

**JEAN PAULO LOPES ZUKUROV**

**Caracterização molecular de Vírus Respiratório  
Sincicial Humano (HRSV) isolados na cidade de  
São Paulo no período de 2007 a 2008**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação Interunidades em  
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para  
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo  
2010

**JEAN PAULO LOPES ZUKUROV**

**Caracterização molecular de Vírus Respiratório  
Sincicial Humano (HRSV) isolados na cidade de  
São Paulo no período de 2007 a 2008**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

São Paulo

2010

## RESUMO

Zukurov JPL. **Caracterização molecular do Vírus Respiratório Sincial Humano (HRSV) isolados na cidade de São Paulo no período de 2007-2008.** [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O Vírus Respiratório Sincial Humano (HRSV) é considerado o principal causador de doenças agudas do trato respiratório inferior durante a infância, sendo o principal responsável por um elevado índice de hospitalização de crianças com até cinco anos de idade. Possui distribuição mundial, podendo acometer todas as faixas etárias, entretanto as crianças de 6 semanas a 9 meses são as que desenvolvem problemas mais sérios, como pneumonia e bronquiolite. A epidemia de HRSV apresenta uma sazonalidade bem clara, ocorrendo anualmente no período de outono tardio, inverno ou início da primavera, mas não durante o verão. No presente estudo foi realizada a análise da região G2 da glicoproteína G do HRSV. Um total de 44 amostras positivas para o HRSV do Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo (USP), nos anos de 2007-2008, foram seqüenciadas e posteriormente analisadas, sendo então comparadas com seqüências obtidas do NCBI/GeneBank. A análise filogenética mostrou que os genótipos GA2 e GA5, do grupo A, foram os predominantes nos anos de 2007 e 2008, alternando o padrão verificado nos anos anteriores, onde os genótipos do grupo B foram altamente predominantes. A comparação das mutações sinônimas e não sinônimas mostrou uma grande evidência de seleção positiva nos genótipos GA2 e GA5 do grupo A.

**Palavras-chave:** Vírus Respiratório Sincial Humano. Glicoproteína G. Variabilidade genética. Análise Filogenética. Região G2. Inserção de 60 nucleotídeos. seleção positiva.

## ABSTRACT

Zukurov JPL. **Characterization and epidemiologic of Human respiratory syncytial virus (HRSV) isolated in Sao Paulo's city in 2007-2008.** [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is considered the most common cause of lower respiratory tract disease in infants and young children and are the main guilty for the elevated children hospitalization's rate under 5 years of age. The HRSV has a world-wide distribution, being able to attack all the ages however the 6 weeks to 9 month's children of are the ones that develop more serious problems as pneumonia and bronchiolite. The HRSV outbreak presents a well defined season, occurring annually in the delayed fall's period, winter or spring's beginning, but not during the summer. In the present study, we performed a phylogenetic analysis from G2 region of HRSV G glycoprotein. Forty four samples positive for HRSV from University Hospital (UH) of University of Sao Paulo (USP) in 2007-2008, were submitted to sequencing by PCR and compared with GenBank sequences. Phylogenetic analysis revealed that HRSV group A genotypes GA2 and GA5 was the predominant in 2007-2008, alternating the standard verified in the previous years, where the group B genotypes had been highly predominant. Comparison of the synonymous/nonsynonymous mutation ratios showed greater evidence for positive selection pressure for group A genotypes GA2 and GA5.

**Keywords:** Human Respiratory Syncytial Virus. G Glycoprotein. Genetic Variability. Phylogenetic Analysis. G2 Region. 60-nucleotide duplication. positive selection.

## 1 INTRODUÇÃO

O primeiro relato do Vírus Respiratório Sincicial (RSV) ocorreu em meados da década de 50. No ano de 1955, uma enfermidade respiratória contagiosa que se caracterizava por tosse, espirro e secreção mucopurulenta foi relatada em uma colônia de aproximadamente 20 chimpanzés no *Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) Washington, D.C, USA*. No decorrer deste evento, foi isolado pela primeira vez, a partir de um *swab* de garganta de um chimpanzé fêmea, o Vírus Respiratório Sincicial (RSV), chamado neste momento de Agente da Coriza do Chimpanzé (*Chimpanzee Coryza Agent - CCA*) (Morris *et al.*, 1956).

No ano seguinte, em 1956, pesquisadores isolaram um vírus idêntico ao CCA de uma criança com pneumonia e de outra com crupe, em Baltimore, nos Estados Unidos da América (EUA). O agente passou a ser denominado Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) por refletir sua capacidade de formar sincícios em cultura de células e seu tropismo pelo trato respiratório humano (Chanock e Finberg, 1957b; Chanock *et al.*, 1957a).

Estudos sorológicos posteriores mostraram que a maior parte das crianças de Baltimore já havia sido infectada pelo HRSV antes de atingir os quatro anos de idade. Outros estudos, realizados em diversas regiões do mundo, apontaram o HRSV como um agente associado a doenças no trato respiratório inferior (TRI), bronquiolite e pneumonia, sendo mais tarde reconhecido como principal patógeno de doenças do TRI em crianças. Posteriormente também foi constatado que este vírus estava associado a grupos de imunocomprometidos, pessoas com doenças cardiopulmonares, idosos e transplantados (Chanock *et al.*, 1957; Collins *et al.*, 2001; Falsey e Walsh, 2000).

O HRSV é o principal causador de doenças agudas do trato respiratório inferior (TRI) durante a infância, sendo o principal responsável por um elevado índice de hospitalização de crianças com até 5 anos de idade (Glezen, 1986; Cintra, 2001). Aproximadamente 95% das crianças apresentam a primeira infecção pelo HRSV nos primeiros dois anos de vida com o pico de incidência ocorrendo nos primeiros meses de vida (Anderson *et al.*, 1990). No Brasil, o HRSV foi isolado pela primeira vez por Candeias, no ano de 1964, em quatro crianças hospitalizadas com quadro respiratório agudo. A confirmação do isolamento em cultura celular foi feita por prova de neutralização com soro padrão (Candeias, 1967).

Segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), setembro de 2009, o HRSV possui uma distribuição mundial amplamente difundida,

principalmente, em países em desenvolvimento, como o Brasil, e também em países industrializados. Apenas nos Estados Unidos da América (EUA) são reportados anualmente 125.000 casos de infecção respiratória pelo HRSV. Mundialmente são estimados 64 milhões de casos de infecção pelo HRSV com, aproximadamente, 160.000 mortes por ano no mundo inteiro em decorrência de complicações causadas pela infecção do HRSV.

### 1.1 CLASSIFICAÇÃO

O HRSV pertence à ordem *Mononegavirales*, à qual fazem parte os vírus da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovirus*. A partícula do HRSV não apresenta as proteínas de superfície Hemaglutinina e Neuraminidase, encontradas nos vírus Influenza e sua classificação é baseada na morfologia da partícula (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

O genoma do HRSV é constituído por RNA de fita simples (ssRNA) com polaridade negativa, associado às proteínas virais, formando um nucleocapsídeo helicoidal, resistente à ação de RNAses. O vírus HRSV utiliza uma RNA Polimerase própria sintetizada dentro da célula hospedeira e o processo de replicação viral ocorre no citoplasma da célula hospedeira. O HRSV é um vírus extremamente lábil. Este vírus é muito sensível a extremos de temperatura e pH, bem como a detergentes. A 55 °C é rapidamente destruído e, a 37 °C apenas 10% de sua infectividade permanece após 24 horas. Após o armazenamento em temperatura de 4 °C, durante o período de uma semana, somente 1% de sua infectividade é preservada (Tristram e Welliver, 1996).

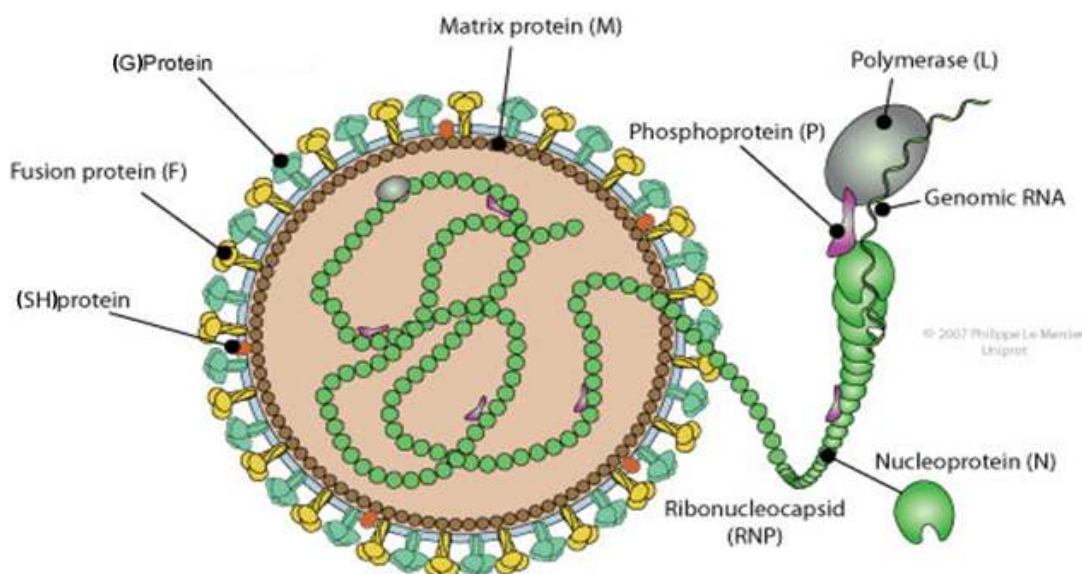
### 1.2 ESTRUTURA

O HRSV é composto de um nucleocapsídeo envelopado de simetria helicoidal, com diâmetro variável entre 12 e 15nm. O HRSV é pleomórfico e/ou possui morfologia esférica. O seu envelope consiste de uma camada bilipídica com origem na membrana citoplasmática da célula hospedeira. Possui espículas que são as glicoproteínas F e G de origem viral. A estrutura final envelopada apresenta entre 150 a 300nm (Collins *et al.*, 2001) (Figura 01).

Cada partícula viral contém uma única cópia funcional do genoma. O genoma viral é composto de RNA de fita simples não segmentado de polaridade negativa. Por não ser um vírus segmentado o HRSV não possui a mesma capacidade de recombinação e rearranjos dos segmentos genômicos do vírus Influenza, no qual

ocorrem os *shifts* antigênicos, responsáveis pelas diversas pandemias ao longo dos anos. Contudo, como todos os vírus RNAs, a capacidade de mutação do HRSV reside na dependência de uma RNA polimerase própria e que não possui capacidade de correção e edição de erros de incorporação de nucleotídeos durante o processo replicativo do genoma. O peso molecular do seu genoma aproximado é de  $5 \times 10^3$  kD e contém 15.222 nucleotídeos, por convenção com o protótipo A2 Long, porém este número pode variar entre subtipos diferentes (Collins *et al.*, 2001; Sullender, 1998; Welliver, 2003).

O genoma do HRSV codifica 10 mRNAs distintos e 11 proteínas: duas proteínas não estruturais designadas como NS1 e NS2; dentre as proteínas estruturais, três são proteínas de superfície transmembranica (G, F e SH); duas proteínas estão presentes na matriz do vírus e são conhecidas por M e M2; três estão associadas ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral (N, P e L) (Collins *et al.*, 1996).

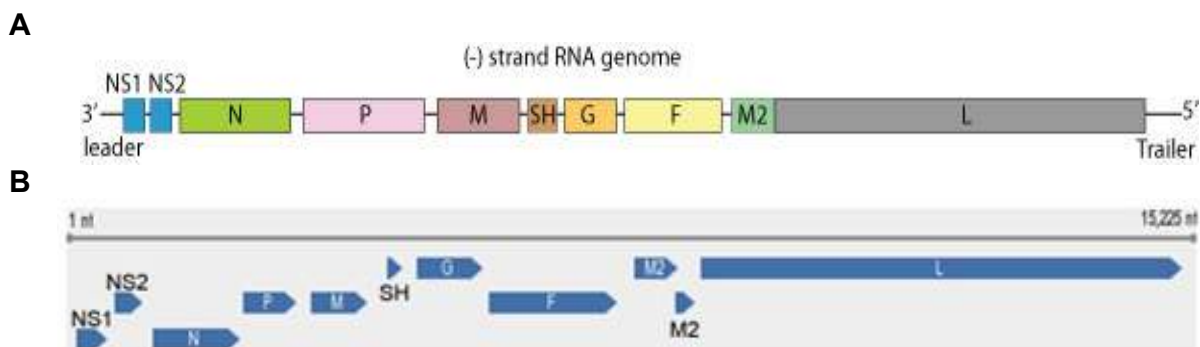


**Figura 01 - Estrutura do HRSV.**

FONTE: Swiss Institute of Bioinformatics. ViralZone® [database]. Suíça: SIB; 2009. [cited 08/10/2009]. Available from: [http://www.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/90.html](http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/90.html)

### 1.3 ESTRUTURA GENÔMICA

O HRSV possui 10 RNAs mensageiros (mRNA) subgenômicos. Cada um possui uma ORF (*Open Reading Frame*), exceto o M2, que possui duas, que codificam as proteínas M2-1 e M2-2 (Collins *et al.*, 2001). Na porção 3' do RNA genômico, há uma região extragênica não codificante de 44 nucleotídeos (região *leader*). A região *leader* é seguida por dez genes virais, que obedecem a seguinte ordem: 3' – NS1 – NS2 – N – P – M – SH – G – F – M2 – L – 5' (Figura 2).



**Figura 02 - Genoma do HRSV.**

(A) Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics. ViralZone® [database]. Suíça: SIB; 2009. [cited 08/10/2009]. Available from: [http://www.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/90.html](http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/90.html).

(B) Fonte: (National Center for Biotechnology Information) [database]. EUA: NCBI; 2009. [cited 08/10/2009]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=11728>.

O gene L é seguido de uma região extragênica de 155 nucleotídeos, conhecida como região *trailer*, que é mais tolerante a inserção ou deleção de nucleotídeos que a região *leader*. Todos os genes do HRSV começam com um sinal altamente conservado em seu início, composto por nove nucleotídeos (3'-CCCCGUUUA), com exceção do gene L cuja sequência apresenta as seguintes diferenças: (3'-CCCUGUUUUA). Ao término de cada gene ocorre com um sinal semi conservado que direciona a terminação transcricional e a poliadenilação (Collins *et al.*, 2001). Os primeiros nove genes, do HRSV, são separados por regiões intergênicas que variam de 1 a 56 nucleotídeos. Essas regiões são pouco conservadas entre amostras. Os dois últimos genes fazem uma sobreposição (*overlapping*) de 68 nucleotídeos. Assim sendo o gene L tem o início de sua transcrição dentro do gene M2, entretanto numa fase de leitura diferente, sendo que o sinal de término e poliadenilação do gene M2 está localizado dentro do gene L (Collins *et al.*, 2001).

**Tabela 01 - Características dos genes do HRSV e seus produtos**

Gene	Tamanho do gene (nucleotídeos)	Tamanho da Proteína (a.a.)	Peso proteína não processada (KDa)	Peso proteína processada (KDa)
N	1203	391	43	45
P	914	241	27	33
L	6578	2165	250	250
M2-1	582	194	22	22
F	1903	574	63	70
G*	923	298	33	90
SH	410	64	8	8
M	958	256	29	25
NS1	532	139	16	14
NS2	503	124	15	15
M2-2	270	90	11	11

\* Existe algumas divergências relacionadas ao tamanho do gene da glicoproteína G (Trento *et al.*, 2006).

FONTE: (Carromeu, 2007)



## 1.4 PROTEÍNAS VIRAIS

O nucleocapsídeo presente nos vírions do HRSV é formado pelo RNA genômico associado com as proteínas N, P, L e M2-1 (Collins *et al.* 2001). A associação entre as proteínas N, P e L com o RNA viral já é suficiente para dar início a replicação do material genético (Collins *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1995). No entanto, a proteína M2-1 é necessária para uma transcrição eficiente do genoma pela RNA polimerase viral (Fearn e Collins, 1999; Hardy e Wertz, 1998).

A proteína N possui 391 aminoácidos e peso molecular de 43,4 KDa, está associada ao RNA genômico e é a principal proteína estrutural do nucleocapsídeo (Collins *et al.*, 2001). O RNA genômico e anti-genômico do HRSV encontra-se sempre associado com a proteína N e este complexo é usado como molde para a síntese de RNA. Este complexo proteína N-RNA apresenta diversas funções para o vírus, prevenindo a formação de estruturas secundárias na molécula de RNA e protegendo a mesma de degradação por nucleases (Cowton *et al.*, 2006).

A proteína P possui 241 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 35 KDa. É uma proteína altamente fosforilada, com caracter ácido e que desempenha uma importante função no processo de transcrição e replicação do HRSV (Collins *et al.*, 2001). A proteína P constitui uma subunidade da polimerase viral (formada pelas proteínas P e L) e, por analogia com outros vírus pertencentes à ordem *Mononegavirus*, parece mediar o contato entre a proteína L e o complexo proteína N-RNA (Tran *et al.*, 2007).

A proteína L é a maior proteína do HRSV. Esta proteína é constituída de 2165 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 250 KDa. Esta proteína apresenta seis segmentos altamente conservados e com possíveis domínios funcionais. Esta é a proteína estrutural de menor abundância na partícula viral (Collins *et al.*, 2001). Atribui-se a essa proteína as atividades enzimáticas de RNA - polimerase, com função de replicação, além de poliadenilação, como também a formação da estrutura *cap* do mRNA do HRSV (Barik, 1992; Barik, 1993; Mason *et al.*, 2004).

As proteínas NS1 (peso molecular de 15,5 KDa) e NS2 (peso molecular de 14,6 KDa) possuem, respectivamente, 139 e 124 aminoácidos. Estas proteínas exercem uma importante função como agente antagonista do fator Interferon (INF) do tipo-1 durante a resposta antiviral imunológica inata. As proteínas NS1 e NS2 atuam em conjunto de forma cooperativa na repressão da ativação e translocação nuclear do INF-3 das células hospedeiras. Estas proteínas medeiam a degradação das proteínas

hospedeiras STAT2 e elongin-cullin E3 ligase e inibem a apoptose celular de forma prematura, facilitando o crescimento e replicação viral dentro das células hospedeiras (Collins *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005).

A proteína M (peso molecular de 27 KDa) possui 256 aminoácidos, é uma proteína interna e não glicosilada. Essa proteína está associada ao nucleocapsídeo do HRSV nas células infectadas e no vírion e, como as proteínas de matriz de outros vírus de RNA fita negativa, pode inibir a transcrição viral (Ghildyal *et al.*, 2002). A associação da proteína M com o nucleocapsídeo facilita a montagem do vírus (Lenard *et al.*, 1996).

A proteína M2-1 (peso molecular de 22 KDa) possui 194 aminoácidos. Essa proteína é interna e não glicosilada e interage com as proteínas N e P, atuando no processo de transcrição, evitando seu término prematuro. Esta proteína facilita a assim a síntese completa do mRNA do HRSV (Collins *et al.*, 2001). Esta proteína também apresenta função de processividade e anti-terminação, ou seja, atua como um fator que permite o trânsito da polimerase através da região intergênica para acessar promotores gênicos distais (Hardy e Wertz, 1998). Essa proteína tem uma função muito importante na replicação do HRSV e alterações em sua sequência podem diminuir drasticamente a infectividade do vírus (Tang *et al.*, 2001). A proteína M2-2 possui 90 aminoácidos, peso molecular de 11 KDa e está relacionada à regulação da transcrição e replicação da molécula de RNA do HRSV (Atreya *et al.*, 1998). A proteína M2-2, quando expressa em altos níveis, inibe completamente a replicação do HRSV, sugerindo que essa proteína, quando produzida nas células infectadas em grande quantidade, pode ser um fator crítico na replicação do HRSV (Cheng *et al.*, 2005).

A proteína SH é uma molécula pequena com 64 aminoácidos e peso molecular de, aproximadamente, 7,5 KDa. Esta proteína insere-se que na membrana citoplasmática da célula hospedeira por meio de uma sequência hidrofóbica que vai do aminoácido de número 14 ao 41. As regiões carboxila e amino - terminais possuem sítios em potencial para N e O – glicosilação, podendo mudar a estrutura terciária da proteína. Até pouco tempo atrás a função da proteína SH, durante o processo de replicação, ainda, não estava totalmente esclarecido e acreditava-se estar envolvida na adsorção, penetração e desnudamento do vírus (Collins *et al.*, 2001; Techaarpornkul, *et al.*, 2001; Feldman *et al.*, 2000; Rixon *et al.*, 2004). Recentemente foi demonstrado que esta proteína forma um canal iônico próton seletivo, na membrana citoplasmática da célula hospedeira, atuando na montagem do vírus e durante o processo de entrada na célula hospedeira. Esta proteína também pode apresentar função de resposta contra a imunidade inata da célula hospedeira (Fuentes *et al.*, 2007).

A glicoproteína F é uma proteína do tipo I, ou seja, está ancorada na membrana próxima à região carboxila-terminal (intracitoplasmática) e contém uma sequência sinal de clivagem próxima à região amino terminal (localizada na parte externa da membrana citoplasmática). Possui 574 aminoácidos, peso molecular de 70 KDa e o gene que a codifica possui 1903 nucleotídeos. Identificada como proteína de fusão, é a responsável pela ligação do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira, liberando o nucleocapsídeo diretamente dentro do citoplasma. Proporciona também a fusão da célula infectada com uma adjacente, favorecendo a formação de sincícios (Collins *et al.*, 2001).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo denominado F0 que consiste em dois domínios denominados F2 (aminoácidos 1-130) e F1 (aminoácidos 137-154) e de um peptídeo clivável (aminoácidos 131-136) (Rixon *et al.*, 2001; Sugrue *et al.*, 2008). Após a síntese e a glicosilação, a proteína F0 é clivada proteoliticamente por uma protease celular, semelhante à tripsina, em duas subunidades, F2 (peso molecular de 20 KDa) e F1 (peso molecular de 68 KDa), que permanecem ligadas por pontes dissulfeto nos resíduos cisteína (Schlender *et al.*, 2003). Para *Pneumovirus* e *Paramyxovirus*, em geral, os primeiros 19 a 26 aminoácidos da porção amino terminal da subunidade F1 são hidrofóbicos e estão diretamente envolvidos com a inserção na membrana (Collins *et al.*, 2001; Tristram e Welliver, 1996). A subunidade F1 é relativamente bem conservada, sendo sua função comprometida mediante deleções ou substituições de aminoácidos (Collins *et al.*, 2001).

Estudos recentes sobre a interação das proteínas F, G e SH, sugerem que as proteínas F e G formem um complexo na superfície das células infectadas pelo HRSV, porém não encontraram nenhuma evidência de que as três proteínas juntas formem um complexo. Apesar dos mecanismos que levam a fusão de membrana em células infectadas pelo HRSV ainda não serem bem entendidos, as associações entre as proteínas G e F encontradas nesse estudo, sugerem que a proteína G tem papel indireto no processo de fusão (Low *et al.*, 2008).

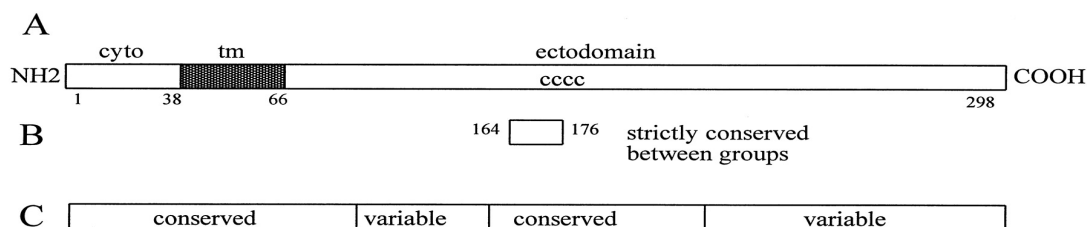
A glicoproteína G é uma proteína do tipo II, ou seja, está ancorada à membrana próxima à sua porção amino-terminal por um domínio hidrofóbico, não clivável, tipo sinal âncora, que se estende do resíduo 38 ao 66. Possui de 289 a 319 aminoácidos, dependendo da amostra viral, o gene que a codifica possui, em geral 918 nucleotídeos (grupo A) e varia de 920 a 980 nucleotídeos para o grupo B (Johnson *et al.*, 1987; Martinez *et al.*, 1999; Trento, *et al.* 2003; Zlateva, *et al.* 2004).

A glicoproteína G é sintetizada como uma proteína de peso molecular de 33 KDa, sendo posteriormente glicosilada para a obtenção da sua forma madura de peso molecular de 90 KDa. O ectodomínio carboxila-terminal da proteína G caracteriza-se por conter um alto teor de serina e treonina, cerca de 30% que são potenciais sítios de ligação de glicídios por ligações glicosiladas do tipo “O”, ou seja, a ligação de glicídios a átomos de oxigênio das cadeias destes aminoácidos. A glicosilação da proteína também se faz por ligação glicosídica tipo “N”, ou seja, a ligação de glicídios ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral da asparagina. O ectodomínio externo contém, portanto, de 3 a 8 sítios para adição de oligonucleotídeos por ligação glicosídica tipo “N” e mais de 70 sítios potenciais para adição de oligossacarídeos por ligação glicosídica tipo “O”, embora estime-se que a proteína madura possua de 24 a 25 cadeias de glicídios O-ligados (Wertz *et al.*, 1985; Johnson, *et al.*, 1987). Possui também um alto teor de resíduos de prolina (cerca de 10%) o que contribui para a redução das estruturas secundárias da proteína (Collins *et al.*, 2001). Devido a sua constituição, foi sugerido que a glicoproteína G do HRSV seria homóloga às mucinas secretadas pelas células epiteliais (Johnson, *et al.*, 1987).

Estudos recentes demonstraram que a glicoproteína G liga-se a membrana citoplasmática, na superfície da célula hospedeira, interagindo com heparan sulfato, sendo importante para a ligação do vírion à célula hospedeira no início da infecção. Esta proteína também interage com o receptor celular CX3CR1, modulando assim a resposta imunológica do hospedeiro e facilitando a infecção (Beeler *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2008).

A glicoproteína G é uma proteína de especial interesse por possuir a maior variabilidade entre os isolados de HRSV (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985; Gimenez *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1987). Pode suportar inserções e deleções ou múltiplas substituições de aminoácidos sem a perda de sua função (Trento *et al.*, 2003; Sato, *et al.* 2005; Scott *et al.*, 2004; Zlateva *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2004). A variabilidade da proteína G está concentrada no domínio extracelular, no qual se encontram duas regiões variáveis, que contém alto conteúdo de serina e tronina, entre os aminoácidos 69-164 e 207-298, com aproximadamente 56% de divergência entre as amostras A e B (Johnson *et al.*, 1987). Intercalando essa região de alta variabilidade, existe uma região mais conservada com um pequeno segmento de 13 aminoácidos (164-176) e quatro resíduos de cisteína (C<sup>173</sup>, C<sup>176</sup>, C<sup>182</sup>, C<sup>186</sup>), conservados em todas as amostras de HRSV (Sullender, 2000), sugerindo ser este segmento o responsável pela ligação do vírus a um receptor celular.

A grande variabilidade genética da proteína G vem sendo estudada ao longo dos anos e diversos mecanismos de escape do HRSV, baseados nessa variabilidade, vêm sendo elucidados (Arbiza *et al.*, 2005; Galiano *et al.*, 2005; Sullender *et al.*, 1998; Zlateva *et al.*, 2005). Essas regiões variáveis encontram-se entre os aminoácidos 69-164 e 207-298, podendo ser observada uma divergência de até 53% entre amostras dos grupos A e B (Johnson *et al.*, 1987). A região que compreende os aminoácidos 164-176 e os quatro resíduos de cisteína (C<sup>173</sup>, C<sup>176</sup>, C<sup>182</sup>, C<sup>186</sup>) é conservada em todas as amostras de HRSV, sugerindo que esse fragmento seja o responsável pela ligação do vírus a um receptor na célula hospedeira (Figura 3) (Sullender, 2000).



**Figura 03 - Domínios conservados e variáveis da glicoproteína g do HRSV**

(A) Estrutura primária dos aminoácidos da proteína G, de isolado A2. cyto = domínio interno a membrana citoplasmática, tm = domínio transmembrânico, cccc = quatro resíduos conservados do aminoácido cisteína (C<sup>173</sup>, C<sup>176</sup>, C<sup>182</sup>, C<sup>186</sup>).

(B) Região de 13 aminoácidos, estritamente conservada nas amostras de HRSV;

(C) Regiões variáveis da proteína G intra e intergrupos do HRSV, ricas no aminoácido serina e treonina e também as regiões conservadas.

Fonte: (Sullender, 2000)

## 1.5 CICLO REPLICATIVO DO VÍRUS

A macromolécula utilizada como receptor celular para a adsorção do HRSV à célula hospedeira ainda permanece desconhecido. Para o gênero *Morbillivírus*, que diferentemente dos outros gêneros não possui atividade de neuraminidase, foi descoberto que o receptor celular é o CD46. Para o gênero *Respirovírus* e *Rubulavírus* da subfamília *Paromyxovirinae*, o receptor celular é uma molécula que contém ácido siálico. Para os *Pneumovírus* especula-se a possibilidade de que o receptor também não seja uma molécula contendo ácido siálico, uma vez que nesse gênero, assim como nos *Morbillivírus*, não existe a presença de uma neuraminidase (Collins *et al.*, 2001; Kingsbury, 2001).

Após a adsorção do vírion à célula hospedeira ocorre a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. Esse evento conhecido como desnudamento é mediado por uma proteína de superfície, a glicoproteína F, que é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular, promovendo a liberação do nucleocapsídeo diretamente no citoplasma da célula hospedeira (Kingsbury, 2001).

Com o nucleocapsídeo liberado no citoplasma tem início o processo de

transcrição do genoma viral. A enzima RNA polimerase RNA dependente adere - se à região *leader* que se localiza no extremo 3' do genoma e não apresenta função codificadora. A transcrição é iniciada no primeiro nucleotídeo. Na junção entre a região *leader* e o primeiro gene, inicia-se a transcrição por um mecanismo sequencial de início-fim, guiada pelos sinais de início (*start-gene*) e fim (*end-gene*). O resultado deste processo é a síntese de uma série de mRNAs subgenômicos. Os mRNAs parecem ser cópias exatas dos genes, não havendo evidências de modificações como, por exemplo, *splicings* alternativos. Os mRNAs transcritos recebem um *cap* na extremidade 5' e são poliadenilados na extremidade 3' (Collins *et al.*, 2001).

A maturação do vírus ocorre com a montagem do nucleocapsídeo pela combinação da proteína N com o RNA genômico seguida da adição das proteínas P e L. A montagem do envelope ocorre com as glicoproteínas virais, modificadas pós-traducionalmente por glicosilação durante seu transporte através do retículo endoplasmático e do Complexo de Golgi, ocupando o lugar das proteínas celulares na membrana plasmática. Em seguida, as proteínas da matriz se agregam na porção interna do envelope nascente. Por último, o nucleocapsídeo alcança a superfície e ocorre o brotamento do mesmo, levando consigo uma porção da membrana plasmática (Kingsbury, 2001).

## 1.6 CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA E MOLECULAR

Os primeiros pesquisadores a desvendar as diferenças antigênicas entre duas amostras (A1 e Long) do HRSV foram Coates e Kendrick (1963). Em um estudo seguinte, Coates *et al.*, (1966) observaram diferenças antigênicas entre outras amostras virais, Long e CH18537. A cepa Long foi isolada em 1956 de uma criança com pneumonia, enquanto a cepa CH-18537 foi isolada em 1962 de uma criança com doença do trato respiratório superior. Ambos os estudos utilizaram a reação de neutralização com soro de animal hiperimune (coelhos ou cobaias). A cepa A1 não era neutralizada com soro hiperimune de coelhos produzido com a cepa, sugerindo, assim, que diferentes variantes poderiam estar circulando simultaneamente na mesma população. Outros estudos confirmaram as observações anteriores (Coates *et al.*, 1966; Wulff *et al.*, 1964).

Com o advento dos anticorpos monoclonais (MAbs) essas diferenças antigênicas puderam ser melhor definidas (Gimenez *et al.*, 1984; Anderson *et al.*, 1985). A variabilidade antigênica pode ser visualizada através da diferenças de títulos de anticorpos neutralizantes. Os títulos de anticorpos neutralizantes podem ser

maiores na ordem de até quatro vezes quando testado com amostras do mesmo grupo. Foram examinados MAb's para as proteínas P e N e as glicoproteínas F e G. Com base na reatividade com um painel de MAb's foi estabelecida a divisão do HRSV em dois grupos antigênicos (A e B) (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985).

Estudos realizados posteriormente demonstraram que estes dois grupos A e B têm aproximadamente 25% de relação antigênica como um todo. Alguns trabalhos mostraram que o dimorfismo antigênico entre os grupos A e B é maior na glicoproteína G, com uma correlação antigênica de 1% a 7%, conferindo vantagem para o vírus em termos da evasão de uma resposta imunológica preexistente. A proteína F apresenta uma correlação antigênica de aproximadamente 50% entre os grupos A e B (Hendry *et al.* 1988; Johnson *et al.* 1987; Mufson *et al.* 1985; Queiroz *et al.*, 2002).

Trabalhos realizados posteriormente por outros pesquisadores demonstraram haver diferenças antigênicas dentro de cada um dos grupos, possibilitando a divisão em subgrupos. A princípio, foram identificados sete subgrupos do tipo A (A1 a A7) e 3 do tipo B (B1 a B3) (Anderson *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1990). Posteriormente foi descrito na literatura mais um subgrupo dentro do grupo B (B4) (Hall *et al.*, 1990). Atualmente, baseando-se em estudos moleculares da variabilidade do gene da glicoproteína G, classifica-se os genótipos do grupo A em GA1, GA2, GA3, GA4, GA5, GA6 e GA7 (Peret *et al.*, 1998, 2000) e SAA1 (Venter *et al.*, 2001). O grupo B é por sua vez classificado nos genótipos GB1, GB2, GB3, GB4, SAB1, SAB2 e SAB3 (GILCA *et al.*, 2006; Venter *et al.*, 2001). Recentemente foi descrito mais um genótipo do grupo B do HRSV circulando na América do Sul e nordeste da Ásia, descrito na literatura como BA, (Nagai *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004; Trento *et al.*, 2003; Venter *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram que a variação dos aminoácidos da proteína G dentro de um mesmo grupo pode ser de até 20%, conferindo ao HRSV uma vantagem adicional em termos da evasão de uma resposta imune preexistente (Cane *et al.*, 1991; Sullender *et al.*, 1998). Os estudos realizados, comparando as sequências dos genes NS1, SH e N, demonstraram que a variação é bem menor nestas proteínas. A similaridade de nucleotídeos e aminoácidos encontrados foi: 72% e 76% para o gene SH, 83% e 87% para o gene NS1 e 86% e 96% para o gene N (Johnson *et al.*, 1987).

Muitos estudos basearam-se apenas nas propriedades antigênicas do HRSV e foram realizados no sentido de elucidar o padrão de circulação deste vírus. A co-circulação dos grupos A e B durante os surtos sazonais e a variação do padrão de circulação dos subgrupos em diferentes comunidades durante o mesmo ano ocorre

de maneira distinta, não sendo encontrado um grupo ou subgrupo que cause epidemias de caráter nacional ou mundial (Anderson *et al.*, 1991; Hendry *et al.*, 1989). A obtenção de novos conhecimento relacionados à variação antigênica e suas implicações são essenciais para o desenvolvimento de uma vacina para HRSV.

### 1.6.1 Grupo B com inserção de 60 nucleotídeos

Recentemente foram reportadas três cepas HRSV (BA3833/99B, BA3859/99B e BA4128/99B) do grupo antigênico B isolados no ano de 1999 em Buenos Aires, Argentina. Estes isolados possuíam uma duplicação de 60 nucleotídeos na região C-terminal do gene da glicoproteína G e foi descrito na literatura como subtipo BA (Trento *et al.*, 2003). Subseqüentemente sequências da glicoproteína G com a mesma duplicação foram encontradas em estudos mais recentes, porém em localidades distintas e distantes do reportado inicialmente (Figura 4) (Trento *et al.*, 2006). A sequência nucleotídica do gene da glicoproteína G com genótipo BA é traduzida em um polipeptídeo de 315 aminoácidos. Essa proteína apresenta características estruturais iguais às proteínas G de outros isolados de HRSV, tais como uma região de cisteínas e a presença de múltiplos sítios potenciais para a glicosilação da ligação O e N no ectodomínio da proteína (Figura 5) (Trento *et al.*, 2003). As vantagens seletivas do HRSV com essa inserção sobre outros genótipos permanecem ainda desconhecidas, mas provavelmente a condição imunológica da população em relação a esse vírus pode ter contribuído para sua disseminação mundial (Trento *et al.*, 2006).



**Figura 04 - Distribuição geográfica dos genótipos BA.** As localidades que apresentam sequências com a duplicação do segmento de 60 nucleotídeos são descritas no mapa e pode-se perceber que o genótipo BA apresenta uma distribuição mundial amplamente difundida.



		730	740	750	760	770	780	790	
		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CH18537	721	ACCCUCAAGA	CCACAGAAAG	AGACACCAGC	AUUUCACAAU	CCACCGUGCU	CGACACAAC	ACUCCAAA	790
Mon/15/90	721	C			C C		C	AU	C 790
BA3833/99B	721	C			CC	U	C	AU	C 790
BA4128/99B	721	C			CC	U	C	AU	C 790
BA3859/99B	721	C			CC	U	C	AU	C 790
		800	810	820	830	840	850	860	
		.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CH18537	791	A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	800
Mon/15/90	791	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	800
BA3833/99B	791	CACAGAAAG	AGACACCAGC	ACCUCACAAU	CCACUGUGCU	CGACACAACC	ACAUAAAAC	A	860
BA4128/99B	791	CACAGAAAG	AGACACCAGC	ACCUCACAAU	CCACUGUGCU	CGACACAACC	ACAUAAAAC	A	860
BA3859/99B	791	CACAGAAAG	AGACACCAGC	ACCUCACAAU	CCACUGUGCU	CGACACAACC	ACAUAAAAC	A	860

Figura 05 - Representação da inserção de 60 nucleotídeos. Visualização da inserção do fragmento duplicado de 60 nucleotídeos. Adaptado de Trento *et al.* (2003).

## 1.7 ASPECTOS CLÍNICOS

A principal causa de internação hospitalar de crianças com idade inferior a cinco anos são as enfermidades agudas do trato respiratório inferior (TRI). A maioria das doenças do TRI são infecções brônquicas e alveolares, responsáveis por 90% das mortes por patologia respiratória. As infecções de brônquios e bronquíolos são reconhecidas como de etiologia viral em sua maioria e os quadros pneumônicos são frequentemente associados a agentes bacterianos, sendo pouco reconhecida a participação de agentes virais nesses casos. Nos em países em desenvolvimento, os agentes virais são vistos como responsáveis pela maior parte das infecções, tanto de origem brônquica como alveolar (Miyao *et al.*, 1999). De acordo com dados de Thomazelli *et al* (2007), os principais agentes virais, relatados no Brasil, associados à enfermidades das vias aéreas inferiores são, em ordem decrescente de frequência, o HRSV, Metapneumovírus Humano, Parainfluenza 3, Adenovírus, Influenza A e Parainfluenza 1, porém muito agentes patogênicos permanecem ainda desconhecidos e sem identificação.

O HRSV replica-se nas células do trato respiratório, causando um processo inflamatório que inclui destruição do epitélio causando edema e aumento na produção de muco. Após o período de incubação, 3 a 5 dias, ocorrem as primeiras manifestações clínicas, típicas do resfriado comum, com secreção nasal clara, tosse moderada, febre baixa e sibilância, evoluindo geralmente, para a recuperação no período de uma a três semanas. A tosse é um dos sintomas mais comuns e afeta cerca de 90 a 97% dos pacientes. A febre é observada em aproximadamente 50% das pessoas com doença respiratória causada pelo HRSV, contra 75% das infecções pelo vírus Influenza e das infecções bacterianas. Embora as temperaturas ocasionalmente alcancem 39 a 40 °C são, via de regra, mais baixas do que as observadas nas infecções pelo vírus da Influenza (Falsey e Walsh, 2000; Polak, 2004). O contato direto

com as secreções via aerossol e objetos contaminados são as principais formas de transmissão e contágio do HRSV. O HRSV é muito infeccioso quando entra em contato direto com as mucosas do olho ou nasal. A inoculação do vírus na mucosa oral de voluntários demonstrou não ser eficiente (Hall *et al.*, 1981).

Nas infecções causadas pelo HRSV, também podem aparecer sintomas como diminuição do apetite, além da ocorrência de complicações como otite média e sinusite (Hall *et al.*, 1978; Pitkaranta *et al.*, 1998). As infecções respiratórias agudas (IRAs) têm sido as causas principais de morbidade e mortalidade em crianças de até 5 anos de idade em todo o mundo, sendo consideravelmente maior nos países em desenvolvimento (Law *et al.*, 2002). Dentre os causadores destas infecções, o HRSV tem sido apontado como o responsável pela maioria dos casos de IRAs em crianças menores de um ano de idade (Miyao *et al.*, 1999). O HRSV anualmente colabora, direta ou indiretamente, com 600.000 a 1.000.000 de mortes em crianças com idade inferior a cinco anos (Polak, 2004).

Atualmente, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o HRSV possui uma distribuição mundial amplamente difundida, em países em desenvolvimento, como o Brasil. O HRSV também apresenta uma distribuição bastante difundida em países industrializados. Anualmente são reportados aproximadamente 125.000 casos de infecção respiratória pelo HRSV nos Estados Unidos da América (EUA). Mundialmente são estimados, aproximadamente, 64 milhões de episódios de infecção respiratória causados pelo HRSV, com 160.000 mortes em decorrência de complicações causadas diretamente pela infecção do HRSV (WHO, Initiative for Vaccine Research, [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/ari/en/index.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index.html)).

A bronquiolite resulta da destruição do epitélio bronquiolar, inflamação peribronquiolar, edema dos tecidos das vias aéreas e produção de muco. A migração do vírus do trato respiratório superior ao trato respiratório inferior provavelmente envolve a aspiração de secreções ou migração via epitélio respiratório. A obstrução das vias aéreas pode resultar também em enfisema e colapso da porção distal do pulmão (Polak, 2004). Miyao *et al.* (1999) constataram uma significativa presença do HRSV na maior parte dos casos de crianças internadas com patologia aguda do trato respiratório inferior. Este vírus está associado a 84% dos casos de bronquiolite e à metade dos casos de pneumonias (46,4%). Durante uma epidemia de HRSV em Rochester nos EUA, o HRSV foi responsável por 87% dos casos de crianças hospitalizadas por pneumonia e bronquiolite. Entre as crianças com pneumonia, 96% tinham menos do que 6 meses de idade (Hall e Douglas *et al.*, 1975).

Pacientes prematuros (Carbonell-Estrany *et al.*, 2000); Queiroz *et al.*, 2002), idosos (Falsey e Walsh, 2000), pacientes com cardiopatias congênitas, portadores de leucemia (Whimbey *et al.*, 1995; Whimbey *et al.*, 1996), imunocomprometidos (Englund *et al.*, 1998), tais como receptores de transplante (Machado *et al.*, 2003; Mccarthy *et al.*, 1999) e pacientes portadores de HIV (Falsey e Walsh, 2000), podem evoluir para um quadro clínico mais grave, com acometimento importante do trato respiratório inferior, desenvolvendo quadros de taquipnéia, pneumonia, bronquiolite e bronquite, e que, muitas vezes, levam à hospitalização, necessitando de intubação e ventilação mecânica. As manifestações clínicas dependem muito da magnitude da imunodepressão.

Nos adultos imunocomprometidos, a infecção por HRSV está associada à morbidade e letalidade significantes, apesar da gravidade das manifestações clínicas dependerem da magnitude da imunodepressão. A progressão clínica da infecção por HRSV adultos imunocomprometidos segue um padrão semelhante ao dos pacientes imunocompetentes, com infecção inicial no trato respiratório superior progredindo para doença no trato respiratório inferior (Falsey e Walsh, 2000). Em imunocomprometidos portadores de leucemia com pneumonia pelo HRSV podem ser observadas taxas de letalidade de, aproximadamente, 20% (Van Elden *et al.*, 2002). Em pacientes que foram submetidos a procedimentos de transplante de medula óssea, a taxa de letalidade varia de 45 a 80% em decorrência de complicações causadas pelo HRSV (Bowden, 1997; Harrington *et al.*, 1992; Ogra, 2004 ; Whimbey *et al.*, 1996).

Pacientes infectados pelo HRSV com quadros de doença cardíaca congênita ou doença pulmonar crônica apresentam índices maiores de mortalidade (3,4% e 3,5%, respectivamente) quando comparada à observada em pacientes saudáveis (1%) em um estudo multicêntrico e retrospectivo. Além disso, os grupos com doença cardíaca congênita ou com doença pulmonar crônica apresentam duração maior da terapêutica de oxigenação suplementar (Holberg *et al.*, 1991; Nyati *et al.*, 2002). As infecções por HRSV também são fatores de risco importantes para o desenvolvimento subsequente de asma e sensibilização à alérgenos inalantes, em indivíduos com predisposição genética para atopia e asma (Camara *et al.*, 2004; Ogra, 2004; Sigurs *et al.*, 1995; Sivestri *et al.*, 2004; Welliver, 2003).

No município São Paulo os padrões clínicos freqüentemente associados aos casos de infecção pelo HRSV, em crianças hospitalizadas, são acometimento bronquial difuso e/ou a condensação alveolar focal (Vieira *et al.*, 2001). Em crianças com idade de até 24 meses o vírus apresenta uma prevalência em torno de 68%,

enquanto que em crianças com idade superior a dois anos 71% dos casos reportados foram associados ao Rinovírus (Rakes *et al.*, 1999). Há evidências de que aproximadamente 66% dos episódios agudo de chiado são desencadeados por infecções virais nos primeiros anos de vida, e que desaparecem nos primeiros anos de escola (Silvestri *et al.*, 2004). Não existem estimativas exatas sobre as taxas de letalidade, os estudos indicam que 0,5% a 1,0% dos casos de infecção por HRSV resultam em morte em crianças hospitalizadas em países desenvolvidos (Holberg *et al.*, 1991; Nyati, *et al.*, 2002; Ogra, 2004). A letalidade do HRSV é maior em crianças que apresentam antecedentes que predispõem à doença mais grave. Crianças com doenças cardíacas congênitas, admitidas no hospital com infecção causada pelo HRSV ou que o adquiriram durante o período da hospitalização, demonstrou que estas crianças apresentaram um risco maior de desenvolver uma doença grave ou fatal (Macdonald *et al.*, 1982). A taxa de letalidade entre lactentes com doenças cardíacas congênitas e infecção por HRSV é de 37%, ou seja, cinco vezes maior quando comparado aos 6,5% de mortes entre as crianças infectadas, porém sem cardiopatias. Crianças com doenças pulmonares e prematuros também são grupos que apresentam um risco alto de doença grave ou fatal (Groothuis *et al.*, 1988 ; Shay *et al.*, 2001).

A Análise da variação genética da proteína G do HRSV isolado de crianças imunodeprimidas com episódios consecutivos de doença respiratória foi comparada com a proteína G de isolados de HRSV circulantes na população em geral. Não foi encontrada nenhuma modificação nas sequências de aminoácidos desses isolados distintos, sugerindo que a infecção clínica permanece aguda ou evolui para crônica nas crianças com supressão imunológica, devido à incapacidade da resposta imunológica (Arbiza *et al.*, 2006). Cada vez mais o HRSV tem sido reconhecido como um importante patógeno na população senil, principalmente aquela parcela da população que vive em asilos ou em casas de repouso. Os sintomas da infecção pelo HRSV são mais variáveis nesta população, estendendo-se de um leve resfriado a um grave problema respiratório (Falsey e Walsh, 2000; Han *et al.*, 1999).

## 1.8 EPIDEMIOLOGIA DO HRSV

O HRSV é um dos mais importantes agentes causadores de infecção aguda do trato respiratório inferior em crianças (Hall, 1994). De acordo com dados de setembro de 2009, da Organização Mundial de Saúde (OMS), o HRSV possui uma distribuição mundial amplamente disseminada, tanto em países em desenvolvimento, como o Brasil, como também em países industrializados. Nos Estados Unidos da América

(EUA) são reportados anualmente 125.000 casos de infecção respiratória pelo HRSV e mundialmente são estimados 64 milhões de casos de infecção pelo HRSV com, aproximadamente, 160.000 mortes por ano no mundo inteiro em decorrência de complicações causadas pela infecção do HRSV.

O HRSV acomete todas as faixas etárias. A transmissão pode ocorrer por contato com secreções, via aerossol, e mais freqüentemente, por fômites, sendo um importante agente de infecção nosocomial (Hall *et al.*, 1975). O HRSV pode sobreviver por mais de 6 horas em várias superfícies, sendo extremamente infeccioso quando aplicado diretamente na mucosa, ocular ou nasal, por mãos ou objetos contaminados (Falsey e Walsh, 2000; Tristram e Welliver, 1996).

Na Europa, o HRSV é responsável por 42 a 45% das admissões hospitalares de crianças menores de 2 anos, com infecção do trato respiratório inferior (Simões *et al.*, 2003). Cerca de 95% das crianças apresentam a primeira infecção causada pelo HRSV durante os primeiros dois anos de vida, sendo que o pico de incidência ocorre entre os dois e sete meses de vida (Anderson *et al.*, 1990), podendo causar bronquiolite e pneumonia. Apesar das re-infecções ocorrem com uma freqüência bastante elevada durante toda vida, os sintomas em crianças mais velhas e adultos são mais brandos e ficam, geralmente, limitadas ao trato respiratório superior (Hall *et al.*, 1991). Por outro lado vários fatores podem influenciar a gravidade da doença, como fatores ambientais, exposição passiva ao tabaco, dentre outros (Holberg *et al.*, 1991 ; Nyati *et al.*, 2002 ; Queiroz *et al.*, 2002 ).

Epidemias de HRSV são de fácil identificação pela comunidade, pois há um grande aumento do número de casos de bronquiolites e pneumonias, sendo que ocorre um aumento no número de admissões hospitalares em crianças com problemas no trato respiratório inferior. Alguns estudos realizados em crianças no primeiro ano de vida demonstram que, aproximadamente, um terço das que apresentaram infecção pelo HRSV desenvolveram doença do trato respiratório inferior. Dados do CDC mostram que nos EUA, o HRSV é responsável por 120.000 admissões hospitalares anuais em bebês e crianças pequenas. (Holberg *et al.*, 1991; Shay *et al.*, 1999 ). Em países em desenvolvimento, como Moçambique, Indonésia e África do Sul a incidência do HRSV foi de 5, 10 e 9 para um total de 1000 crianças respectivamente com infecção no TRI (Robertson *et al.*, 2004).

O HRSV mostrou ser o agente de maior incidência em infecções nosocomiais em crianças menores de três meses, submetidas à ventilação mecânica (Diniz *et al.*, 2005). O conhecimento dessa virose é menor nos países em desenvolvimento. No

Brasil, um estudo realizado por Vieira *et al* (2001), na cidade de São Paulo, mostrou que todas as crianças acometidas por este vírus tinham idade inferior a três anos e, em sua maioria menos de um ano. Esse estudo envolveu, contudo, somente crianças hospitalizadas com doença do trato respiratório inferior. Na cidade do Rio de Janeiro foi realizado um estudo transversal em 1997 e 1998, onde o HRSV foi o principal causador de infecções do TRI em lactentes que necessitaram de hospitalização (D'Elia *et al.*, 2005).

No Brasil, a doença respiratória aguda (DRA) é responsável por 25 a 50% das consultas em postos de saúde e cerca de 67% dos atendimentos de emergência em hospitais (Sütmoller *et al.*, 1995). Estudos de diferentes áreas geográficas revelaram o HRSV como a principal causa de infecção respiratória em crianças (Arruda *et al.*, 1991; Miyao *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 1991; Tsuchiya *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2002). Na cidade de São Paulo, o HRSV foi o patógeno viral mais freqüentemente encontrado em crianças hospitalizadas (41,8%) com DRA (Vieira *et al.*, 2001). Outros estudos realizados no Brasil mostraram o HRSV como responsável por 17 a 68% das infecções virais em crianças internadas (Calegari *et al.*, 2005; Moura *et al.*, 2003; Serafino *et al.*, 2004). Nas regiões de clima temperado e sub-tropical a infecção pelo HRSV apresenta uma sazonalidade bem definida, ocorrendo anualmente no período de outono tardio, inverno e início da primavera.

Cada epidemia dura cerca de cinco meses, com 40% dos casos ocorrendo durante os meses de pico, geralmente no meio do surto (Collins *et al.*, 2001). Em países de clima temperado, como Estados Unidos, Japão, França e Reino Unido geralmente os surtos ocorrem de novembro a abril, com picos nos meses de dezembro e janeiro (inverno) (Brouard *et al.*, 1993 ; Hall *et al.*, 1990; Hendry *et al.*, 1988; Hendry *et al.*, 1989; Karron *et al.*, 1997 ; Mufson *et al.*, 1991; Tsutsumi *et al.*, 1988).

Segundo Vieira *et al.*, (2001), no município de São Paulo, a sazonalidade apresentada pelo HRSV é bastante marcante, estendo-se, predominantemente, no outono-inverno com pico em maio e junho. No Rio de Janeiro um estudo longitudinal sobre doença respiratória realizado entre 1982 - 1985 mostrou alta incidência do HRSV nos casos mais graves de infecção respiratória aguda. As amostras positivas para HRSV apareceram principalmente durante o outono, nos quatro anos consecutivos do estudo, indicando uma ocorrência sazonal. Os serviços de pronto atendimento, de acordo com este trabalho, são as melhores fontes de dados para a vigilância do HRSV, onde, um aumento de casos positivos corresponde a um aumento

no número total de casos de infecção respiratória aguda (Nascimento *et al.*, 1991).

Embora as infecções respiratórias agudas sejam importante causa de morbidade e letalidade no sul do Brasil, poucas e esparsas informações são disponíveis sobre a sazonalidade e a etiologia viral do HRSV. Em trabalho realizado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, o HRSV foi o mais frequente em menores de um ano de idade, nos três níveis de atenção à saúde, sendo mais prevalente em menores de seis meses. O HRSV juntamente com adenovírus foram responsáveis por 91,4% dos diagnósticos virológicos positivos com picos de incidência ocorrendo regularmente entre os meses de julho e agosto (Stralio *et al.*, 2002). Diferentemente do que se observa nas regiões de clima temperado ou sub - tropical, em localidades com clima sub - equatorial, diversos estudos relatam o isolamento do HRSV o ano inteiro. Em Papua Nova Guiné, o HRSV é isolado durante todo o ano, com picos nos meses mais chuvosos (março e abril). No Havaí, os picos de ocorrência também estão relacionados ao período mais chuvoso (outubro a abril), sendo o HRSV isolado todo o ano. Em Melbourne, Sydney e Newcastle (Austrália), a epidemia se estende de abril a setembro, com pico em julho (Hierholzer *et al.*, 1994 ; Reese e Marchette 1991).

Um estudo realizado na cidade de São Paulo, Brasil, em neonatos com pneumonia intersticial causada por HRSV mostrou que 51,4% dos episódios ocorreram no outono e 48,6% no inverno, confirmando a sazonalidade (Diniz *et al.*, 2005). Dentre a população de receptores de medula óssea no município de São Paulo a infecção causada pelo HRSV mostrou predomínio entre o outono e inverno, de maneira semelhante aos achados nos EUA (Machado *et al.*, 2003). Independentemente da sazonalidade, a gravidade da doença do trato respiratório pode variar a cada surto.

O padrão de circulação dos grupos A e B do HRSV aparecem com grande variação de local para local e de ano para ano. Vários estudos demonstram que os dois tipos têm circulado concomitantemente em muitas epidemias em diversas regiões do mundo, com a predominância de um deles. Segundo Anderson *et al.*, (1990) e Hendry *et al.*, (1989), não há ligação epidemiológica entre as comunidades, ocorrendo como um fenômeno local ou regional e não nacional. Ocorre de forma distinta à observada com o vírus Influenza, onde as epidemias apresentam caráter nacional e até mesmo internacional em relação à cepa circulante.

Um estudo de três anos realizado na região do Delta dos rios Yukon e Kuskokwin no Alaska nos EUA observou a circulação somente do tipo A nos dois primeiros anos do estudo e de ambos os tipos no terceiro ano (Karron *et al.*, 1997).

Outros dados da literatura confirmam que os dois tipos têm circulado conjuntamente em muitas epidemias em várias regiões do mundo. Estudos realizados em Boston e Huntington (Akerlind *et al.*, 1988) nos EUA, San Salvador em El Salvador (Zelaya *et al.*, 1994) e Santa Fé na Argentina (Imaz *et al.*, 2000) revelaram a presença de ambos os tipos durante os surtos, com predominância do tipo A. Algumas localidades como Rochester nos EUA (Hall *et al.*, 1990), Sapporo no Japão (Tsutsumi *et al.*, 1988) e Caen na França (Brouard *et al.*, 1993), apresentam elevadas variações na prevalência de um ou outro grupo. Em alguns anos foi observada a prevalência do grupo A, em outros anos foi mostrada a prevalência do grupo B e ainda observam-se anos em que há um equilíbrio de ambos os grupos. Estudos realizados em Turku na Finlândia e Copenhagen na Dinamarca, também foi observada a alternância na prevalência dos grupos nos surtos (Hornsleth *et al.*, 1998 ; Waris *et al.*, 1992).

Existem também variantes dos grupos A e B do HRSV circulando concomitantemente. Stensballe *et al.*, (2003) observaram que há vários subgrupos circulantes ao mesmo tempo em uma comunidade, porém eles geralmente não circulam simultaneamente em duas ou mais comunidades. Alguns trabalhos mostram que vários genótipos (subgrupos) estão presentes em uma epidemia (Cane *et al.*, 1995; Valdivia *et al.*, 1999). O grupo A do HRSV apresenta uma maior variação antigênica que a do grupo B. Tal fato pode explicar a predominância do grupo A em relação ao grupo B (Coggins *et al.*, 1998).

No Brasil, foram classificados 87 isolados de HRSV na cidade do Rio de Janeiro no período compreendido entre 1982 a 1988. Ambos os grupos A e B foram identificados em cada epidemia, embora sempre houvesse predomínio de um dos grupos (Siqueira *et al.*, 1991). Dentre as variantes antigênicas foram identificadas quatro do grupo A e três do grupo B, assim também como o estudo realizado por Cintra *et al* (2001) no município de Ribeirão Preto, São Paulo. Botosso (2002) realizou um estudo em crianças hospitalizadas em um hospital universitário no município de São Paulo, e encontrou também uma co-circulação de ambos os grupos em 3 anos de estudo.

As diferenças de patogenicidade entre os grupos A e B, ainda, não estão totalmente definidas. Após a descoberta de que o HRSV apresentava dois grupos antigênicos, grupos A e B, passou-se a especular se existiria alguma influência dos tipos de vírus na gravidade e desenvolvimento da doença. Alguns estudos concluíram que as infecções causadas pelo tipo A do HRSV resultam em doenças mais graves (Falsey e Walsh 1997; Hall *et al*,1990; Imaz *et al.*, 2000; Hall e Walsh, *et al.*, 1990).



Por outro lado, Zelaya *et al.* (1994) e Hornsleth *et al.* (1998) constataram maior gravidade em crianças infectadas pelo grupo B, embora os primeiros tenham analisado poucas amostras. Existem também pesquisadores que não observaram em seus estudos diferenças significativas de patogenicidade entre os dois tipos A e B do HRSV. Apesar de não relacionaram maior ou menor gravidade da doença com o tipo do vírus, foi constatado que a quantidade de vírus presente nas secreções esta diretamente associada a seriedade da doenças. (Brouard *et al.*, 1993; Cintra *et al.*, 2001; McIntosh *et al.*, 1993; Russi *et al.*, 1989; Stralioetto *et al.*, 1994; Struck *et al.*, 2004).

Os dados disponíveis na literatura são por vezes conflitantes, não ficando clara a existência ou não de diferenças de patogenicidade entre os dois tipos de HRSV. Com o trabalho realizado por Peret *et al.* (1998), no qual foram identificados os genótipos de HRSV, passou-se a especular se haveria influência, não apenas do grupo, mas do genótipo sobre a gravidade da doença. Ou, ainda, se a maior ou menor gravidade das doenças poderiam estar relacionadas à presença ou não de anticorpos herdados da mãe, específicos para o genótipo de vírus com o qual a criança se infectou. Martinello *et al.* (2002) observaram em seu estudo que o genótipo GA3 pode estar diretamente associado com a gravidade da doença. Já um estudo de coorte e multicêntrico demonstrou não haver uma associação entre a gravidade e o genótipo GA3 do HRSV (Struck *et al.*, 2004).

Um estudo retrospectivo realizado na emergência do hospital da Universidade de São Paulo, situado na cidade de Ribeirão Preto demonstrou uma co-circulação dos dois grupos, A e B, contudo, não houve uma associação dos grupos com relação à gravidade da doença, mas uma tendência maior na gravidade dos casos em crianças infectadas pelo HRSV do grupo B (Cintra *et al.* 2001). Além disso, há uma variedade de fatores que podem também determinar a gravidade da doença pelo HRSV, como interação entre a patogenicidade intrínseca do vírus, fatores hospitalares e condição sócio-econômica da família (Silvestri *et al.*, 2004; Ogra *et al.*, 2004).

Estudos de epidemiologia molecular mostram a existência de várias cepas circulando concomitantemente em um mesmo surto, sendo que estas apresentam uma tendência a diminuir nos surtos subseqüentes até o desaparecimento, este fenômeno é o principal responsável pelos *shifts* antigênicos a cada epidemia ao longo dos tempos. Fica claro então a importância e relevância na identificação do padrão epidemiológico do vírus em epidemias de diferentes comunidades, ao redor do mundo, para um melhor entendimento da imunidade após uma infecção natural e posterior

desenvolvimento de uma vacina contra o HRSV (Botosso, 2002; Choi e Lee., 2000; Coggins *et al.*, 1998; Peret *et al.*, 1998).

### 1.9 DESENVOLVIMENTO DE VACINA

O HRSV possui características que representam um desafio ao desenvolvimento de uma vacina. Uma dessas características é a possibilidade de reinfecção na presença de imunidade pré-existente, podendo acometer recém nascidos com anticorpos adquiridos passivamente da mãe e pessoas imunologicamente competentes (Glezen *et al.*, 1981; Henderson *et al.*, 1979). Reinfecções podem ocorrer por exposições repetidas a isolados de vírus pertencentes ao mesmo grupo, pois a imunização não é completa e dura um pequeno período de tempo (Hall *et al.*, 1991).

Outra característica reside no fato de que a primeira infecção por HRSV ocorre normalmente entre dois e sete meses de idade (Glezen *et al.*, 1986), portanto, uma vacina eficaz deve ser capaz de estimular uma boa resposta imune antes dos 2 meses de idade. Porém a imaturidade imunológica do indivíduo nessa idade dificulta a produção desse tipo de vacina (Collins *et al.*, 2001). A maioria dos indivíduos que se encontram dentro do grupo de risco para apresentar um quadro mais severo da doença provocada pelo HRSV possui alguma alteração no sistema imune, seja imaturidade, deficiência ou supressão (recém-nascidos, idosos, imunossuprimidos e imunodeficientes), dificultando ainda mais a produção de uma vacina contra o HRSV (Greenberg e Piedra, 2004).

A primeira tentativa de se obter uma vacina foi feita utilizando-se vírus inativado por formalina, na década de 60. Durante os testes clínicos em seres humanos, notou-se que, apesar de induzirem uma forte resposta imune, essa vacina não era protetora (Kim *et al.*, 1969) e quando estes indivíduos entraram em contato com o HRSV selvagem apresentaram manifestações muito mais severas da doença do que pessoas não vacinadas (cerca de 80% de hospitalizações e dois óbitos) (Dudas e Karron, 1998; Openshaw *et al.*, 2001). O aumento da gravidade da doença foi também observado em animais e é o resultado de diversos fatores: como a produção deficiente de anticorpos neutralizantes no soro, baixa imunidade local, deposição do complexo imunológico, indução de resposta exacerbada e aumento da produção das citocinas IL - 4 e IL - 5 (Durbin e Karron, 2003; Polack *et al.*, 2002).

Na tentativa de obter proteção contra a infecção por HRSV, diversas estratégias vacinais foram formuladas (vírus recombinantes, peptídeos sintéticos, vacinas de DNA e vírus atenuados). No entanto, até o momento não existe uma vacina aprovada para o

uso clínico, existindo alguns estudos que se encontram em fase de testes clínicos (Collins *et al.*, 2001; Barik, 2006).

#### 1.10 DIAGNÓSTICO DO HRSV

O diagnóstico efetivo das infecções respiratórias virais, bem como o reconhecimento e entendimento dos benefícios e limitações dos testes laboratoriais são essenciais para evitar o uso desnecessário de antibióticos e evitar infecções nosocomiais, nas quais o HRSV apresenta-se muito frequentemente envolvido (Henrickson *et al.*, 2007). Um dos métodos diagnósticos mais utilizados para detecção do HRSV é o isolamento viral em culturas celulares. Esta técnica permite a “multiplicação” de pequenas quantidades de vírus que estão presentes nas amostras (Halstead *et al.*, 1990). A presença do vírus é observada pelo aparecimento de efeito citopático visível ao microscópio óptico.

O diagnóstico pode ser direto: detecção de antígeno viral, do ácido nucléico ou do vírus infectante, ou pode ser indireto: detecção de anticorpos específicos para o agente (Waris, 1992). Os quatro principais métodos de diagnóstico da infecção por HRSV são cultura de células, detecção do antígeno por imunofluorescência (IF) ou por ensaio imunoenzimático (ELISA), detecção do RNA por reação em cadeia pela polimerase após a transcrição reversa (RT-PCR) e por sorologia, pela detecção de IgM específico para HRSV ou pelo aumento significativo dos anticorpos IgG (Falsey e Walsh, 2000). A combinação de ensaios moleculares e imunológicos é a abordagem mais sensível para o diagnóstico viral (Rovida *et al.*, 2005).

Dentre as metodologias de diagnóstico do HRSV o isolamento do vírus em cultura celular é considerado o padrão ouro para o diagnóstico do HRSV. O HRSV cresce em uma variedade de linhagens celulares, porém é melhor cultivado em células epiteliais humanas, tais como Hep2 (carcinoma epitelial de laringe humano) e HeLa (carcinoma epitelial de cervix humano). Outras linhagens como Vero (rim de macaco) e fibroblastos humanos, também, são úteis para o isolamento do HRSV, mas não são tão sensíveis quanto às linhagens epiteliais humanas (Falsey, 2000; Tristram e Welliver, 1996). A linhagem celular considerada mais eficiente para o isolamento e a propagação do HRSV é a Hep2. Hierholzer *et al.* (1993) demonstraram que a linhagem NCI-H292, originalmente derivada de um carcinoma mucoepidermóide do pulmão humano, também é bastante sensível e pode ser usada satisfatoriamente para o isolamento do HRSV.

A centrifugação da placa de cultura após a inoculação do material clínico pode

aumentar a eficiência do isolamento, pois facilita a adsorção do vírus na linhagem celular (Hughes, 1993). Reis (2006) utilizou em seu estudo três metodologias para isolamento do HRSV (cultura em tubos estacionários, *roller* e placa) e encontrou dados semelhantes quanto à sensibilidade. Muitos fatores podem interferir, entretanto, na eficácia do isolamento, destacando-se, por exemplo, as condições de coleta e o manuseio das amostras.

O HRSV é um vírus termolábil, necessitando de condições adequadas para o transporte, tais com rapidez (entre 1 a 2 horas após a coleta) e refrigeração (4 °C), pois a titulação do vírus na amostra clínica pode cair rapidamente à temperatura ambiente (Englund *et al.*, 1996; Falsey e Walsh, 2000). Alguns trabalhos sugerem que as amostras virais devem permanecer a 4 °C de 3 a 5 horas e depois devem ser estocadas a -70 °C, podendo, desta forma, as amostras permanecerem viáveis (Hall *et al.*, 1975; Kellogg, 1991).

Outro fator que pode interferir no isolamento viral do HRSV é a presença de bactérias ou até mesmo do enterovírus, diminuindo ou até mesmo anulando o efeito citopático produzido pelo HRSV (Bromberg *et al.*, 1987; Kellogg, 1991). A manifestação e visualização do efeito citopático em culturas celulares pode ser dificultada, também, pelo fato das células mais eficientes para o isolamento do HRSV, como a Hep2, crescerem formando mais de uma camada celular (Bromberg *et al.*, 1991). Atualmente a cultura viral que apresenta efeito citopático característico para o HRSV é confirmada por imunofluorescência, geralmente com anticorpos monoclonais comerciais (Van Elden *et al.*, 2002).

A técnica de imunofluorescência (IF) é largamente utilizada para detectar o HRSV em células epiteliais de nasofaringe ou para a confirmação do isolamento viral em cultura celular. Este teste é um método rápido e de fácil execução quando comparado ao isolamento, o que resulta em menor tempo de trabalho. A exemplo do que se obtém no isolamento viral, o emprego do lavado nasal permite um aumento significativo na detecção dos vírus respiratórios quando comparado com os *swabs* de nasofaringe e de garganta, para qualquer técnica. Além de oferecer uma vantagem adicional que é a estabilidade das amostras fixadas em lâminas (Kellogg 1991). Uma desvantagem da imunofluorescência é a necessidade de pessoal bem treinado para a leitura, já que se pode ter inespecificidade devido à presença de muco na amostra. Entretanto o muco pode ser retirado com o uso de agentes mucolíticos como a N-acetil-cisteína. Os padrões de fluorescência observados dependem dos monoclonais utilizados: monoclonais contra as glicoproteínas de superfície (F e G) apresentam um

padrão de fluorescência de membrana, enquanto que monoclonais contra proteínas do nucleocapsídeo (N e P) apresentam padrão citoplasmático de fluorescência. Outra desvantagem é a qualidade da amostra, que deve conter um bom número de células, por isso a coleta deve ser realizada somente por pessoal treinado, além de transporte e processamento adequado para que as células não sejam destruídas. (Fulton e Middleton, 1974; Tristam e Welliver, 1996).

Outro teste que pode ser utilizado para a detecção rápida do HRSV é o imunoenzimático. Estes testes possuem algumas vantagens quando comparados à fluorescência, já que não necessitam de células intactas do trato respiratório, e pelo seu potencial de automação que permitem o processamento de um número grande de amostras simultaneamente. Além disso, o método é mais objetivo na interpretação dos resultados do que a fluorescência (Kellogg, 1991).

Os métodos de diagnóstico molecular como a RT-PCR (reação em cadeia por polimerase após transcrição reversa) e hibridação também são muito utilizadas para o diagnóstico do HRSV. Van Dyke e Murphy-Corb (1989) desenvolveram um ensaio de hibridação RNA-cDNA para a detecção do HRSV em secreções de nasofaringe. As amostras clínicas utilizadas haviam sido estocadas a -70 °C e o ensaio não obteve a performance esperada, talvez pelo RNA ter sofrido degradação durante os procedimentos, críticos, de congelamento e descongelamento das amostras. A técnica de RT-PCR tem sido amplamente utilizada para o diagnóstico do vírus, principalmente quando a quantidade e o período de excreção são pequenos, como é o caso de pessoas idosas e neonatos (Freymuth *et al.*, 1995; Gilbert *et al.*, 1996; Ong *et al.*, 2001; Pitkäranta *et al.*, 1998; Valdivia *et al.*, 1997). A RT-PCR também permite discriminar as amostras entre os tipos A e B (Gottschalk *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996), sendo de grande utilidade para a análise genética das amostras. (Meteyard e Young, 1994; Peret *et al.*, 1998; Peret *et al.*, 2000).

Muitas PCR *multiplex* e RT-PCR foram desenvolvidas, demonstrando uma sensibilidade igual ou, mais comumente superior à cultura de células e outros métodos de detecção de antígenos (Rovida *et al.*, 2005; Thomazelli, 2004; Weinberg *et al.*, 2004). Reis (2006) testou amostras clínicas através da pesquisa direta de antígenos de HRSV por imunofluorescência com anticorpos monoclonais, isolamento viral em cultura celular e RT-PCR, encontrando nessa última maior sensibilidade em relação às outras. Thomazelli (2004) comparou a imunofluorescência com a técnica de *GeneScan*- RT-PCR para o diagnóstico de diversos vírus respiratórios, encontrando boa sensibilidade, especificidade e concordância entre as duas técnicas. Nascimento (2007) padronizou

uma reação em tubo único para o diagnóstico de HRSV em amostras clínicas, a fim de simplificar e reduzir os riscos de contaminação. Amostras foram testadas por imunofluorescência indireta, RT-*Nested*-PCR e RT-PCR em tubo único. Os resultados obtidos demonstraram que essa técnica é mais rápida, sensível e específica, além de ser mais econômica que a IF e com sensibilidade semelhante à RT-*Nested* PCR.

A reação de PCR em tempo real oferece a habilidade de monitorar o progresso da reação no momento que ela está ocorrendo, ou seja, em tempo real de modo que não é necessário o ensaio pós – analítico da PCR convencional (eletroforese em gel de agarose). Na PCR em tempo real a reação é caracterizada pelo ponto no tempo dentro de um ciclo, no qual a amplificação do DNA alvo é primeiramente detectada. Desta maneira quanto mais cedo for observado o início da amplificação do DNA alvo, maior será o nível de fluorescência detectado e, conseqüentemente, o número de cópias detectadas será maior em uma proporção direta (Low *et al.*, 2008). Novas metodologias de biologia molecular, como a LC-RT-PCR (*LightCycler Reverse Transcriptase PCR*) desenvolvida pela *Roche Diagnostics*, que mostrou ser altamente específica e rápida. A LC-RT-PCR é uma tecnologia que transfere energia de ressonância fluorescente (FRET) para duas sondas de hibridação (marcadas com Fluoróforo). Estas sondas são continuamente monitoradas no processo de amplificação dos *amplicons*, sendo por isso denominada de PCR em tempo real (Whiley *et al.*, 2000).

Outros métodos baseados na técnica de PCR em tempo real têm sido descritos para a detecção genômica dos vírus, como Syber green, Taq Man, Lux, Scorpion (Van Elden *et al.*, 2003). Um estudo realizado em crianças com idade entre zero a três anos mostrou maior sensibilidade da PCR *multiplex* em tempo real para HRSV e vírus da Influenza A e B de aspirado de nasofaringe quando comparado ao teste de IF para a detecção de antígeno (*Directigen* - Becton Dickinson, Sparks, Md. E RSV *TestPack* – Abbott Laboratories, Abbott Park III) . Além disso, esta metodologia foi mais rápida quando comparada à RT-PCR (Boivin *et al.*, 2004). A PCR em tempo real diminui a manipulação de *amplicons*, evitando assim contaminação, é reprodutível e também pode ser utilizada para quantificar o ácido nucléico (Mackay *et al.*, 2002).

### 1.11 TRATAMENTO

O tratamento das infecções do TRI, causadas por HRSV, consiste na remoção mecânica das secreções, administração de oxigênio umidificado, posicionamento adequado da criança a fim de facilitar a respiração e em casos mais graves, assistência

respiratória (Collins *et al.*, 2001). Uma terapia efetiva ainda não está disponível e a eficácia de corticoesteróides e broncodilatadores ainda não está bem definida. Estudos sobre a vitamina A, interferon e antibióticos são, até o momento, desapontadores (Kneyber *et al.*, 2000).

O uso da Ribavirina, um antiviral análogo do nucleosídeo guanosina, é controverso. Quando administrada oralmente, a droga apresenta moderada toxicidade hepática e da medula óssea e quando aplicada sob a forma de aerossol, parece ter pouca ou nenhuma toxicidade sistêmica. Apesar de a Ribavirina diminuir a quantidade de partículas virais secretadas pelo paciente e aumentar seus níveis de oxigenação, não há evidências de que haja diminuição das taxas de mortalidade, duração da hospitalização ou necessidade de terapias de suporte (Collins, 1996). Além disso, o tratamento utilizando Ribavirina requer altas doses para ser eficaz e a administração aerossolizada é prolongada, durando de 12 a 18 horas diárias e mais de sete dias de aplicação. Por isso, a Ribavirina possui uma eficácia clínica limitada no tratamento de infecções por HRSV (Jafri, 2003; Xu, 2004).

O Synagis Palivizumab (Abbott) é um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra um local específico da superfície do HRSV. O alvo do Synagis Palivizumab é o envelope do HRSV através da glicoproteína F, possui, portanto, uma potente atividade neutralizante do HRSV, inibindo a fusão celular induzida pelo vírus e protegendo contra a infecção por HRSV. Synagis foi autorizado para a prevenção de infecções graves do trato respiratório inferior requerendo hospitalização, causadas pelo vírus sincicial respiratório (HRSV) em crianças com maior risco de infecção por HRSV, relativamente às quais se prevê o desenvolvimento de doença aguda, crianças com displasia broncopulmonar e crianças com menos de 2 anos de idade e com doença cardíaca congênita hemodinamicamente importante (Feltus e Sondheimer, 2007; Zhao *et al.*, 2004).

Diversos estudos ao redor do mundo realizados com amostras de HRSV com inserção de 60 nucleotídeos na glicoproteína G mostraram a existência de mutações sendo acumuladas ao longo do tempo e que a seleção positiva está influenciando na evolução desse vírus. A rápida disseminação mundial deste genótipo sugere que pode estar havendo vantagens seletivas sobre os outros vírus circulantes. O conhecimento adquirido através de estudos de variabilidade genética da glicoproteína G do HRSV pode ter impacto não apenas sobre a evolução deste vírus, mas também sobre outras áreas, tais como o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, vacinas e principalmente o tratamento (Trento *et al.*, 2006).

## 6 CONCLUSÃO

- ✚ Houve uma alternância importante no padrão de circulação dos genótipos, do grupo A e B, do HRSV, na cidade de São Paulo, nos anos de 2007 e 2008.
- ✚ Nos anos de 2007 e 2008 os genótipos do grupo A foram encontrados em 39 (88,6%) das amostras analisadas, sendo mais predominantes do que os genótipos do grupo B, encontrados em cinco (11,3%) amostras, isso diferente do verificado nos anos de 2005 e 2006, onde os genótipos do grupo B foram altamente predominantes.
- ✚ O genótipo GA5 foi encontrado em 28 (63%) das amostras genotipadas, e voltou a ser o predominante, nos anos de 2007 e 2008, como ocorrido anteriormente nos anos de 2003 e 2004, antes da ascensão do genótipo BA do grupo B.
- ✚ O genótipo GA2 foi encontrado em 11 (25%) das amostras genotipadas, e foi o segundo genótipo mais frequente, nos anos de 2007 e 2008.
- ✚ O genótipo BA do grupo B foi encontrado em apenas três (6,8%), das amostras estudadas, mostrando que houve uma queda expressiva, pois nos anos de 2005 e 2006 foram encontradas 52 amostras deste genótipo, porém ainda assim foi o genótipo mais freqüente do grupo B.
- ✚ As amostras do grupo B não apresentaram evidências de pressão seletiva positiva, isso talvez explique a queda expressiva dos genótipos deste grupo, principalmente o BA com inserção, no período estudado.
- ✚ As amostras do grupo A estão sob forte seleção positiva/diversificadora, e isto poderia ser uma das explicações para a alternância na circulação dos genótipos, do grupo A e B, do HRSV neste período estudado.



## REFERÊNCIAS

- Akerlind B, Norrby E, Orvell C, Mufson MA. Respiratory syncytial vírus: heterogeneity of subgroup B strains. *J Gen Virol.* 1988;69(9):2145-54.
- Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, Tsou C, McIntosh K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial vírus. *J Infect Dis.* 1991;163(4):687-92.
- Anderson LJ, Parker RA, Strikas RL. Association between respiratory syncytial vírus outbreaks and lower respiratory tract deaths of infants and young children. *J Infect Dis.* 1990;161(4):640-6.
- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, McIntosh K, *et al.* Antigenic characterization of respiratory syncytial vírus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 1985;151(4):626-33.
- Arbiza J, Berois M, Delfraro A, Frabasile S, Mitoma FD, Milk R, *et al.* Genetic characterization of respiratory syncytial viruses isolated from consecutive acute respiratory infections in a HIV infected child. *J Clin Virol.* 2006;35(1):41-5.
- Arbiza J, Delfraro A, Frabasile S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial vírus in Uruguay: 1985-2001--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(3):221-30.
- Arruda E, Hayden FG, McAuliffe JF, Sousa MA, Mota SB, Mcauliffe MI, Geist FC, Carvalho EP, Fernandes MC, Guerrant RL, Gwaltney Jr JM. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. *J Infect Dis.* 1991;164: 252-258.
- Atreya PL, Peeples ME, Collins PL. The NS1 protein of human respiratory syncytial vírus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *J Virol.* 1998;72(2):1452-61.
- Barik S. Transcription of human respiratory syncytial vírus genome RNA in vitro: requirement of cellular factor(s). *J Virol.* 1992;66(11):6813-8.
- Barik S. The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial vírus mRNA. *J Gen Virol.* 1993;74(Pt3):485-90.
- Barik S, Bitko V. Prospects of RNA interference therapy in respiratory viral diseases: update 2006. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(11):1151-60.
- Beeler JA, Feldman SA, Audet S. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial vírus facilitates vírus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. *J Virol.* 2000;74(14):6442-7.
- Boivin G, Cote S, Déry P, De Serres G, Bergeron MG. Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial víruses. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1):45-51.
- Botosso VF, Zanotto PM, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, Stewien KE, Peret TC, Jamal LF, Pardini MI, Pinho JR, Massad E, Sant'anna OA, Holmes EC, Durigon EL; VGDN Consortium. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial vírus. *PLoS Pathog.* 2009;5(1).
- Botosso, VF. Diversidade genética da glicoproteína G entre amostras de Vírus Respiratório Sincicial isoladas na cidade de São Paulo, 1995-1998 [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002.
- Bowden RA. Respiratory vírus infections after marrow transplant: the Fred Hutchinson Cancer Research Center experience. *Am J Med.* 1997;102(3A):27-30.
- Bromberg K, Tannis G, Daidone B, Clarke L, Sierra M. Comparison of HEp-2 cell culture and abbot respiratory syncytial vírus enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 1987; 25(2):434.
- Bromberg K, Tannis G, Daidone B. Early use of indirect immunofluorescence for the detection of respiratory syncytial vírus in HEp-2 cell culture. *Clin. Microbiol.* 1991;96(1):127-9.
- Brouard J, Freymuth F, Constantini S, Petitjean J, de Schrevel G, Duhamel JF. Prevalence and clinical aspects of A and B subgroups of respiratory syncytial vírus infection. Observation of 8 consecutive epidemics between 1982 and 1990]. *Arch Fr Pediatr.* 1993;50(8):639-43.
- Buckingham SC, Bush AJ, Devincenzo JP. Nasal quantity of respiratory syncytial vírus correlates with disease severity in hospitalized infants. *Pediatr. Infect Dis, J.* 2000;19(2):113-7.

Calegari T, Queiroz DA, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TF, *et al.* Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005;9(2):156-61.

Camara AA, Silva JM, Ferriani VP, Tobias KR, Macedo IS, Padovani MA, Harsi CM, Cardoso MR, Chapman MD, Arruda E, Platts-Mills TA, Arruda LK Risk factors for wheezing in a subtropical environment: role of respiratory viruses and allergen sensitization. *J. Allergy Clin Immunol.* 2004;113(3):551-7.

Campos ACA. Correlação entre análise filogenética da glicoproteína G e genótipos de Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) em crianças admitidas no hospital Universitário da USP no ano de 2004 [Dissertação]. Instituto de Ciências Biomédicas: Universidade de São Paulo, São Paulo; 2006.

Candeias JA. Isolation of the respiratory syncytial virus from children with acute respiratory infections. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1967;9(1):27-30.

Cane PA. Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial virus. *Rev Med Virol.* 2001;122:155-60.

Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virol.* 1995;69(5):2918-25.

Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J Clin. Microb.* 1994;321-4.

Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Analysis of relatedness of subgroup A respiratory syncytial viruses isolated worldwide. *Vírus Res.* 1992;25: 5-22.

Cane PA, Matthews DA, Pringle CR. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol.* 1991;72(Pt9):2091-6.

Carbonell-Estrany X, Quero J, Bustos G, Cotero A, Doménech E, Figueras-Aloy J, Fraga JM, Garcia LG, Garcia-Alix A, Rio MGD, Krauel X, Sastre JBL, Narbona E, Roques V, Hernandez SS, Zapatero M, For The iris study group rehospitalization because of respiratory syncytial virus infection in premature infants younger than 33 weeks of gestation: a prospective study. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:592-7.

Carromeu, C. Estudos de caracterização estrutural, localização intracelular e imunogenicidade da RNA polimerase do Vírus Respiratório Sincicial Humano [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2007.

Carvalho, ACL. Variabilidade genética de Vírus Respiratório Sincicial Humano em amostras do grupo B com inserção de 60 nucleotídeos, colhidas em crianças atendidas no Hospital Universitário na cidade de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas;2009.

Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). *Am J Hyg.* 1957a;66(3):281-90.

Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.* 1957b;66(3):291-300.

Cheng X, Park H, Zhou H, Jin H. Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication. *J Virol.* 2005;79(22):13943-52.

Choi EH, Lee HJ. Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B respiratory syncytial viruses isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. *J Infect Dis.* 2000;181:1547-56.

Cintra OA, Owa MA, Machado AA, Cervi MC, Figueiredo LT, Rocha GM, Siqueira MM, Arruda E. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in southeast Brazil. *J Med Virol.* 2001;65(2):408-12.

Coates HV, Alling DW, Chanock RM. An Antigenic Analysis of Respiratory Syncytial by Plaque Reduction Neutralization Test. *Am J Epidemiol.* 1966;83:299-313.

Coates HV, Kendrick L, Chanock RM. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus of respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1963;112:958-64.

Coggins WB, Lefkowitz EJ, Sullender WM Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital. *J Clin Microbiol.* 1998;36(12):3552-7.

Collins PL, Bukreyev A, Yang L, Fricke J, Cheng L, Ward JM, Murphy BR. 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;82(24):12191-204.

Collins PL, Spann KM, Tran KC. Effects of nonstructural proteins NS1 and NS2 of human respiratory syncytial virus on interferon regulatory factor 3, NF- $\kappa$ B, and proinflammatory cytokines. *J Virol.* 2005;79(9):5353-62.

Collins PL, Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages. *J Virol.* 2004;78(12):6705.

Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory Syncytial Virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Williams e Wilkins; 2001. p. 1443-1485. 2v.

Collins PL, Hill MG, Cristina J, Grosfeld H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 9;93(1):81-5.

Collins PL, Mottet G. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 1993;74(Pt7):1445-50.

Cowton VM, McGivern DR, Fearn R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt7):1805-21.

Cox MJ; Azevedo RS; Cane PA; Massad E; Medley GF. Seroepidemiological study of respiratory syncytial virus in São Paulo State, Brazil. *J. Med. Virol.* 1998;55:234.

Cristina J, López JA, Albó C, García-Barreno B, García J, Melero JA, Portela A. Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology.* 1990;174(1):126-34.

D'Elia C, Siqueira MM, Portes SA, Sant'Anna CC – Infecções do trato respiratório inferior pelo vírus sincicial respiratório em crianças hospitalizadas menores de um ano de idade. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 2005, 38.

Diniz EM, Vieira RA, Ceccon ME, Ishida MA, Vaz FA. Incidence of respiratory viruses in preterm infants submitted to mechanical ventilation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005;47(1):37-44.

Dudas RA, Karron RA. Respiratory syncytial virus vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):430-9.

Durbin AP, Karron RA. Progress in the development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. *Clin Infect Dis.* 2003;15;37(12):1668-77.

Englund JA, Sullivan CJ, Jordan C, Dehner JP, Vercellotti GM, Balfour HH Respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *Ann. Intern. Med.* 1998;109:203-8.

Englund JA, Piedra, PA, Jewell A, Patel K, Baxter BB Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol.* 1996;34(7):1649-53.

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

Falsey AR. Respiratory syncytial virus infectious in older persons. *Vaccine*, 1998.

Falsey AR, Walsh EE. Safety and immunogenicity of a respiratory syncytial virus subunit vaccine (PFP-2) in the institutionalized elderly. *Vaccine.* 1997;15(10):1130.

Fearn R, Collins PL. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol.* 1999;73(7):5852-64.

Feldman SA, Audet A e Beeler JA. The Fusion Glycoprotein of Human Respiratory Syncytial Virus Facilitates Virus Attachment and Infectivity via an Interaction with Cellular Heparan Sulfate. *J Virol.* 2000;74:6442:6447.

Feltes, TF, Sondheimer, HM. Palivizumab and the prevention of respiratory syncytial virus illness in pediatric patients with congenital heart disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 7(9):1471-1480, 2007.

Frasibele S, Delfraro A, Facal L, Videla C, Galiano M, de Sierra MJ *et al.* Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguai and Argentina. 1993-2002. *J Med Virol.* 2003;71:305-12.

Freytmuth, F., Eugene, G., Vabret, A., Petitjean, J., Gennetay, E., Brouard, J., Duhamel, J.F., Guillois, B. Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 1995;33(12):3352-5.

Fuentes S, Tran KC, Luthra P, Teng MN, He B. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol.* 2007;81(15):8361-6.

Fulton RE e Middleton PJ. Comparison of immunofluorescence and isolation techniques in the diagnosis of respiratory syncytial of children. *Infect Immun.* 1974;10(1):92-101.

Galiano MC, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. Genetic and antigenic variability of human respiratory syncytial virus (groups a and b) isolated over seven consecutive seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2266-73.

Garcia-Barreno B, Delgado T, Melero JA. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol.* 1996;70(2):801-8.

Garcia O, Martín M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Breña P, Martínez I, García-Barreno B, *et al.* Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein. *J Virol.* 1994;68(9):5448-59.

Garcia J, García-Barreno B, Vivo A, Melero JA. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology.* 1993;195(1):243-7

Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N, Meanger J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 4):753

Gilbert LL, Dakama A, Bone BM, Thomas EE, Hegele RG. Diagnostic of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. *J Clin Microbiol.* 1996;34:41-3.

Gilca R, De Serres G, Tremblay M, Vachon ML, Leblanc E, Boivin G, *et al.* . Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. *J Infect Dis.* 2006;193(1):54-8.

Gimenez HB, Cash P, Melvin WT. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparasion of different virus isolates. *J Gen Virol.* 1984;65:963-71.

Glezen, WP, Taber, LH, Frank, AL, Kasel, JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child.* 1986;140:543.

Glezen WP, Paredes A, Allison JE, Taber LH, Frank AL. Risk of respiratory syncytial virus infection for infants from low-income families in relationship to age, sex, ethnic group, and maternal antibody level. *J Pediatr.* 1981;98(5):708-15.

Gottschalk J, Zbinden R, Kaempf L, Heinzer I. Discrimination of respiratory syncytial virus subgroups A and B by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 1996;34(1):41-3.

Greenberg HB, Piedra PA. Immunization against viral respiratory disease: a review. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;(11):54-61.

Groothuis JR, Gutierrez KM, Lauer BA. Respiratory syncytial virus infection in children with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr.* 1988;82(2):199-203.

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

Hall CB. Respiratory virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med.* 2001;344:1917

Hall CB. Prospects for a respiratory syncytial virus vaccine. *Science.* 1994;265(5177):1393-4.

- Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1991;163(4):693-8.
- Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, Anderson LJ. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis.* 1990;162(6):1283-90.
- Hall CB, Douglas RG Jr, Schnabel KC, Geiman JM. Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. *Infect Immun.* 1981;33(3):779-83.
- Hall, CB, Hall, WJ, Speers, DM. Clinical and physiological manifestations of bronchiolitis and pneumonia. Outcome of respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child.* 1979;133:798.
- Hall, C.B., Douglas, R.G., Jr., Geiman, J.M., Messner, M.K. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. *N Engl J Med.* 1976;293(26):1343-6.
- Hall CB, Douglas RG, Geiman JM. Interferon production in children with respiratory syncytia virus, influenza, and parainfluenza infections. *J Pediatr.* 1978;93:28-32.
- Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM, Messner MK. Nosocomial respiratory syncytial virus infections. *N Engl J Med.* 1975;293(26):1343-6.
- Hall CB, Douglas Jr. RG. Clinically useful method for the isolation of respiratory. *J Infect Dis.* 1975;13 (1):1-5.
- Hall, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 1999;41:95-98
- Han LL, Alexander JP, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus pneumonia among elderly: an assessment of disease burden. *J Infect Dis.* 1999;179:25-30.
- Halstead DC, Todd S, Fritch G. Evaluation of five methods for respiratory syncytial virus detection. *J Clin Microbiol.* 1990;28(5):1021-5.
- Hardy RW, Wertz GW. The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol.* 1998;72(1):520-6.
- Harrington RD, Hooton TM, Hackman RC, Storch GA, Osborne B, Gleaves CA, Benson A, Meyers JD An outbreak of respiratory syncytial virus in a bone marrow transplant center. *J Infect Dis.* 1992;165: 987-93.
- Henderson FW, Collier AM, Clyde WA Jr, Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med.* 1979;300(10):530-4.
- Hendry RM, Pierik LT, McIntosh K. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. *J Infect Dis.* 1989;160(2):185-90.
- Hendry RM, Burns JC, Walsh EE, Graham BS, Wright PF, Hemming VG, *et al.* Strain-specific serum antibody responses in infants undergoing primary infection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1988;157(4):640-7.
- Henrickson KJ, Hall CB. Diagnostic assays for respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;(11):36-40.
- Hierholzer JC, Castells E, Banks GG, Bryan JA, McEwen CT. Sensitivity of NCI-H292 human lung mucoepidermoid cells for respiratory and other human viruses. *J Clin Microbiol.* 1993;31(6):1504-10.
- Hierholzer JC, Tannock GA, Hierholzer CM, Coombs RA, Kennett ML, Phillips PA, Gust ID. Subgrouping of respiratory syncytial virus strains from Australia and Papua New Guinea by biological and antigenic characteristics. *Arch Virol.* 1994;136(1-2):133-47.
- Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD, Ray CG, Taussig LM, Lebowitz MD. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. *Am J Epidemiol.* 1991;133(11):1135-51.
- Hornsleth A, Klug B, Nir M, Johansen J, Hansen KS, Christensen LS, Larsen LB. Severity of respiratory syncytial virus disease related to type and genotype of virus and to cytokine values in nasopharyngeal secretions. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17(12):1114-21.

Hughes JH. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(2):150-75.

Imaz MS, Sequeira MD, Videla C, Veronessi I, Cociglio R, Zerbini E, Carballal G. Clinical and epidemiologic characteristics of respiratory syncytial virus subgroups A and B infections in Santa Fe, Argentina. *J Med Virol.* 2000;61(1):76-80.

Jafri, HS. Treatment of respiratory syncytial virus: antiviral therapies. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(2):89-92.

Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(16):5625-9.

Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Sidhu MS, *et al.* Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):13961-6.

Kellogg JA. Culture vs direct antigen assays for detection of microbial pathogens from lower respiratory tract specimens suspected of containing the respiratory syncytial virus. *Arch Pathol Lab Med.* 1991;115(5):451-8.

Kingsbury DW. Paromyxoviridae and their replication. In: B.N. Fields, *Virology.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 2001,942-945.

Kneyber MC, Moll HA, de Groot R. Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. *Eur J Pediatr.* 2000;159(6):399-411.

Kosakovsky Pond, D Posada, M.B. Gravenor, C.H. Woelk, and S. D. W. Frost. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *Mol Biol Evol.* 2006;23(10):1891-1901.

Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, Parrott RH. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology.* 1969;89,422-434.

Kumar S, Dudley J, Nei M e Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics,* 2008;9:299-306.

Law BJ, Carbonell-estrany X, Simões EAF. An update on respiratory syncytial virus epidemiology: a developed country perspective. *Resp Med.* 2002;96:S1-S7.

Lenard J. Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: all in a family? *Virology.* 1996;216(2):289-98.

Low KW, Tan T, Ng K, Tan BH, Sugrue RJ. The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;366(2):308-13.

MacDonald NE, Hall CB, Suffin SC, Alexson C, Harris PJ, Manning JÁ. Respiratory syncytial viral infection in infants with congenital heart disease. *N Engl J Med.* 1982;307(7):397-400.

Machado CM, Vilas Boas LS, Mendes AVA, Santos MFM, Rocha IF, Sturaro D, Dulley FL, Pannuti CS. Low mortality rates related to respiratory virus infections after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31:695-700.

Martinello RA & Chen MD. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis.* 2002;186:839-42.

McCarthy AJ, Kingman HM, Kelly C, Taylor GS, Caul EO, Grier D, Moppett J, Foot ABM, Cornish JM, Oakhill A, Steward CG, Pamphilon DH, Marks DI The outcome of 26 patients with respiratory syncytial virus infection following allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999,24:1315-22.

Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A. Survey and Summary real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(6):1292-305.

McIntosh K, Halonen P, Ruuskanen O. Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. *Clin Infect Dis.* 1993;16:151-164.

Martinez I, Valdés O, Delfraro A, Arbiza J, Russi J, Melero JA. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. *J Gen Virol.* 1999;80(1):125-30.

Mason SW, Lawetz C, Gaudette Y, Dô F, Scouten E, Lagacé L, Simoneau B, Liuzzi M. Polyadenylation-dependent screening assay for respiratory syncytial virus RNA transcriptase activity and identification of an inhibitor. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(16):4758-67.

Melero JA, García-Barreno B, Martínez I, Pringle CR, Cane PA. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol.* 1997;78:2411-2418.

Meteyard JD, Young PR Optimization of PCR and automated sequencing of clinical isolates of respiratory syncytial virus. *J Virol Methods.* 1994, 50:335-42.

Miyao CR, Gilio AE, Vieira S, Hein N, Pahl MM, Betta SL, *et al.* Viral infections in hospitalized children affected by acute lower respiratory tract disease. *J Pediatr.* 1999 Sep-Oct;75(5):334-44.

Morris JA, Blount RE Jr, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956;92(3):544-9.

Moura FE, Nunes IF, Silva GB Jr, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus infections in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(1):165-7.

Moura FE, Borges LC, Portes SA, Ramos EA, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(6):739-43.

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

Mufson MA, Akerlind-Stopner B, Orvell C, Belshe RB, Norrby E. A single-season epidemic with respiratory syncytial virus subgroup B2 during 10 epidemic years, 1978 to 1988. *J Clin Microbiol.* 1991;29(1):162-5.

Nagai K, Kamasaki H, Kuroiwa Y, Okita L, Tsutsumi H. Nosocomial outbreak of respiratory syncytial virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. *J Med Virol.* 2004;74:161-165.

Nascimento CA, Souza TS, de Moraes CT, Vedovello D, Durigon EL, Botosso VF, *et al.* One-step reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of respiratory syncytial virus in children. *J Virol Methods.* 2007.

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

Nielsen and Z. H. Yang. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics,* 148:929-936, 1998.

Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* 2000;302(1):205-17.

Nyati MK, Sreekumar A, Li S, Zhang M, Rynkiewicz SD, Chinnaiyan AM *et al.* High and selective expression of yeast cytosine deaminase under a carcinoembryonic antigen promoter-enhancer. *Cancer Res.* 2002;62(8):2337-42.

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

Ong GM, Wyatt DE, O'Neill HJ, McCaughey C, Coyle PV. A comparison of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for the diagnosis of respiratory infections in children with bronchiolitis, and the implications for a cohorting strategy. *J Hosp Infect.* 2001;49(2):122-8.

Openshaw PJ, Culley FJ, Olszewska W. Immunopathogenesis of vaccine-enhanced RSV disease. *Vaccine.* 2001;20:S27-31.

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

- Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol.* 1998;79 (9):2221-9.
- Perini AP, Barbosa ML, Botosso VF, de Moraes CT, Stewien KE, Durigon EL, *et al.* Comparison of HeLa-I, HEp-2 and NCI-H292 cell lines for the isolation of human respiratory syncytial virus (HRSV). *J Virol Methods.* 2007;146(1-2):368-71.
- Pitkaranta A, Jero J, Arruda E, Virolainen A, Hayden FG. Polymerase chain reaction-based detection of rhinovirus respiratory syncytial virus, and coronavirus in otitis media with effusion. *J Pediatr.* 1998;133(3):390-4.
- Polack FP, Teng MN, Collins PL, Prince GA, Exner M, Karron RA, *et al.* A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. *J Exp Med.* 2002 Sep 16;196(6):859-65.
- Polak MJ. Respiratory syncytial virus: Overview, treatment and prevention strategies. 2004;14(1):15-23.
- Pond SL, Frost SD, Muse SV. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics.* 2005;(5):676-9.
- Posada D, Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;(9):817-818.
- Queiroz DA, Durigon, EL, Botosso VF, Ejzemberg B, Vieira SE, Mineo JR, Yamashita, C, Hein N, Lopes CL, Cacharo AL, Stewien KE – Immune response to respiratory syncytial virus in Young Brazilian children. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35(10):1183-93.
- Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, Platts-Mills TAE, Heymann PW. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and Eosinophil Analyses. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:785-90.
- Reese PE, Marchette NJ. Respiratory syncytial virus infection and prevalence of subgroups A and B in Hawaii. *J Clin Microbiol.* 1991;29(11):2614-5.
- Reis, AD. Incidência de doença de vias aéreas pelo vírus sincicial respiratório humano em coorte de recém-nascidos do município de São Paulo: comparação de técnicas e caracterização molecular [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2006.
- Rixon HW, 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;(5):1153-65.
- Rixon HW, Sugrue RJ, Brown C, Brown G, Aitken J, McL. Furin cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is not a requirement for its transport to the surface of virus-infected cells. *J Gen Virol.* 2001;82(6):1375-86.
- Robertson SE, Roca A, Alonso P, Simoes EA, Kartasasmita CB, Olaleye DO, Odaibo GN, Collinson M, Venter M, Zhu Y, Wright PF. Respiratory syncytial virus infection: denominator-based studies in Indonesia, Mozambique, Nigeria and South Africa. *Bull World Health Organ.* 2004;82(12):914-22.
- Rodríguez F, Oliver JF, Marin A, Medina JR. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology.* 1990;142:817-818.
- Rovida F, Percivalle E, Zavattoni M, Torsellini M, Sarasini A, Gerna G. Monoclonal antibodies versus reverse transcription-PCR for detection of respiratory viruses in a patient population with respiratory tract infections admitted to hospital. *J Med Virol.* 2005;75(2):336-47.
- Rueda P, Palomo C, García-Barreno B, Melero JA. The three C-terminal residues of human respiratory syncytial virus G glycoprotein (Long strain) are essential for integrity of multiple epitopes distinguishable by antiidiotypic antibodies. *Viral Immunol.* 1995(1):37-46.
- Russi JC, Chiparelli H, Montano A, Etorena P, Hortal M. Respiratory syncytial virus subgroups and pneumonia in children. *Lancet.* 1989;2(8670):1039-1040.
- Sanz MC, Kew OM, Anderson LJ. Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein G among group A respiratory syncytial viruses. *Virus Res.* 1994;33(3):203-17.
- Sato MR, Saito T, Sakai Y, Sano M, Nishikawa A, Suzuki H, *et al.* Suzuki. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microbiol.* 2005;43:36-40.



- Schlender J, Zimmer G, Herrler G, Conzelmann KK. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol*. 2003;77(8):4609-16.
- Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF, Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol*. 2004;74(2):344-54.
- Serafino RL, Gurgel RQ, Dove W, Hart CA, Cuevas LE. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus in children over two seasons with a high incidence of respiratory infections in Brazil. *Ann Trop Paediatr*. 2004;24(3):213-7.
- Shay D, Holman RC, Roosevelt GE, Clark MJ, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus – associated deaths among US children, 1979-1997. *J Infect Dis*. 2001;183:16-22.
- Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*. 1999;282(15):1440-6.
- Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B. Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatr*. 1995;95(4):500-505.
- Silvestri M, Sabatini F, Defilippi A, Rossi G. The wheezy infant - immunological and molecular considerations. *Pediatr Resp Rev*. 2004;S81-S87.
- Simoes EA, Carbonell-Estrany X. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(2):13-8.
- Siqueira MM, Nascimento JP, Anderson LJ. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 1991;29(3):557-9.
- Stumöller F, Ferro ZP, Asensi MD, Ferreira V, Mazzei IS, Cunha BL. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and hospital study in Rio de Janeiro. *Clin Infect Dis*. 1995;20:854-860.
- Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes EAF. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(2):S21-32.
- Straliotto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha MLT, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;(4):283-291.
- Straliotto SM, Roitman B, Lima JB, Fischer GB, Siqueira MM – Respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis: comparative study of RSV groups A and B infected children. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1994;27(1):1-4.
- Struck A, Forster J, Ihorst G, Werchau H, König W, König B. Respiratory syncytial virus: G gene genotype and disease severity. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(11):1000-2.
- Sugrue RJ, Low KW, Tan T, Ng K, Tan BH. The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. 2008;366(2):308-13.
- Sullender WM. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microbiol Rev*. 2000;(1):1-15.
- Sullender WM, Mufson MA, Prince GA, Anderson LJ, Wertz GW. Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins of group A respiratory syncytial viruses that have caused repeat infections in children. *J Infect Dis*. 1998;178(4):925-32.
- Sullender WM, Sun L, Anderson LJ. Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J Clin Microbiol*. 1993;31(5):1224-31.
- Swiss Institute of Bioinformatics. ViralZone® [database]. Suíça: SIB; 2009. [cited 08/10/2009]. Available from: [http://www.expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/90.html](http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/90.html)
- Swofford DL. PAUP\* 4.0: phylogenetic analysis using parsimony. 1998, Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- Tang RS, Nguyen N, Cheng X, Jin H. Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. *J Virol*. 2001 Dec;75(23):11328-35.

- Techaarpornkul S, Barretto N, Peeples ME. Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol.* 2001 Aug;75(15):6825-34.
- Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL, Sousa TS, Oliveira DB, Golono MA, *et al.* Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr.* 2007;83(5):422-8.
- Thomazelli LM. Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pela técnica de GeneScan-RT-PCR [dissertação]. Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo: Universidade de São Paulo;2004.
- Tran TL, Castagné N, Bhella D, Varela PF, Bernard J, Chilmonczyk S, *et al.* The nine C-terminal amino acids of the respiratory syncytial virus protein P are necessary and sufficient for binding to ribonucleoprotein complexes in which six ribonucleotides are contacted per N protein protomer. *J Gen Virol.* 2007; (1):196-206.
- Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, Melero J.A. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication, *J. Virol.* 2006;p975–984.
- Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, Palomo C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol.* 2003;(11):3115-20.
- Tristram DA, Welliver RC. Respiratory syncytial virus. In: Diagnostic. Procedure for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7ed. Washington: American Public Health Association; 1996.
- Tschiya LR, Costa LM, Raboni SM, Nogueira MB, Pereira LA, Rotta I, Takahashi GR, Coelho M, Siqueira MM. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. *J Infect.* 2005;51(5):401-7.
- Tsutsumi H, Onuma M, Suga K, Honjo T, Chiba Y, Chiba S *et al.* Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987. *J Clin Microbiol.* 1988;26(6):1171-74.
- Valdivia A, Gonzalez G, Chacon D, Savon C, Otero A, Valdes O *et al.* Antigenic and genetic characterization of twenty-six strains of human respiratory syncytial virus (subgroup A) isolated during three consecutive outbreaks in Havana city, Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94(4):469-475.
- Valdivia A, Savon C, Sarmiento L, Morier L, Otero A, Soto Y, Oropesa S, Goyenechea A Analysis of respiratory syncytial virus in clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction restriction mapping. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92(3):389-93.
- Van Dyke RB, Murphy-Corb M. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by DNA-RNA hybridization. *J Clin Microbiol.* 1989;27(8):1739-43.
- Van Elden LJR, van Loon AM, van der Beek A, Hendriksen AW, Hoepelman AIM, van Kraaij MGJ, Schipper P, Nijhuis M. Applicability of a real-time quantitative PCR assay for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in immunocompromised adults. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4378-4381.
- Van Elden LJ, van Kraaij MG, Nijhuis M, Hendriksen KA, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, van Loon AM. Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2002;34(2):177-183.
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, *et al.*, editors. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* New York: Academic Press; 2000;p1162.
- 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.
- Vieira SE, Gilio AE, Miyao CR, Pahl MMC, Lotufo JPB, Hein N, *et al.* Infecção nosocomial pelo vírus respiratório sincicial em enfermaria de pediatria. *Pediatria (São Paulo).* 2002;24(1/2):17-24.
- Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, Durigon EL, Török TJ, Anderson LJ, *et al.* Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2001;43(3):125-31.
- Waris M. Detection and antigenic variation of respiratory syncytial virus [PhD. thesis]. University of Turkey. 1992;79:86.

Weinberg GA, Erdman D, Edwards K, *et al.* Superiority of reverse transcription-PCR to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory infections in children. *J Infect Dis* . 2004;189:706-10.

Welliver RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; (2):S6- S12.

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.

Whiley DM, Symmis MW, Mackay IM, Sloots TP. Detection of human respiratory syncytial virus in respiratory samples by lightcycler reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;40(12):4418-22.

Whimbey E, Couch RB, Englund JA, Andreeff M, Goodrich JM, Raad II, Lewis V, Mirza N, Luna MA. Respiratory syncytial virus pneumonia in hospitalized adults patients with leukemia. *Clin Infect Dis*. 1995;21:376-379.

Whimbey E, Champlin RE, Couch RB, Englund JA, Goodrich JM, Raad I, Przepiorka D, Lewis VA, Mirza N, Yousuf H, Tarrand, JJ, Bodey GP. Community respiratory virus infections among hospitalized adult bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 1996;22:778-782.

Woelk CH, Holmes EC. Variable immune-driven natural selection in the attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus (RSV). *J Mol Evol*. 2001;52:182-92.

World Health Organization. Initiative for Vaccine Research. State of the art of new vaccines research and development. Geneva: WHO; 2005. 88p [cited: 21/05/2009] Available from: [http://www.who.int/entity/vaccine\\_research/documents/Dip20814.pdf](http://www.who.int/entity/vaccine_research/documents/Dip20814.pdf).

Wulff H, Kidd P, Wennwe HA. Respiratory syncytial virus: Observations on antigenic heterogeneity. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1964;115: 240-3.

Xia, X, Z. Xie. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J of Heredity*, 2001;92:371-373.

Xu, Z, Kuang, M, Okicki, J.R., Cramer, H.; Chaudhary, N. Potent inhibition of respiratory syncytial virus by combination treatment with 2-5A antisense and ribavirin. *Antiviral Res*. 2007;61(3):195-206.

Yu Q, Hardy RW, Wertz GW. Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J Virol*. 1995;69(4):2412-9.

Zelaya EA, Petterson CA, Forsgren M, Orvell C, Strannegard O. Respiratory syncytial virus infection in hospitalized patients and healthy children in El Salvador. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;51:577-84.

Zhao, X, Chen, FP, Sullender, WM. Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats. *Virology*. 2004;318(2):608-612.

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

Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaeker N, Naranjo C, Van Ranst M. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):3022-30.

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

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