 4 e 5).

Gráfico 3, 4 e 5: Amostragem dos anos 2017 (1), 2018 (2) e 2019 (3). A linha vermelha no **Gráfico 1** representa o mês de maio onde não foram recebida nenhuma amostra de ANF devido a falta de kit de IF no HU-USP. A linha vermelha no **Gráfico 2** marca o mês onde o Hospital Universitário entrou em greve.



Dos 817 ANF positivos durante os três anos de estudo, 647 (79,2%) amostras foram proveniente do Pronto Socorro Infantil (PSI), seguido da Clínica Pediátrica (CP) com 81 (10%) amostras, Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) com 74 (9,1%) amostras, Retaguarda Infantil (RETI) com 9 (1,1%) amostras e Ambulatório (AMB) e Berçário (BER) com 3 (0,3%) amostras cada como visto na tabela 3.

Tabela 3 - Relação do número de amostras positivas para HRSV de acordo com o local de procedência, que os pacientes pediátricos foram atendidos no HU-USP, nos anos de 2017 a 2019 .

Local de Procedência	2017	2018	2019
AMB	2	0	1
BER	2	1	0
CP	58	15	8
PSI	270	180	197
RETP	3	3	3
UTIP	31	25	18

Legenda: **AMB**- Ambulatório; **BER** - Berçário; **CP** - Clínica Pediátrica; **PSI** - Pronto-socorro infantil; **RETP** - retaguarda da pediatria; **UTIP** - Unidade de terapia intensiva da pediatria.

Durante o período do estudo, foram recebidas 9 amostras com coinfeção de HRSV e outro vírus, sendo quatro com Adenovírus Humano, três com Influenza A, uma com vírus da Parainfluenza 1 e uma com vírus da Parainfluenza 3.

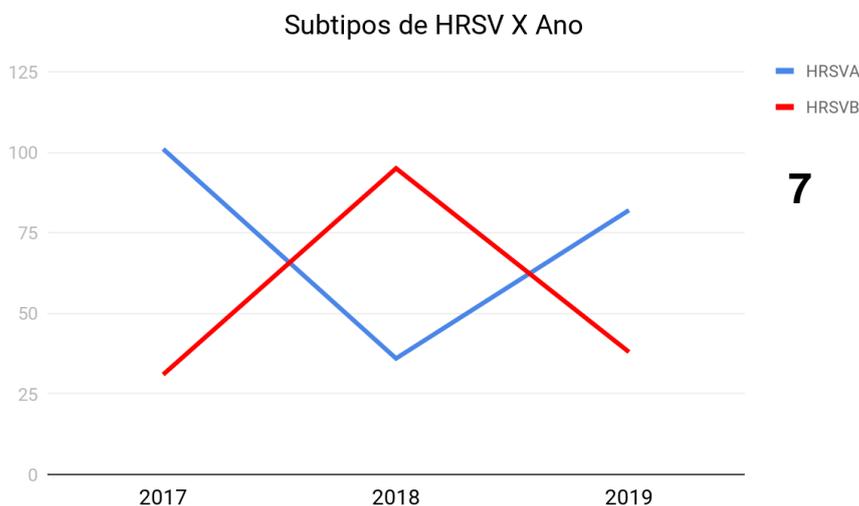
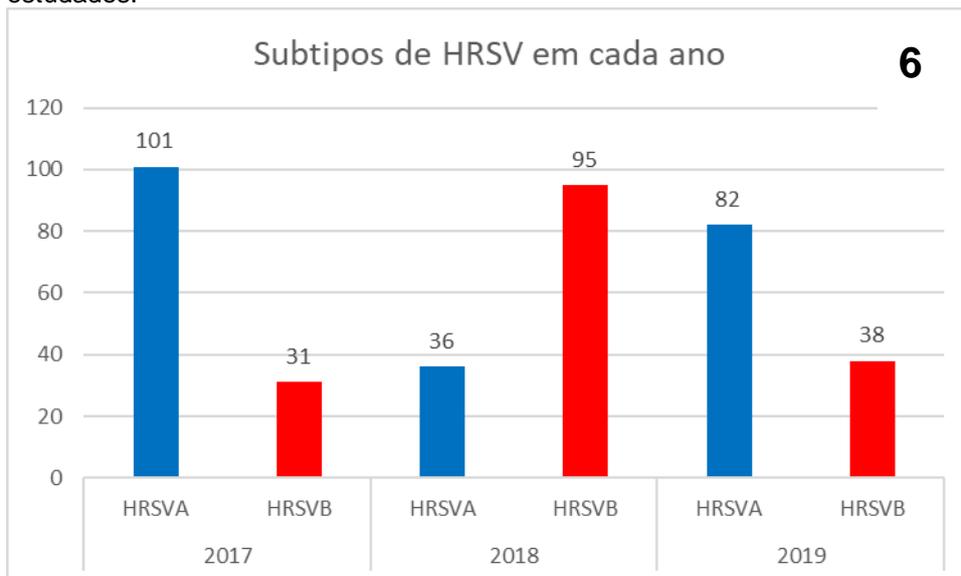
5.2 Análise da proteína G

5.2.1 Subtipagem

Das 817 amostras positivas para HRSV, 383 (46,9%) foram sequenciadas, onde obtivemos 219 amostras do subtipo A (57,2%) e 164 do subtipo B (42,8%). Entretanto, para genotipagem apenas 279 (34,1%) apresentaram sequências de qualidade e tamanho suficientes para serem analisadas. O ano de 2017 foi o que apresentou o maior número de amostras sequenciadas e genotipadas, com o total de 132 sequências (sq), seguido por 131 sq e 120 sq em 2018 e 2019 respectivamente.

Os anos 2017 e 2019 foram anos com prevalência do subtipo A, equivalente a 83,5% (183) de todas as amostras do HRSVA. O ano 2018 teve prevalência do subtipo B, com 57% (95) de todas as amostras do subtipo B. O Gráfico 5 e 6, demonstra claramente uma alteração de predominância entre os subtipos A e B em cada ano (Gráfico 6 e 7).

Gráfico 6 e 7: Representação da distribuição de cada subtipo de HRSV ao longo dos anos estudados.



5.3.1 Análise de Genotipagem do HRSVA.

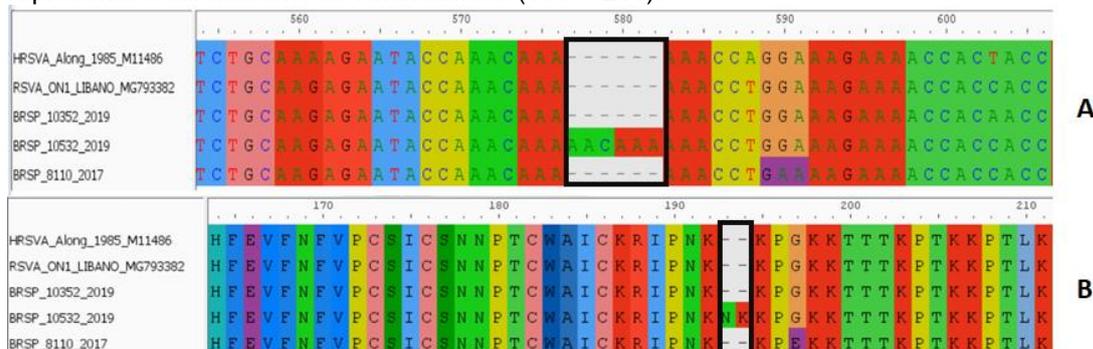
Para análise de genotipagem da proteína G do HRSVA utilizamos tanto a porção conservada quanto a variável HVR2. Como padrão, foi usado o genótipo ON1, com inserção de 72 nt, primeiramente descrito por Eshaghi em 2012 [37]. A sequência do isolado A long (M11486) também foi usada para análise da região conservada.

Das 219 amostras de HRSV do subtipo A, 170 apresentaram sequências de qualidade e tamanho suficientes para análise. Destas, 165 foram analisadas na região conservada ao fim da HVR2 (AA164 a 319) e apenas cinco foram analisadas somente a região HVR2 (AA212 a 319).

5.3.1.1 Alinhamento

A região conservada (AA164-176) não apresentou variações em nenhuma das sequências obtidas. A região adjacente a região mais conservada, a HBD apresentou-se conservada em 147 sequências. Das 18 sequências com mutações nesta região, duas delas (BRSP_8110_2017, e BRSP_8279_2017), apresentaram uma substituição de Guanina para uma Adenina no códon 583 “GGA” para “GAA”, resultando na tradução de uma Glutamina. Em 16 sequências foi encontrada, nesta região, uma inserção de dois aminoácidos nunca antes descrita no HRSV. Diferente de outras inserções já descritas, essa é a primeira em uma região conservada (HBD). Trata-se de uma duplicação dos códons 191 (AAC) e 192 (AAA) codificantes de uma Asn e Lys, destas 16 sq encontradas, 2 foram do ano 2017 (BRSP_8655_2017 e BRSP_8309), uma de 2018 (BRSP_9716_2018) e 13 de 2019 (BRSP_10326_2019, BRSP_10417_2019, BRSP_10498_2019, BRSP_10510_2019, BRSP_10517_2019, BRSP_10524_2019, BRSP_10532_2019, BRSP_10535_2019, BRSP_10569_2019, BRSP_10600_2019, BRSP_10610_2019, BRSP_10618_2019, BRSP_10636_2019) (Figura 16).

Figura 16 - Alinhamento realizado no Aliview contendo um sequencia HRSVA de 2019 (BRSP_10352_2019), uma sequência com uma inserção de 6 nucleotídeos, ou dois aminoácidos (BRSP_10532_2019) e uma sequência mutante Gly195Glu (BRSP_8110_2017). O item **A** representa o alinhamento de nucleotídeos (554 a 606) das amostras citadas enquanto o item **B** representa o alinhamento de Aminoácidos (164 – 211).



Para análise da HVR2, foram analisadas do AA212 a 322. Com exceção de uma amostra, todas as sequências possuíam 111AA (333nt). A amostra BRSP_10532_2019 teve a substituição de uma tirosina por uma citosina no códon de parada “TGA”, formando o códon CGA (Arg) e aumentando a proteína em um AA.

Foi observada uma média de 6,5 AA mutantes por amostra em comparação com o padrão ON1 descrito por Eshaghi [37]. A amostra com o menor número de substituição de AA foi a BRSP_8191_2017, contendo apenas duas substituições nas posições Leu274Pro e Tyr280His. A amostra com o maior número de substituições foi a BRSP_10417_2019, com 13, sendo elas: Glu224Gly, Lys233Met, Thr235Ile, Ile236Thr, Ile243Ser, Leu248Pro, Glu262Lys, Leu265Ile, Hus266Arg, Leu274Pro, Leu298Pro, Leu310Pro e Leu314Pro.

As sequências foram comparadas com as amostras HRSVA brasileiras descritas por Vieira [45] dos anos de 2013 a 2015 provenientes da cidade de São Paulo. Foram encontradas 6 substituições de AA, sendo a substituição Gly262Lys a similar mais encontrada com 43 amostras deste estudo (variando nos três anos) compartilhando da mesma substituição. A mutação Ser299As foi vista em 4 amostras deste estudo durante os três anos.

Figura 17 - Alinhamento de aminoácidos das seqüências HRSVA em comparação com a seqüência ON1 . Acima da seqüência, visualiza-se uma régua indicando posição dos Aminoácidos. A esquerda, visualiza-se as seqüências HRSVA obtidas. O “.” Representa um AA igual ao da seqüência de referência. O “X” sinaliza um Códon impossível de traduzir ou Stop Codon. O número ao lado da identificação da amostra indica a quantidade de amostras com a mesma seqüência da representante

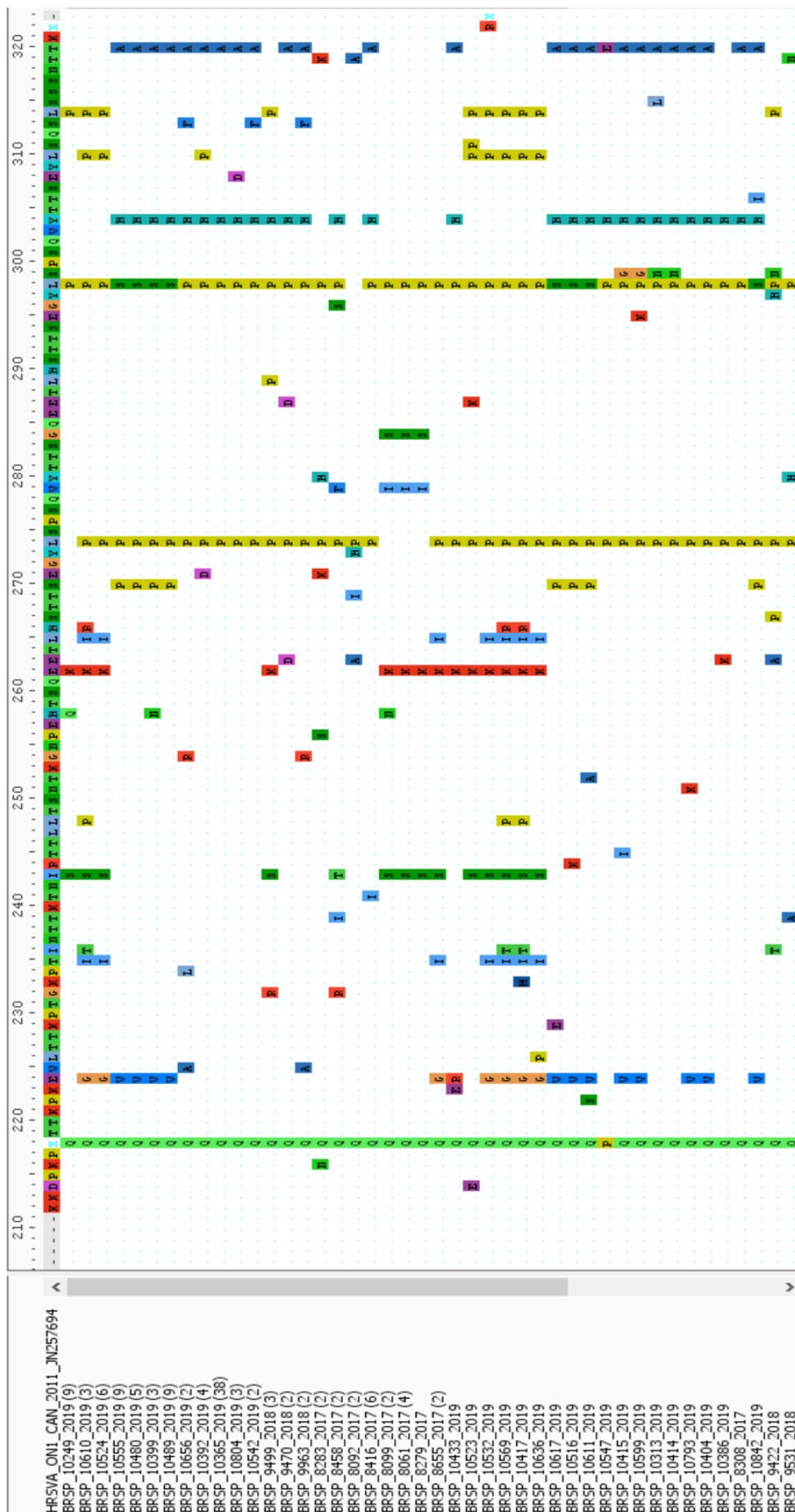
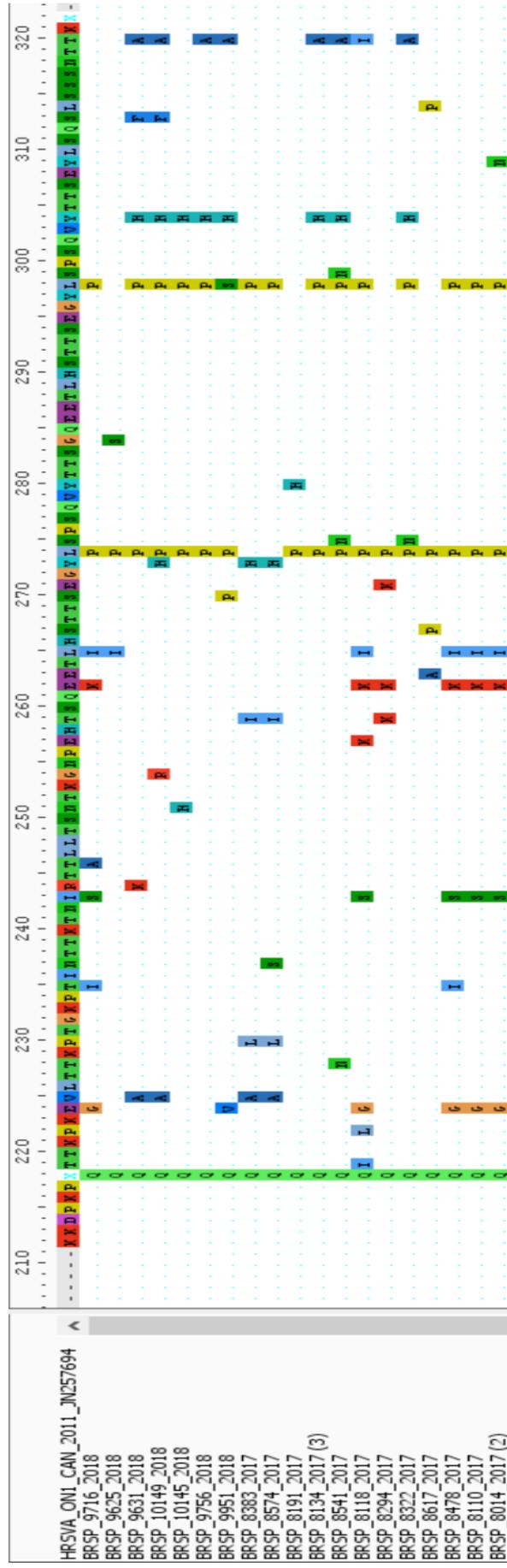


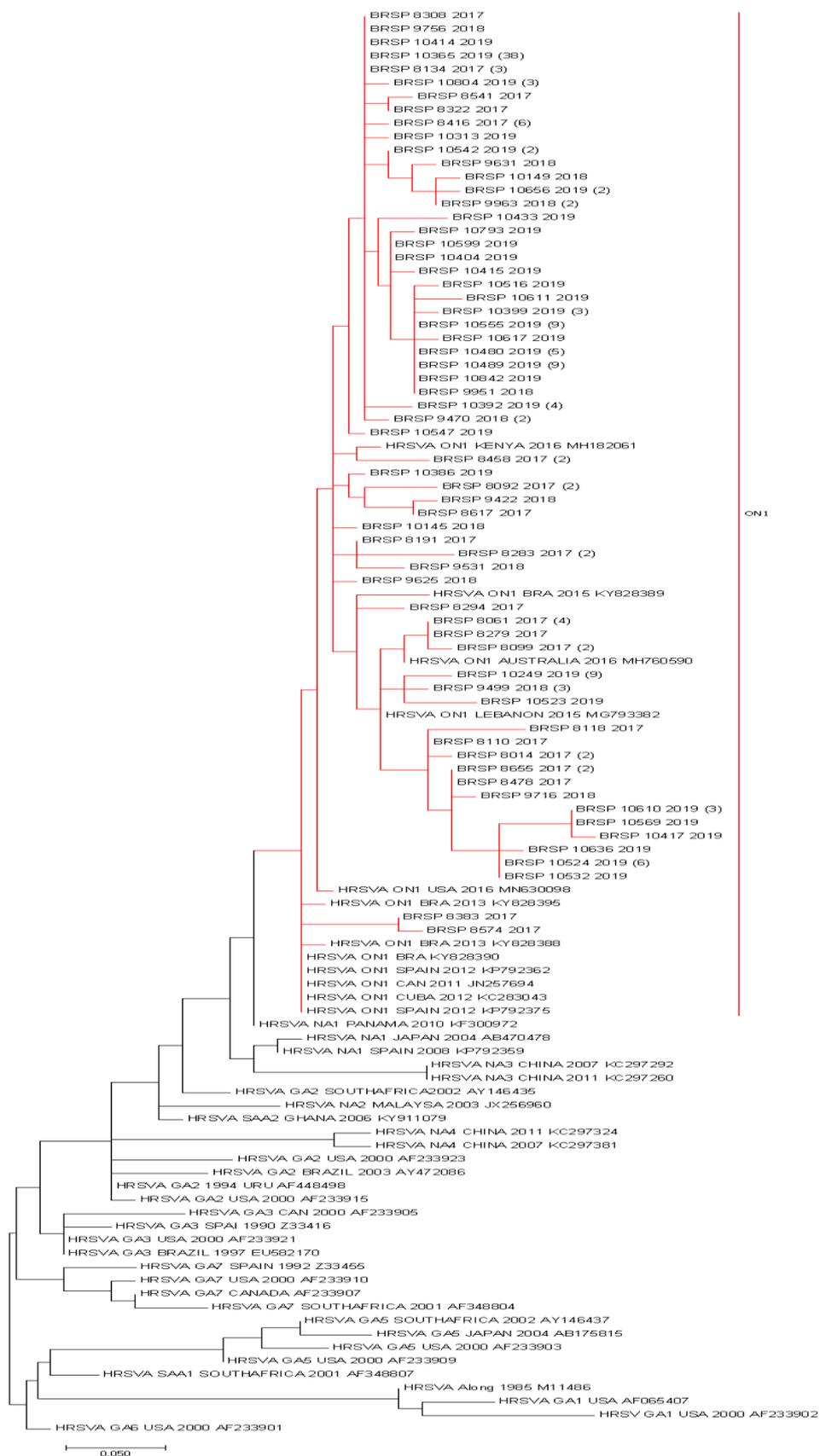
Figura 17(continuação) - Alinhamento de aminoácidos das seqüências HRSVA em comparação com a seqüência ON1 . Acima da seqüência, visualiza-se uma régua indicando posição dos Aminoácidos. A esquerda, visualiza-se as seqüências HRSVA obtidas. O “.” representa um AA igual ao da seqüência de referência. O “X” sinaliza um Códon impossível de traduzir ou Stop Codon. O número ao lado da identificação da amostra indica a quantidade de



5.3.1.2 *Árvore Filogenética*

A árvore Filogenética foi realizada utilizando sequências de AA disponíveis no *GenBank* como padrões. Todas as sequências obtidas em nosso estudo, pertencem ao genótipo ON1. Diversas variações dentro do clado são observadas mostrando um grande número de substituições encontradas (Figura 17 e 18).

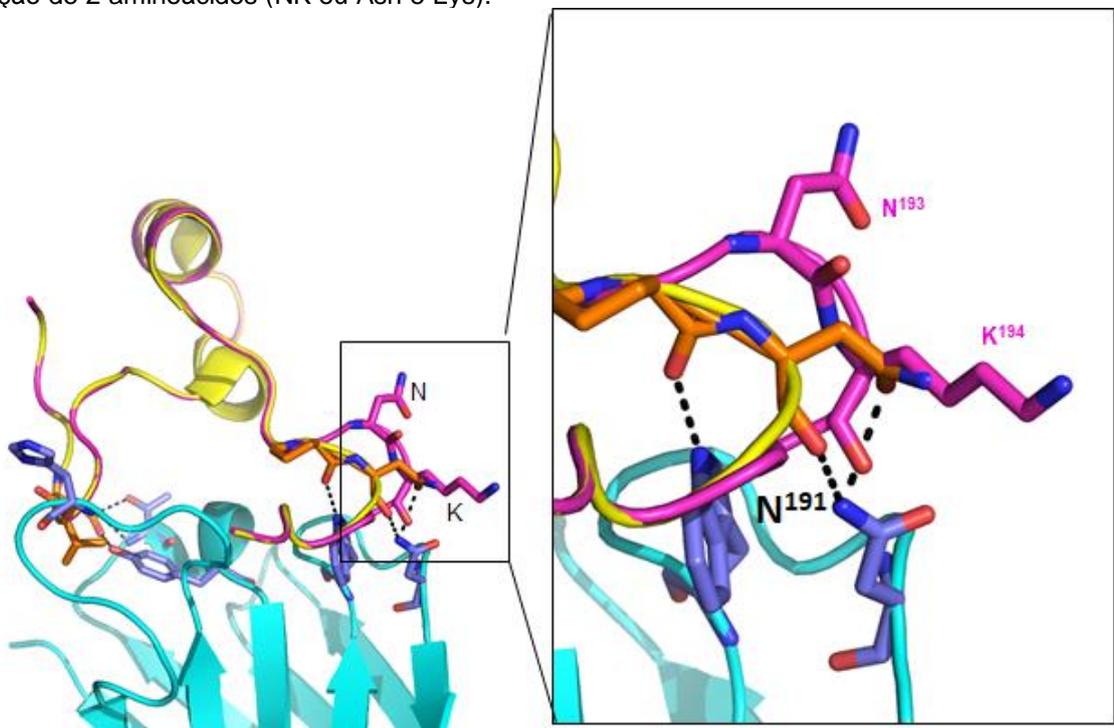
Figura 18 - Árvore Filogenética das amostras do subtipo A. Todas as sequencias apresentaram a duplicação de 72nt, portanto se agruparam clado ON1, marcado em vermelho.



5.3.1.3 Modelagem Comparativa

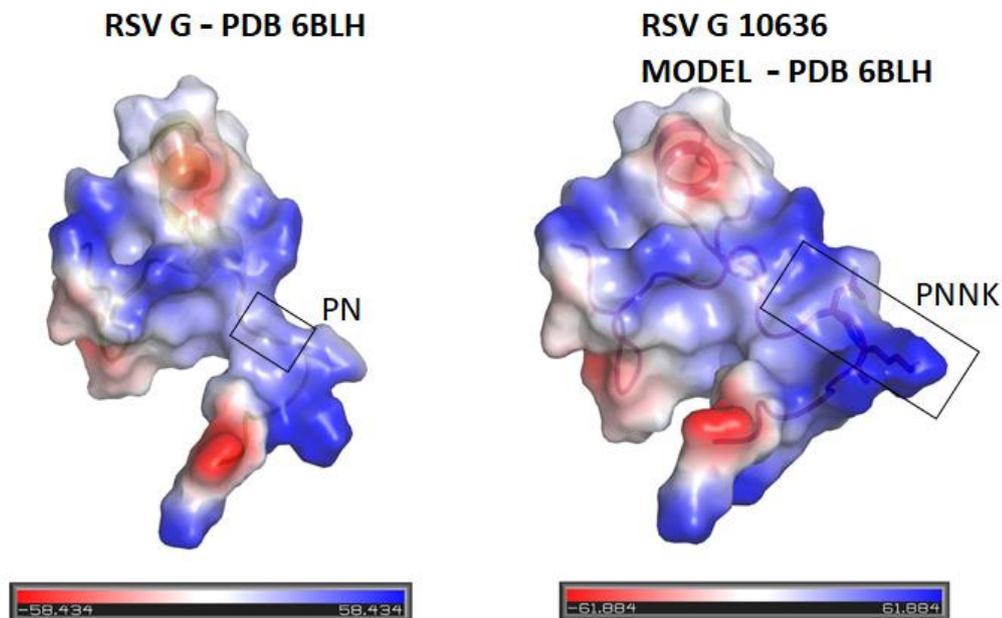
Para a predição da estrutura da região conservada, foi utilizado a amostra BRSP_10636_2019 como representante das 16 amostras encontradas com a duplicação na região HBD. Foi utilizado como padrão o PDB 6BLH, uma estrutura da região conservada da proteína G conjugada a um anticorpo CB017.5. Os resultados obtidos mostram um aumento da alça ligante ao anticorpo conjugado como visto na figura 19. Verifica-se que a inserção pode aumentar a alça que faz interações diretas com o anticorpo.

Figura 19 - Comparação entre a estrutura do RSV G (PDB 6BLH) e o modelo baseado na sequência com inserção de 2 aminoácidos (NK ou Asn e Lys).



Além do aumento da alça, a predição estrutural mostrou uma mudança importante na carga da proteína e conformação como visto na figura 20. Observa-se que a inserção não altera as cargas da região que já eram positivas, mas o modelo sugere aumento de carga positiva e possíveis mudanças conformacionais significativas

Figura 20 - Demonstração de mudanças conformacionais e de cargas decorrentes da inserção dos resíduos NK na sequência de RSVG 10636.



5.3.2 Análise de Genotipagem do HRSVB

Das 165 amostras do subtipo HRSVB, 106 possuíam sequências de tamanho e qualidade suficientes para análise da região conservada e 107 para análise da HVR2. As sequências obtidas do HRSVB foram analisadas com o protótipo BA disponível no Genbank sob o número AY333364.

5.3.2.1 Alinhamento

As 106 sequências se mostraram conservadas da região conservada, com exceção de duas amostras de 2018 (BRSP_9444_2018 e BRSP_9463_2018) que apresentaram substituições no AA198 (Thr198Ala).

Noventa e cinco das 107 amostras apresentaram 101 AA na região HVR2, cinco apresentaram 108AA, uma apresentou 104AA, cinco apresentaram 103AA e uma amostra apresentou 102AA, sendo que a sequência BA de referência apresenta 104AA na região HVR2 (Figura 21)

Dentre as amostras com 108AA três (BRSP_10321_2019, BRSP10514_2019 e BRSP_10349_2019) foram do ano de 2019 e duas (BRSP_8114_2017 e BRSP_8110_2017) foram do ano 2017. A inclusão de 4AA

se deve a mutação do códon de parada “TAG” na posição 310 para “CAG”, traduzindo o AA Gly na posição e inserindo os AA Ser, Tyr e Ala até o próximo códon de parada TAG.

As 107 amostras que apresentaram 101AA de extensão na região apresentam o códon de parada TAA na posição 307. A única amostra com a mesma extensão do padrão utilizado no alinhamento (104AA) foi a BRSP_9628_2018.

As cinco amostras que apresentaram 103AA (BRSP_9483_2018, BRSP_9489_2018, BRSP_9410_2018 e BRSP_9471_2018) possuem o mesmo códon de parada TAA na posição 307, porém apresentaram uma inserção de dois aminoácidos duplicados das posições 223 e 224 (“AAA” e “GAA”, Lys e Glu respectivamente). Todas essas amostras foram encontradas no ano 2018.

A amostra BRSP_9649_2018 apresenta também o códon de parada na posição 307, porém também apresentou uma inserção de um AA duplicado da posição 289 (Asn289).

Foram observadas uma média de 11,3 mutações por sequência analisada em comparação com o padrão escolhido. A amostra com maior número de inserções foi a BRSP_9649_2018 com um total de 16AA substituídos e um inserido (Asn290). A amostra também apresentou as substituições Arg256Gly, Thr258Ala, Gln262Arg e Thr269Ala vista somente em mais duas amostras de 2018. As amostras BRSP_10385_2019, BRSP_9990_2018 e BRSP_8500_2017 foram as amostras com 9 substituições de AA, sendo esse o menor número de substituições encontrado.

As substituições Lys212Thr, Leu217Pro e Ile275Thr foram as substituições mais comuns, presentes em todas as amostras com a exceção das amostras BRSP_9588_2018 que apresentou a uma substituição na posição 217 porém para uma Thr (Leu212Thr) e a BRSP_8012_2017 que não apresentou a substituição na posição 275.

Um total de 18 amostras apresentaram substituições únicas. A amostra BRSP_10813_2019 apresentou três substituições não encontradas em nenhuma outra amostra analisada, sendo essa a amostra com o maior número de substituições únicas, sendo elas: Lys272Asn, Glu286Lys e Thr306Lys.

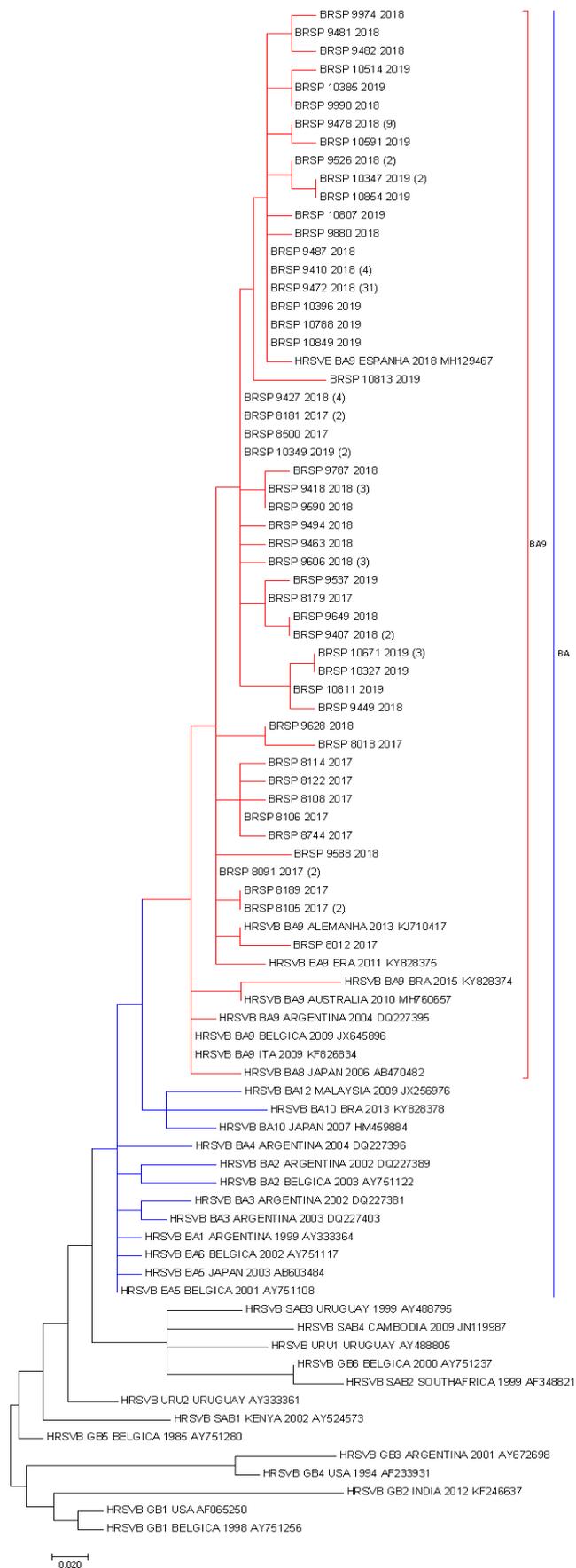
O alinhamento das amostras obtidas com a sequência brasileira de HRSVB mais nova disponível no *genbank* mostra duas mutações não vistas em nenhuma das amostras sequenciadas, sendo elas Thr221Asm e Ser270Phe. A amostra sequenciada foi coletada em 2016 no Rio de Janeiro.

Uma representante da sequência proveniente de São Paulo mais atual disponível no *genbank* foi escolhida e alinhada com as sequências de AA obtidas. Foram observadas quatro substituições não vistas em nenhuma amostra incluída no projeto, sendo elas Leu213Arg, Lys221Ile, Leu280Phe e Pro300Leu.

5.3.2.2 *Árvore Filogenética*

A árvore Filogenética foi realizada utilizando sequências de AA disponíveis no *GenBank* como padrões. Todas as sequências obtidas pertencem ao genótipo BA, variante BA-9 (Figura 22).

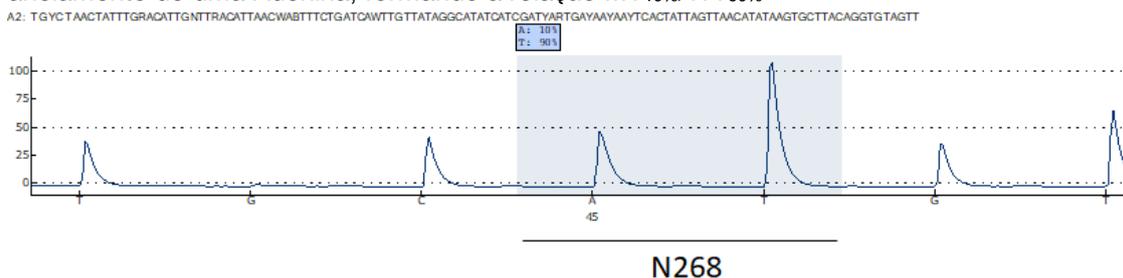
Figura 22 - Árvore Filogenética das amostras do subtipo B. Os clados marcados em azul são pertencentes ao genótipo BA, ou seja, possuem a duplicação de 60nt. Todas as sequencias incluídas nesse projeto se encontram no clado BA9, marcado



5.4 Pirosequenciamento

O Pirosequenciamento foi utilizado para a procura de SNP's conhecidos por induzir resistência ao monoclonal humanizado Palivizumabe. Nenhuma sequência mostrou uma detecção de anelamento mutante acima do cut-off estabelecido de $MT_{<12\%}$, sendo o mais alto detectado em nossas amostras $MT_{10\%}$ (Figura 23) com exceção da substituição Asn276Ser, predominante em todas as amostras analisadas do subtipo A com a taxa de mutação variando entre $MT_{98\%/WT_{2\%}}$ a $MT_{100\%/WT_{0\%}}$.

Figura 23 - Programa da amostra BRSP_8923_2017 na região AA268. Foi detectado 10% de anelamento de uma Adenina, formando a relação $MT_{10\%/WT_{90\%}}$



6. Discussão

O HRSV é um vírus de importância médica, e os resultados obtidos neste estudo suportam isso. Testes de IF realizados no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo nos dois anos e oito meses estudados, demonstraram uma positividade de 26,8% para infecção por HRSV. A grande maioria dos casos (78%) são provenientes do pronto – socorro, deixando evidente a importância de um diagnóstico rápido e sensível.

Ocorreu uma substituição do subtipo predominante durante o período de estudo (gráfico 7). O HRSVB foi predominante em 2018 enquanto o HRSVA foi predominante nos outros dois anos. Essa alteração do subtipo é comum e foi vista em diferentes trabalhos.(93,94)

Percebe-se que o ano 2018 teve maior circulação do vírus nos últimos meses do ano, diferente de 2017 que teve o número de casos zerado em outubro. Isso contradiz o que é visto em alguns estudos onde os anos com circulação predominante B teve seu número de amostras positivas isoladas durante o período de pico indicando que outros fatores podem contribuir para essa alteração.(94)

Os meses de maio em 2017 e 2018 tiveram baixo número de amostras esperadas, uma vez que é um mês de alta circulação viral (65). O motivo encontrado para isso em 2017 foi a falta de kit de IF no laboratório do Hospital Universitário e em 2018 o fechamento do Pronto Socorro por motivos administrativos. O ano 2019 teve a circulação esperada para o mês de Maio.

Das 817 amostras positivas para HRSV, 383 (46,8%) foram sequenciadas e subtipadas. O número de amostras subtipadas em proporção com as amostras positivas foi menor em 2017, com 36% das amostras positivas sequenciadas (132 amostras). Os anos 2018 e 2019 tiveram mais de 50% das amostras recebidas sequenciadas (58% e 53% respectivamente). Acredita-se que essa diferença se deve por alguma mutação no sítio de anelamento dos primers utilizados ou, em menor probabilidade, a viabilidade das amostras utilizadas.

A análise das sequências mostrou que 100% das amostras do subtipo A são do genótipo ON1, enquanto 100% das amostras do subtipo B são do genótipo BA9. Ambos genótipos já são predominantes em São Paulo e no mundo inteiro. (44,95–97)

Não se sabe explicar o porquê do sucesso evolutivo dos genótipo ON1 e BA(98–100), mas percebemos um alto número de mutações em relação às sequências brasileiras mais novas, com poucas representantes possuindo as mesmas substituições, sendo as sequências obtidas desse projeto muito mais divergentes das sequências utilizadas como padrões do que as amostras brasileiras disponíveis no *Genbank*. Esses dados suportam uma alta taxa de mutação da proteína G sendo essa indispensável para adaptação viral e escape imunológico.(101,102)

Em ambas amostras foram encontradas diferentes inserções. No subtipo A, foi encontrada uma inserção em um local nunca antes descrito, o domínio ligante a heparina (HBD). Foi visto um aumento no número de amostras com essa inserção ao longo do estudo, sendo duas no primeiro ano, uma no segundo e 13 no terceiro. Hipotiza-se que uma seleção pode estar ocorrendo e essa mutação pode vir a ser predominante nos próximos anos. O número baixo (uma amostra) encontrada em 2018 pode ser relacionada a prevalência do subtipo B. Mais estudos são necessários para entender como essa mutação pode ser viável ao vírus. O fato de aumentar a polaridade da região onde se encontra, como visto no modelo gerado, pode sugerir uma maior afinidade por GAG's de superfície celular (31), porém como já foi descrito, sítios de heparina são pouco expressos na região apical das células infectadas, sugerindo então uma função de escape imunológico viral, também visto no modelo gerado conjugado com o anticorpo CB017.5, onde a proximidade da inserção encontrada pode alterar a maneira de ligação da imunoglobulina à proteína G. O isolamento da cepa viral em cultura celular pode ser importante para atribuir função a inserção, uma vez que GAG's são bem expressos em células imortalizadas.

As inserções do subtipo B, diferente do subtipo A, foram encontradas na HVR2 onde as mutações de 72nt e 60nt foram descritas. Uma mutação encontrada é de apenas 6nt (AA Ly2225 e Gly226) e já foram vistas em outros genótipos do subtipo. O genótipo URU 1 de 2001 (AY488805) apresenta a mesma inserção assim como uma amostra italiana do mesmo genótipo de 2009 (KF826834) apresenta outra inserção, de 4AA (12nt) na mesma região codificando para Arg, Lys, Lys e Glu. Uma amostra mais recente, de 2018 proveniente da Espanha apresenta uma inserção de um AA na mesma região

(Lys). A outra inserção encontrada no AA compreende uma Asn294 e não foi encontrada em nenhuma outra amostra disponível no *Genbank*.

Todas as inserções do subtipo B foram encontradas somente no ano de predominância desse subtipo e não foi vista em nenhuma outra amostra do ano seguinte a primeira detecção (2019). Isso sugere que essa mutação não gerou a vantagem evolutiva necessária para manter-se circulante, e isso é apoiado com mutações iguais ou diferentes na mesma região que também não são mais vistas circulantes.

A procura de SNP's conferentes de resistência ao Palivizumabe por Pirosequenciamento mostrou até então nenhuma amostra resistente ao monoclonal. A mutação Asn276Ser no subtipo A mostrou-se dominante em todas as amostras como já reportado. Essa mutação só mostrou conferir resistência quando combinada com a mutação Lys272Glu, não encontrada em nenhuma amostra nesse estudo.

Esses resultados mostram segurança no uso do Palivizumabe em São Paulo uma vez que o sítio de interação do monoclonal e a proteína se mantém conservado. A conservação deste sítio deve-se tanto a natureza proteica quanto a falta de um agente de seleção, uma vez que o índice de aplicação do Palivizumabe no Estado de São Paulo se mantém baixo, os dados apresentados por Oliveira (2014) mostram o aparecimento de mutantes conferentes de resistência nos Estados Unidos, onde há abundante uso da profilaxia.

7. Conclusão

Com os dados obtidos nesse estudo, conclui-se que o HRSV é um patógeno de importância para a saúde pública com mais de 25% dos pacientes pediátricos com quadro de infecção respiratória causadas por esse vírus anualmente.

A análise da proteína G mostrou a contínua dominância dos genótipos ON1 e BA9 e a plasticidade da proteína para evasão do sistema imunológico ao apresentar diversas substituições e inserções sem a perda de função. Além disso, esse estudo mostra uma nova inserção de dois aminoácidos em uma região ainda não descrita.

O Pirosequenciamento não detectou nenhuma mutação conferente de resistência a única medida profilática disponível, mostrando segurança no uso do Mab Palivizumabe.

8. Referências Bibliográficas

1. Morris JA, Blount RE, Savage RE. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Exp Biol Med* [Internet]. 1956 Jul 1 [cited 2019 Dec 15];92(3):544–9.
2. de Oliveira Santos NS, Villela Romanos MT, Dutra Wigg M. *Introdução à Virologia Humana*. 3ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015. 606 p.
3. CHANOCK R, FINBERG L. RECOVERY FROM INFANTS WITH RESPIRATORY ILLNESS OF A VIRUS RELATED TO CHIMPANZEE CORYZA AGENT (CCA). *Am J Epidemiol* [Internet]. 1957 Nov [cited 2019 Dec 15];66(3):291–300.
4. CHANOCK R, ROIZMAN B, MYERS R. RECOVERY FROM INFANTS WITH RESPIRATORY ILLNESS OF A VIRUS RELATED TO CHIMPANZEE CORYZA AGENT (CCA). *Am J Epidemiol* [Internet]. 1957
5. Chanock RM, Parrott RH, Vargosko AJ, Kapikian AZ, Knight V, Johnson KM. IV. RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS.
6. KAPIKIAN AZ, BELL JA, MASTROTA FM, JOHNSON KM, HUEBNER RJ, CHANOCK RM. AN OUTBREAK OF FEBRILE ILLNESS AND PNEUMONIA ASSOCIATED WITH RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION1. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1961 Nov [cited 2019 Dec 17];74(3):234–48. Available from: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.aje.a120216>
7. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of Primary Infection and Reinfection With Respiratory Syncytial Virus. *Am J Dis Child*. 1986;140(6):543–6.
8. Candeias JA. Isolamento de Vírus Respiratório Sincicial em crianças com quadro respiratório agudo. 1967;27–30.
9. CHIN J, MAGOFFIN RL, SHEARER LA, SCHIEBLE JH, LENNETTE EH. FIELD EVALUATION OF A RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS VACCINE AND A TRIVALENT PARAINFLUENZA VIRUS VACCINE IN A PEDIATRIC POPULATION1. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1969 Apr
10. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 6ª. Alterthum F, editor. São Paulo: Atheneu; 2015. 888 p.
11. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* (London, England)

12. Battles MB, McLellan JS, Michael B. Battles¹ and Jason S. McLellan, Battles MB, McLellan JS. Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2019 Sep 10];17(4):233–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x>
13. Hanley LL, McGivern DR, Teng MN, Djang R, Collins PL, Fearn R. Roles of the respiratory syncytial virus trailer region: Effects of mutations on genome production and stress granule formation. *Virology*. 2010 Oct;406(2):241–52.
14. Collins PL, Fearn R, Graham BS. Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease.
15. Collins PL, Olmsted RA, Spriggs MK, Johnson PR, Buckler-White AJ. Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus (negative-strand RNA viruses/transcriptive signals/mode of transcription/alternative transcripts). Vol. 84, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987.
16. Spann KM, Tran KC, Collins PL. Effects of Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Human Respiratory Syncytial Virus on Interferon Regulatory Factor 3, NF- κ B, and Proinflammatory Cytokines. *J Virol*. 2005 May 1;79(9):5353–62.
17. Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, et al. Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus Suppress Premature Apoptosis by an NF- κ B-Dependent, Interferon-Independent Mechanism and Facilitate Virus Growth. *J Virol*. 2007 Feb 15;81(4):1786–95.
18. 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 Virol* [Internet]. 1998 Feb [cited 2020 Jan 4];72(2):1452–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445048>
19. Groskreutz DJ, Babor EC, Monick MM, Varga SM, Hunninghake GW. Respiratory syncytial virus limits α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) phosphorylation to maintain translation and viral replication. *J Biol Chem*. 2010 Jul 30;285(31):24023–31.
20. Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagne N, et al. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* (80-). 2009 Nov 27;326(5957):1279–83.
21. Castagné N, Barbier A, Bernard J, Rezaei H, Huet JC, Henry C, et al. Biochemical characterization of the respiratory syncytial virus P-P and P-N protein complexes and localization of the P protein oligomerization

- domain. *J Gen Virol.* 2004 Jun;85(6):1643–53.
22. Ghildyal R, Ho A, Jans DA. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2006 Sep [cited 2020 Jan 4];30(5):692–705. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2006.00025.x>
 23. Money VA, Mcphee HK, Mosely JA, Sanderson JM, Yeo RP. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. Vol. 17, *PNAS* March. 2009.
 24. Rixon HWML, Brown G, Aitken J, McDonald T, Graham S, Sugrue RJ. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. *J Gen Virol.* 2004 May;85(5):1153–65.
 25. Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the Respiratory Syncytial Virus Small Hydrophobic Protein. *J Virol.* 2007 Aug 1;81(15):8361–6.
 26. Gan SW, Tan E, Lin X, Yu D, Wang J, Tan GMY, et al. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J Biol Chem.* 2012 Jul 13;287(29):24671–89.
 27. Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(12):4075–9.
 28. Melero JA, Mas V, McLellan JS. Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. *Vaccine.* 2017;35(3):461–8.
 29. Jones HG, Ritschel T, Pascual G, Brakenhoff JPJ, Keogh E, Furmanova-Hollenstein P, et al. Structural basis for recognition of the central conserved region of RSV G by neutralizing human antibodies. *PLoS Pathog.* 2018;14(3):1–23.
 30. Feldman SA, Hendry RM, Beeler JA. Identification of a linear heparin binding domain for human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G. *J Virol* [Internet]. 1999;73(8):6610–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400758><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC112745>
 31. Zhang L, Bukreyev A, Thompson CI, Watson B, Peeples ME, Collins PL, et al. Infection of Ciliated Cells by Human Parainfluenza Virus Type 3 in an In Vitro Model of Human Airway Epithelium. *J Virol.* 2005 Jan 15;79(2):1113–24.

32. Peret TCT, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Printed in Great Britain Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. Vol. 79, *Journal of General Virology*. 1998.
33. Peret TCT, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, et al. Circulation Patterns of Group A and B Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5 Communities in North America. *J Infect Dis* [Internet]. 2000 Jun [cited 2020 Jan 5];181(6):1891–6. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315508>
34. 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(9):2117–24.
35. Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H, Suzuki Y, Kumaki A, et al. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol*. 2009 Aug;47(8):2475–82.
36. Cui G, Zhu R, Qian Y, Deng J, Zhao L, Sun Y, et al. Genetic Variation in Attachment Glycoprotein Genes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B in Children in Recent Five Consecutive Years. Turner SJ, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Sep 17 [cited 2020 Jan 5];8(9):e75020. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0075020>
37. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A. Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A Novel Genotype with a 72 Nucleotide G Gene Duplication. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2019 Sep 2];7(3):32807. Available from: www.plosone.org
38. Blanc A, Delfraro A, Frabasile S, Arbiza J. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. *Arch Virol*. 2005 Mar;150(3):603–9.
39. Trento A, Casas I, Calderon A, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Perez-Brena P, et al. Ten Years of Global Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus BA Genotype with a 60-Nucleotide Duplication in the G Protein Gene. *J Virol* [Internet]. 2010;84(15):7500–12. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00345-10>
40. Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, et al. Natural History of Human Respiratory Syncytial Virus Inferred from Phylogenetic Analysis of the Attachment (G) Glycoprotein with a 60-Nucleotide Duplication. *J Virol* [Internet]. 2006 [cited 2019 Sep 3];80(2):975–84. Available from: <http://jvi.asm.org/>
41. Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, et al. New

- genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3423–7.
42. Gimferrer L, Vila J, PiñanaPi M, AndrésAndr C, Rodrigo-PendásPend JA, Peremiquel-Trillas P, et al. Virological surveillance of human respiratory syncytial virus A and B at a tertiary hospital in Catalonia (Spain) during five consecutive seasons (2013-2018). [cited 2019 Mar 22]; Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/fmb-2018-0261>
 43. Ábrego LE, Delfraro A, Franco D, Castillo J, Castillo M, Moreno B, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus group B in Panama reveals a novel genotype BA14. *J Med Virol* [Internet]. 2017 [cited 2018 Dec 4];89:1734–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jmv.24838>
 44. Vieira SE, Thomazelli LM, De Paulis M, Ferronato AE, Oliveira DB, Martinez MB, et al. Infections Caused by HRSV A ON1 Are Predominant among Hospitalized Infants with Bronchiolitis in São Paulo City. *Biomed Res Int.* 2017;2017.
 45. Hendricks DA, Baradaran K, McIntosh K, Patterson JL. Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells. *J Gen Virol.* 1987;68(6):1705–14.
 46. Bukreyev A, Yang L, Fricke J, Cheng L, Ward JM, Murphy BR, et al. The Secreted Form of Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein Helps the Virus Evade Antibody-Mediated Restriction of Replication by Acting as an Antigen Decoy and through Effects on Fc Receptor-Bearing Leukocytes. *J Virol.* 2008 Dec 15;82(24):12191–204.
 47. Bukreyev A, Yang L, Collins PL. The Secreted G Protein of Human Respiratory Syncytial Virus Antagonizes Antibody-Mediated Restriction of Replication Involving Macrophages and Complement. *J Virol.* 2012 Oct 1;86(19):10880–4.
 48. Bolt G, Pedersen LØ, Birkeslund HH. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Res* [Internet]. 2000 Jun [cited 2020 Jan 13];68(1):25–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170200001490>
 49. Zhao X, Singh M, Malashkevich VN, Kim PS. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2000 Dec 19 [cited 2020 Jan 13];97(26):14172–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.260499197>
 50. McLellan JS, Ray WC, Peeples ME. Structure and Function of Respiratory Syncytial Virus Surface Glycoproteins. In 2013 [cited 2020 Jan 13]. p. 83–104. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38919-1_4

51. Mazur NI, Higgins D, Nunes MC, Melero JA, Langedijk AC, Horsley N, et al. The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2018 Oct [cited 2018 Nov 10];18(10):e295–311. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918302925>
52. Cartee TL, Wertz GW. Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Requires Phosphorylation for Efficient Function and Binds Viral RNA during Infection. *J Virol* [Internet]. 2001 Dec 15 [cited 2020 Jan 13];75(24):12188–97. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.75.24.12188-12197.2001>
53. Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H. Overexpression of the M2-2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Inhibits Viral Replication. *J Virol* [Internet]. 2005 Nov 15 [cited 2020 Jan 13];79(22):13943–52. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.22.13943-13952.2005>
54. Tanner SJ, Ariza A, Richard C-A, Kyle HF, Dods RL, Blondot M-L, et al. Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014 Jan 28 [cited 2020 Jan 13];111(4):1580–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1317262111>
55. Gilman MSA, Liu C, Fung A, Behera I, Jordan P, Rigaux P, et al. Structure of the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex. *Cell* [Internet]. 2019 Sep [cited 2019 Sep 10]; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741930902X>
56. Hercyk N, Horikami SM, Moyer SA. The vesicular stomatitis virus L protein possesses the mRNA methyltransferase activities. *Virology* [Internet]. 1988 Mar [cited 2020 Jan 13];163(1):222–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2831658>
57. Grdzelishvili 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* [Internet]. 2005 Jun 15 [cited 2020 Jan 13];79(12):7327–37. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.12.7327-7337.2005>
58. Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ, Ka L. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. 2016 [cited 2020 Jan 3]; Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-16>.
59. Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 5^a. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins; 2007. 3177 p.

60. Garofalo RP, Kolli D, Casola A. Respiratory Syncytial Virus Infection: Mechanisms of Redox Control and Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2013 Jan 10 [cited 2020 Jan 14];18(2):186–217. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2011.4307>
61. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. Vol. 5, *Paediatric Respiratory Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2004.
62. Alvarez AE, De Lima Marson FA, Bertuzzo CS, Arns CW, Ribeiro JD. Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89(6):531–43.
63. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Feb 5 [cited 2018 Nov 11];360(6):588–98. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0804877>
64. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 Apr 28 [cited 2020 Jan 14];352(17):1749–59. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043951>
65. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DBL, Golono MA, et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2007;0(0):422–8. Available from: http://www.jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=1694&cod=&idSecao=4
66. Moura FEA, Perdigão ACB, Ribeiro JF, Florêncio CMGD, Oliveira FMS, Pereira SAR, et al. Respiratory syncytial virus epidemic periods in an equatorial city of Brazil. *Influenza Other Respi Viruses* [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2018 Nov 14];7(6):1128–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/irv.12104>
67. Pecchini R, Berezin EN, Felício MCC, Passos SD, de Souza MCO, de Lima LR de AV, et al. Incidence and clinical characteristics of the infection by the Respiratory Syncytial Virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. *Brazilian J Infect Dis*. 2008;12(6):476–9.
68. Bawage SS, Tiwari PM, Pillai S, Dennis V, Singh SR. Recent advances in diagnosis, prevention, and treatment of human respiratory syncytial virus. Vol. 2013, *Advances in Virology*. 2013.
69. Mesquita F da S, Oliveira DBL de, Crema D, Pinez CMN, Colmanetti TC, Thomazelli LM, et al. Teste rápido de detecção de antígenos para o

- diagnóstico do Vírus Sincicial Respiratório como ferramenta de diagnóstico. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2017;93(3):246–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2016.06.013>
70. Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2nd ed. Guanabara Koogan; 2011.
 71. Thomazelli L. Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pela técnica de GENESCAN-RT-PCR. Universidade de São Paulo; 2004.
 72. Falloon J, Ji F, Curtis C, Bart S, Sheldon E, Krieger D, et al. A phase 1a, first-in-human, randomized study of a respiratory syncytial virus F protein vaccine with and without a toll-like receptor-4 agonist and stable emulsion adjuvant. *Vaccine*. 2016 May 27;34(25):2847–54.
 73. Zhu Q, McLellan JS, Kallewaard NL, Ulbrandt ND, Palaszynski S, Zhang J, et al. A highly potent extended half-life antibody as a potential rsv vaccine surrogate for all infants. *Sci Transl Med*. 2017 May 3;9(388).
 74. Robbie GJ, Criste R, Dall'Acqua WF, Jensen K, Patel NK, Losonsky GA, et al. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(12):6147–53.
 75. Johnson S, Oliver C, Prince GA, Hemming VG, Pfarr DS, Wang S, et al. Development of a Humanized Monoclonal Antibody (MEDI-493) with Potent In Vitro and In Vivo Activity against Respiratory Syncytial Virus. *J Infect Dis* [Internet]. 1997 Nov [cited 2020 Jan 14];176(5):1215–24. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/514115>
 76. Gonçalves IR, Nunes HR de C, Duarte MTC, Parada CMG de L. Avaliação do programa de uso da imunoglobulina palivizumabe no Estado de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2018;34(7).
 77. Hashimoto K, Hosoya M. Neutralizing epitopes of RSV and palivizumab resistance in [Internet]. Vol. 63, Japan Fukushima J. Med. Sci. 2017 [cited 2019 Mar 14]. Available from: <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/fms>
 78. Cardenas S, Auais A, Piedimonte G. Palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus infection. Vol. 3, Expert Review of Anti-Infective Therapy. 2005. p. 719–26.
 79. Secretaria da Saúde B. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS PORTARIA CONJUNTA Nº 23, DE 3 DE OUTUBRO DE 2018 [Internet]. 2018 [cited 2020 Jan 14]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/protocolos-e-diretrizes>,
 80. Crowe JE, Firestone CY, Crim R, Beeler JA, Coelingh KL, Barbas CF, et

- al. Monoclonal antibody-resistant mutants selected with a respiratory syncytial virus-neutralizing human antibody Fab fragment (Fab 19) define a unique epitope on the fusion (F) glycoprotein. *Virology*. 1998 Dec 20;252(2):373–5.
81. Zhu Q, Patel NK, McAuliffe JM, Zhu W, Wachter L, McCarthy MP, et al. Natural polymorphisms and resistance-associated mutations in the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV): Effects on RSV susceptibility to palivizumab. *J Infect Dis*. 2012;205(4):635–8.
 82. Zhu Q, McAuliffe JM, Patel NK, Palmer-Hill FJ, Yang CF, Liang B, et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *J Infect Dis*. 2011;203(5):674–82.
 83. Boivin G, Caouette G, Frenette L, Carbonneau J, Ouakki M, De Serres G. Human respiratory syncytial virus and other viral infections in infants receiving palivizumab. *J Clin Virol*. 2008 May;42(1):52–7.
 84. Papenburg J, Carbonneau J, Hamelin MÈ, Isabel S, Bouhy X, Ohoumanne N, et al. Molecular evolution of respiratory syncytial virus fusion gene, Canada, 2006-2010. *Emerg Infect Dis*. 2012 Jan;18(1):120–4.
 85. Zhao X, Chen FP, Sullender WM. Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats. *Virology*. 2004 Jan 20;318(2):608–12.
 86. Zhao X, Liu E, Chen F-P, Sullender WM. In Vitro and In Vivo Fitness of Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody Escape Mutants. *J Virol*. 2006 Dec 1;80(23):11651–7.
 87. Adams O, Bonzel L, Kovacevic A, Mayatepek E, Hoehn T, Vogel M. Palivizumab-Resistant Human Respiratory Syncytial Virus Infection in Infancy. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010;51(2):185–8. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/653534>
 88. Cruz Sanz M, Kew OM, Anderson LJ. Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein G among group A respiratory syncytial viruses. *Virus Res*. 1994;33(3):203–17.
 89. Zheng H, Peret TCT, Randolph VB, Crowley JC, Anderson LJ. Strain-Specific Reverse Transcriptase PCR Assay: Means To Distinguish Candidate Vaccine from Wild-Type Strains of Respiratory Syncytial Virus. Vol. 34, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1996.
 90. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* [Internet]. 2014 Nov 15 [cited 2020 Jan 14];30(22):3276–8. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu531>

91. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7).
92. Oliveira DBL, Iwane MK, Prill MM, Weinberg GA, Williams J V., Griffin MR, et al. Molecular characterization of respiratory syncytial viruses infecting children reported to have received palivizumab immunoprophylaxis. *J Clin Virol* [Internet]. 2015;65:26–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.016>
93. Ruzin A, Pastula ST, Levin-Sparenberg E, Jiang X, Fryzek J, Tovchigrechko A, et al. Characterization of circulating RSV strains among subjects in the OUTSMART-RSV surveillance program during the 2016-17 winter viral season in the United States. 2018 [cited 2018 Nov 11]; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200319>
94. Yu J, Liu C, Xiao Y, Xiang Z, Zhou H, Chen L, et al. Respiratory syncytial virus seasonality, Beijing, China, 2007-2015. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jun 1;25(6):1127–35.
95. Vos LM, Oosterheert JJ, Kuil SD, Viveen M, Bont LJ, Hoepelman AIM, et al. High epidemic burden of RSV disease coinciding with genetic alterations causing amino acid substitutions in the RSV G-protein during the 2016/2017 season in The Netherlands. *J Clin Virol* [Internet]. 2019 Mar [cited 2019 Mar 8];112:20–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653219300198>
96. Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J, Grulich-Henn J, Schnitzler P. Novel respiratory syncytial virus (RSV) genotype ON1 predominates in Germany during winter season 2012-13. *PLoS One*. 2014;9(10).
97. Pangesti KNA, Abd El Ghany M, Walsh MG, Kesson AM, Hill-Cawthorne GA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2019 Sep 18];28(2):e1968. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.1968>
98. Trento A, Ábrego L, Rodríguez-Fernández R, Isabel González-Sánchez M, González-Martínez F, Delfraro A, et al. Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution? 2015 [cited 2018 Dec 4]; Available from: <http://beast.bio.ed>
99. Otieno JR, Kamau EM, Oketch JW, Ngoi JM, Gichuki AM, Binter Š, et al. Whole genome analysis of local Kenyan and global sequences unravels the epidemiological and molecular evolutionary dynamics of RSV genotype ON1 strains. *Virus Evol* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2018 Oct 17];4(2). Available from: <https://academic.oup.com/ve/article/doi/10.1093/ve/vey027/5106641>
100. Otieno JR, Kamau EM, Agoti CN, Lewa C, Otieno G, Bett A, et al. Spread and evolution of respiratory syncytial virus a genotype ON1, coastal

Kenya, 2010-2015. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(2):264–71.

101. Agoti CN, Phan MVT, Munywoki PK, Githinji G, Medley GF, Cane PA, et al. Genomic analysis of respiratory syncytial virus infections in households and utility in inferring who infects the infant. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1).
102. Botosso VF, Pmda Z, Ueda M, Arruda E, Gilio AE. Positive Selection Results in Frequent Reversible Amino Acid Replacements in the G Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus. *PLoS Pathog* [Internet]. 2008 [cited 2018 Nov 13];5(1):1000254. Available from: <http://beast.bio.ed>.