

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

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 are 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 MAbs Palivizumab (PVZ) that binds to the F protein site, impossibilizing 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 to analyze the HRSV circulation in the city of São Paulo, identifying the circulating genotype and possible Palivizumab escape mutants from 2017 to 2019. A total of 3308 nasopharyngeal aspirates were received from the University Hospital. Those samples were previously tested for HRSV by immunofluorescence assay, resulting in 817 (24,7%) positive samples for HRSV and 383 (46,9%) of those were analyzed 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 amino acid 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 has a major public health importance, containing a plastic surface glycoprotein capable of resistance to 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*

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

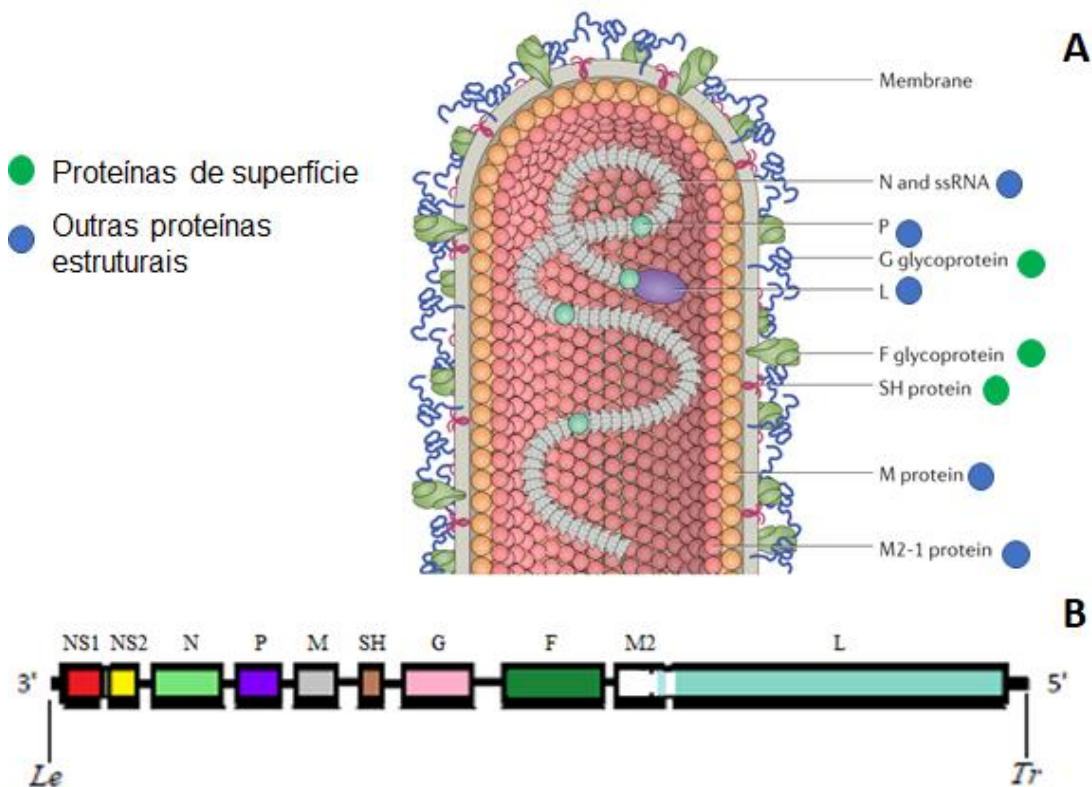
até 3.8 milhões de admissões hospitalares e 74.500 mortes de crianças menores de 5 anos em todo o Mundo. Em crianças de até 6 meses, estima-se 1.7 milhões de admissões hospitalares resultando em 36.200 mortes (11)

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 filamentoso, 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

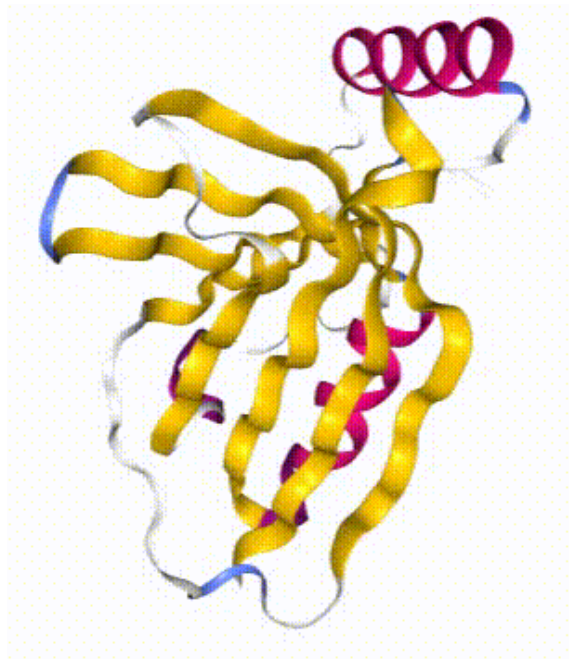
O genoma do vírus é flanqueado por duas regiões extra-gênicas, *Leader* e *Trailer*, sendo a primeira composta por 44 nucleotídeos (nt) localizada na porção 3' do genoma e possui a função de sinalização de início de transcrição do genoma viral e recrutamento da polimerase. A região *Trailer* se localiza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

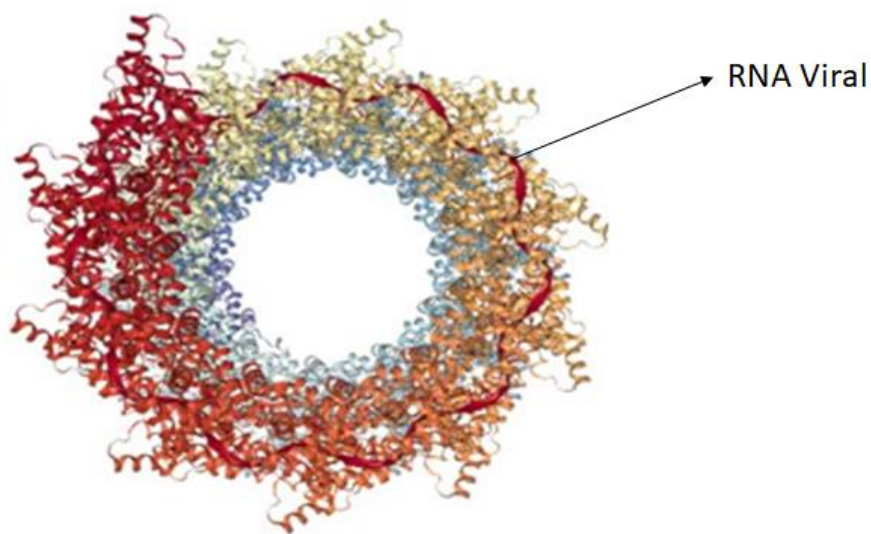
As primeiras proteínas a serem traduzidas são as não estruturais, NS1 e NS2 de 139 e 124 aminoácidos (AA) respectivamente. Ambas inibem a apoptose e antagonizam a produção de Interferon I e III (2,16,17), promovendo maior tempo de vida da célula infectada e concomitante maior replicação viral (14). A 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).

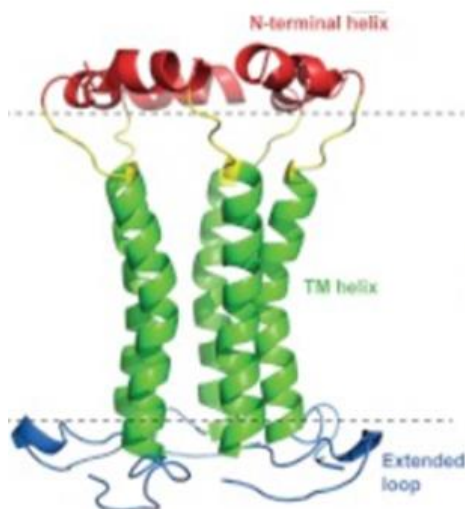
O gene M codifica a proteína de Matriz que possui 256 AA. Ao início da infecção essa proteína é encontrada no núcleo celular e no final é encontrada no citoplasma. Sua função no núcleo ainda é desconhecida (22) entretanto no citoplasma, a proteína tem a função de ordenar a montagem viral e seu brotamento. 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, SH_p e SH_i. A variante SH_i 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)

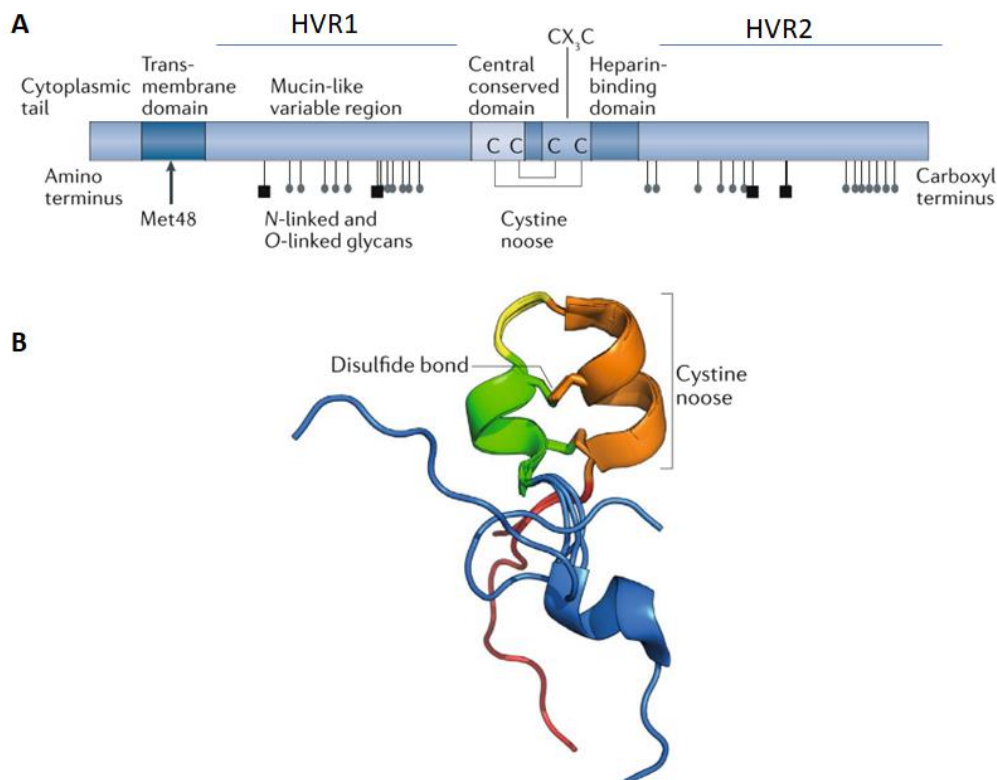


A proteína G é uma glicoproteína de superfície tipo II de aproximadamente 296 AA, variando de acordo com o subtipo viral (14). Ela é dividida em três domínios: citoplasmático, transmembrânico e extracelular. O domínio citoplasmático e transmembrânico são relativamente conservados entre os subtipos e 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).

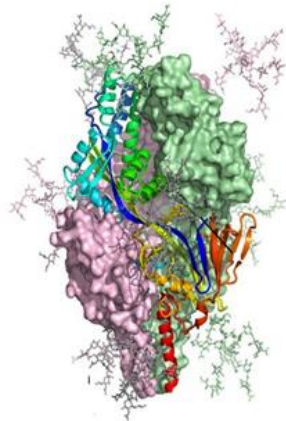
O gene F codifica a proteína responsável pela fusão celular e conseqüentemente a formação de sincícios das células infectadas (14) Ela possui 575 AA que são primeiro codificados em um precursor inativo F0. Esse precursor possui um sítio de clivagem de 27 AA (região N-terminal). A clivagem do precursor 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.

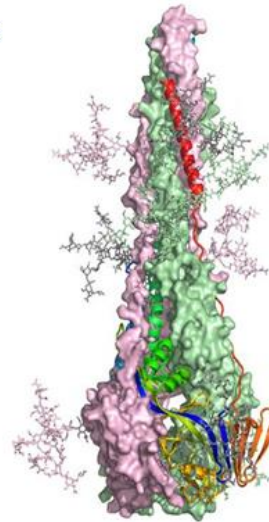
Figura 6 - Conformação estrutural da proteína F nas fases de pré - fusão do envelope viral **(A)** e pós - fusão **(B)**. Adaptado de: McLellan, 2013 (50)

A



Forma Pré-Fusão

B

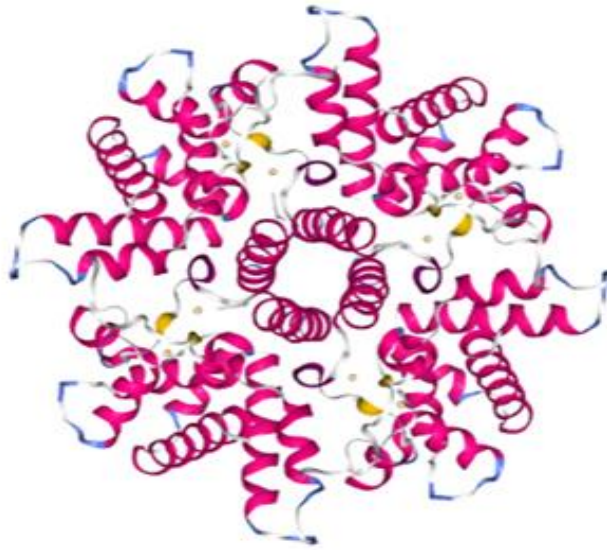


Forma Pós-Fusão

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).

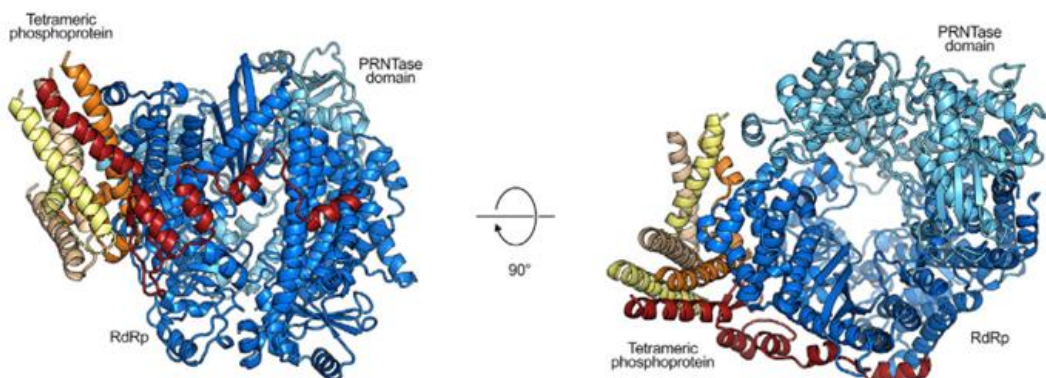
O gene M2 codifica duas proteínas: uma estrutural, M2-1 (Figura 7), e uma não estrutural, M2-2. Estas proteínas possuem 194 e 90 AA respectivamente. A proteína M2-1 interage com as proteínas N, P e L prevenindo a terminação precoce do genoma viral atuando como um fator de transcrição(14,52). A proteína 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 nucleocapside 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 cápside, 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 for 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 borteamento viral. Adaptado de Battles, 2019 (12).

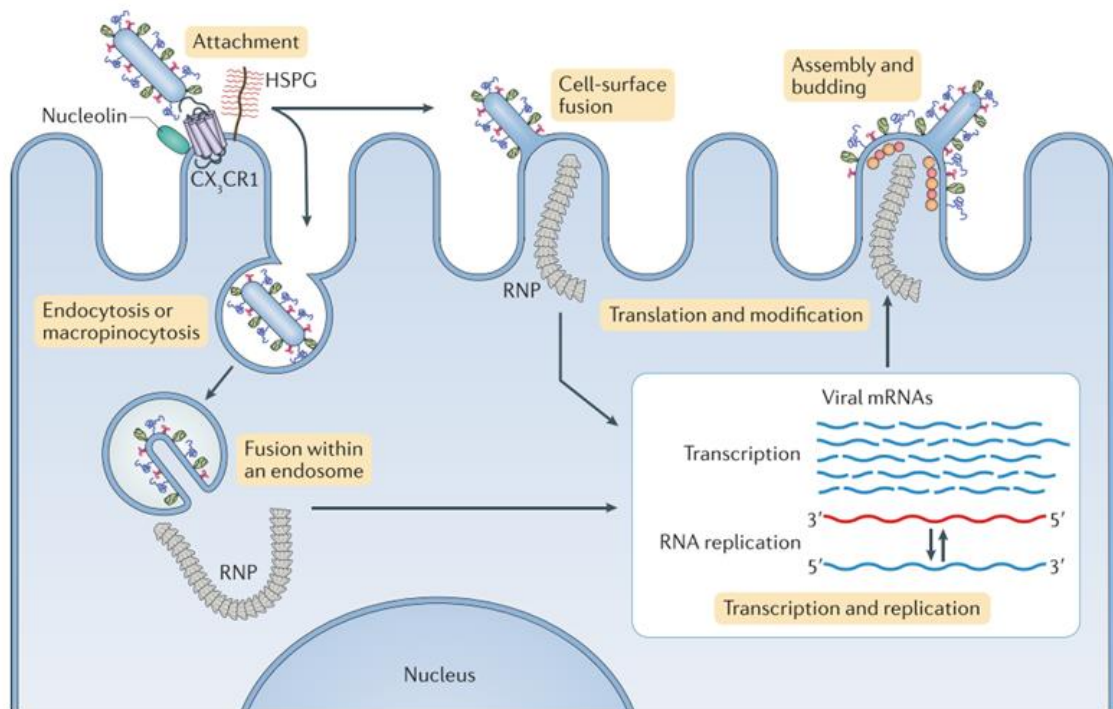
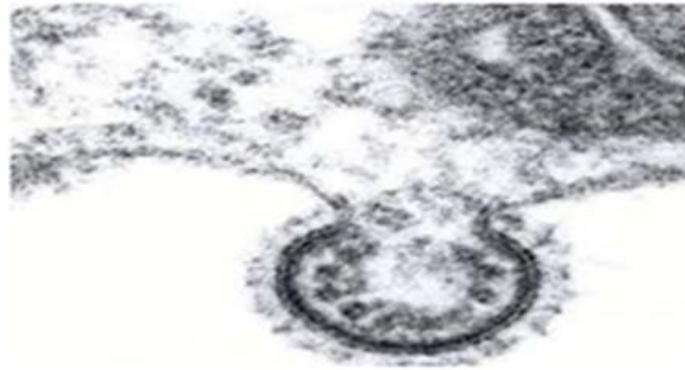


Figura 10 - Brotamento do HRSV, demonstrado por micrografia eletrônica.
Fonte: Garofalo, 2013 (60)



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)

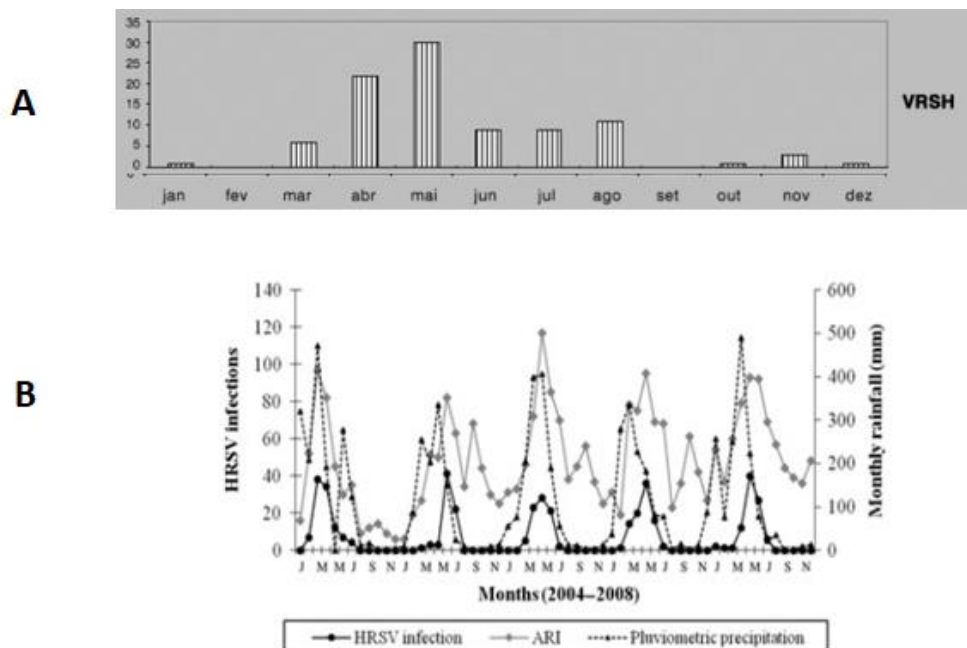
Em adultos, o HRSV causa infecções mais leves, muitas vezes assintomáticas, podendo levar a quadros de resfriado com rinorreia, cefaleia, tosse e irritação das vias respiratórias superiores. Em idosos, a infecção pode levar a quadros de pneumonia importantes (64)

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)

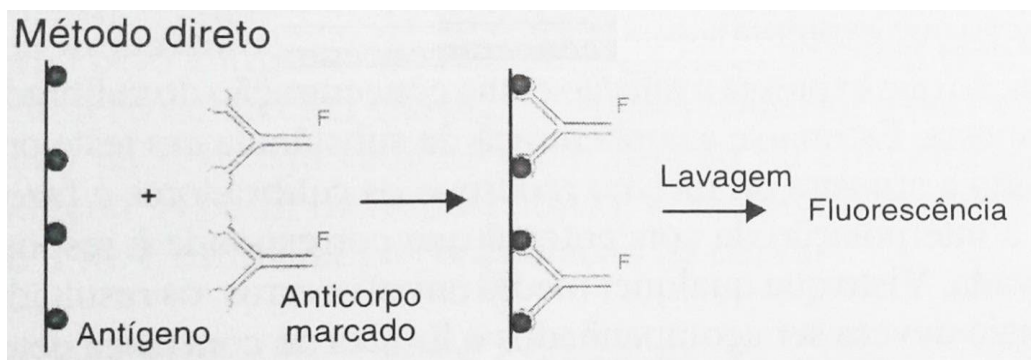


Figura 12 - Representação do teste indireto de imunofluorescência. Fonte: FERREIRA, 2011(70)

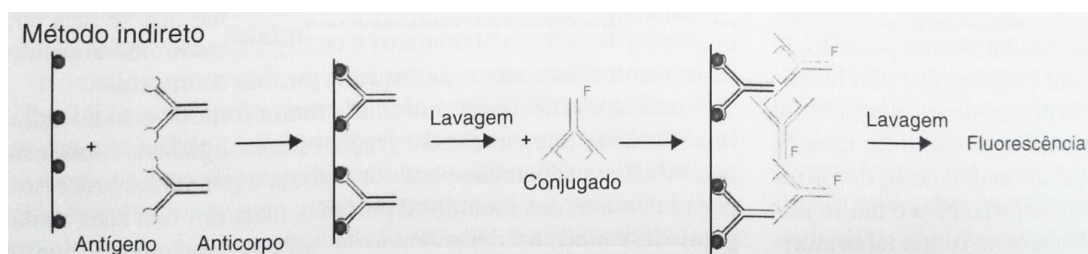
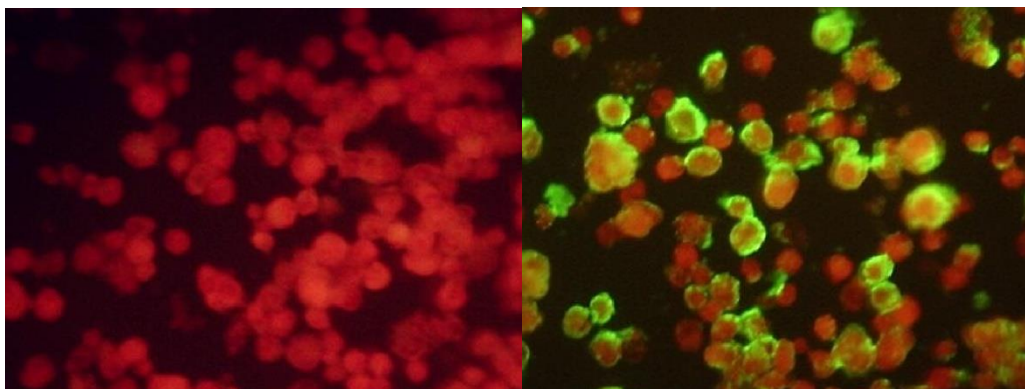


Figura 13 - Ilustração de um resultado de IFI para o HRSV. Legenda: Esquerda: negativo; direita: positivo. Fonte: Thomazelli *et al.*, 2004.(71)



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)

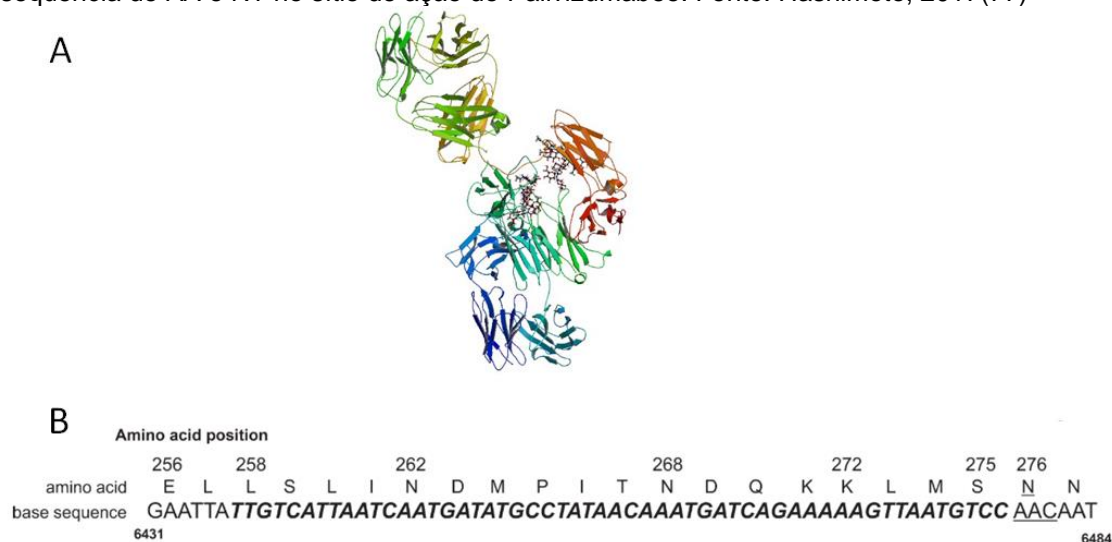
Ainda não há vacina disponível para o HRSV, mas diversos estudos estão em desenvolvimento e muitos candidatos já se encontram em testes clínicos. A maior dificuldade encontrada é a falta de imunidade a longo prazo devido a escapes das proteínas virais mais imunogênicas (G e F) e ainda a falta de total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

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, Vonnrhein 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. Grdzlishvili 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: Lippincott 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, Rodriguez-Fernandez 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>.