

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

Paulo Vitor Marques Simas

VARIABILIDADE GENÉTICA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO
ISOLADOS DE CRIANÇAS HOSPITALIZADAS E DE CRIANÇAS DE CRECHE

São José do Rio Preto-SP

2010

PAULO VITOR MARQUES SIMAS

VARIABILIDADE GENÉTICA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO
ISOLADOS DE CRIANÇAS HOSPITALIZADAS E DE CRIANÇAS DE CRECHE

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Virologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Fátima Pereira de Souza

São José do Rio Preto-SP

2010.

PAULO VITOR MARQUES SIMAS

VARIABILIDADE GENÉTICA DE VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO
ISOLADOS DE CRIANÇAS HOSPITALIZADAS E DE CRIANÇAS DE CRECHE

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Virologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr. José Luiz Proença Módena
Professor Doutor
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Dr^a. Karina Alves de Toledo
Professora Doutora
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

São José do Rio Preto, 05 de março de 2010.

RECOMEÇAR

Não importa onde você parou...
em que momento da vida você cansou...
o que importa é que sempre é possível e
necessário “Recomeçar”.

Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
é renovar as esperanças na vida e o mais importante...
acreditar em você de novo.
Sofreu muito nesse período?
foi aprendido...
Chorou muito?
foi limpeza da alma...

Ficou com raiva das pessoas?
foi para perdoá-las um dia...

Sentiu-se só por diversas vezes?
é porque fechaste a porta até para os anjos...
Acreditou que tudo estava perdido?
era o início da tua melhora...
Pois é... agora é hora de reiniciar... de pensar na luz...
de encontrar prazer nas coisas simples de novo.
Que tal
Um corte de cabelo arrojado... diferente?
Um novo curso... ou aquele velho desejo de aprender a
pintar... desenhar... dominar o computador...
ou qualquer outra coisa...

Olha quanto desafio... quanta coisa nova nesse mundão de meu Deus te
esperando.

Tá se sentindo sozinho?
besteira... tem tanta gente que você afastou com o
seu “período de isolamento”...
tem tanta gente esperando apenas um sorriso teu
para “chegar” perto de você.

Quando nos trancamos na tristeza...
nem nós mesmos nos suportamos...
ficamos horríveis...
o mal humor vai comendo nosso fígado...
até a boca fica amarga.
Recomeçar... hoje é um bom dia para começar novos
desafios.
Onde você quer chegar? ir alto... sonhe alto... queira o
melhor do melhor... queira coisas boas para a vida... pensando assim
trazemos prá nós aquilo que desejamos... se pensamos pequeno...
coisas pequenas teremos...
já se desejarmos fortemente o melhor e principalmente

lutarmos pelo melhor...
o melhor vai se instalar na nossa vida.
E é hoje o dia da faxina mental...
joga fora tudo que te prende ao passado... ao mundinho
de coisas tristes...
fotos...peças de roupa, papel de bala...ingressos de
cinema, bilhetes de viagens... e toda aquela tranqueira que guardamos
quando nos julgamos apaixonados... jogue tudo fora... mas principalmente... esvazie seu
coração... fique pronto para a vida... para um novo amor... Lembre-se somos apaixonáveis...
somos sempre capazes de amar muitas e muitas vezes... afinal de contas... Nós somos o
“Amor”...

”Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do
tamanho da minha altura”.

Carlos Drummond de Andrade.

AGRADECIMENTOS

Ao (s) / a (s):

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP – Campus de São José do Rio Preto, pela infra-estrutura oferecida para a elaboração deste trabalho;

Docentes e funcionários deste instituto;

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, eficientemente conduzido por todo o corpo docente a este vinculado, que me direcionaram para a formação teórica;

Orientação intensiva executada pela Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza;

Membros integrantes do Grupo de Pesquisa de Vírus Respiratórios deste instituto;

Departamento de Física;

Seção de Pós-Graduação, supervisionada com extrema competência e dedicação pela querida Rosemar Rosa de Carvalho Brena e todos os membros de sua equipe, pela atenção intensiva dedicada aos alunos;

Rede de Diversidade Genética de Vírus – VGDN – por ter oferecido as bases motivacionais para a execução do presente trabalho;

Funcionários do Hospital de Base e da Creche Municipal “Maria Inês Arnal” e em especial aos pais e as próprias crianças que permitiram a colheita das amostras para a execução deste trabalho;

Dr. João Batista Salomão, médico responsável pelo acompanhamento clínico das crianças hospitalizadas;

Laboratório de Estudos Genômicos deste instituto, coordenado pela Profa. Dra. Paula Rahal e muito bem sucedido pela dedicação de todos os seus integrantes, pelo convívio diário e pelo auxílio dispensado na resolução dos problemas experimentais;

Laboratório de Evolução Molecular de *Drosophila*, coordenado pela Profa. Dra. Claudia Márcia Aparecida Carareto, em especial a coordenadora e também a pós-doutoranda Lilian, pela dedicação ao auxiliar na interpretação dos dados e na elaboração de análises filogenéticas complementares;

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Laboratório em Pesquisas em Virologia, sob a coordenação do Dr. Mauricio Lacerda Nogueira e toda sua equipe de trabalho, por disponibilizar sua infra-estrutura para a realização dos experimentos de seqüenciamento de DNA; Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro, Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva, pelo auxílio na elaboração e interpretação das análises estatísticas;

Universidade de São Paulo, Campus de São Paulo:

- Instituto de Ciências Biomédicas II, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Virologia, coordenado pelo Prof. Dr. Edison Luiz Durigon e também à Dra. Danielle Bruna Leal de Oliveira, pela dedicação e pelo auxílio na padronização dos experimentos de PCR;

- Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Saúde Coletiva – Epidemiologia, pelo apoio na interpretação dos dados epidemiológicos;

Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia Celular, Centro de Pesquisas em Virologia, pelo auxílio científico oferecido pelo Dr. Eurico Arruda Neto e toda sua equipe de trabalho;

Instituto BUTANTAN, em nome das pesquisadoras Dra. Isabel Maria Vicente Guedes de Carvalho Mello, do Laboratório de Imunologia Viral, e Dra. Viviane Fongaro Botosso, da Unidade de Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Vacinas, pelo auxílio e dedicação dispensados para a interpretação das análises filogenéticas;

Biomédico Artur Trancoso Lopo de Queiroz, por toda dedicação dispensada na execução das análises filogenéticas;

CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro;

Família e grandes amigos, em especial a Sra. Deocleciana Ribeiro Pereira, pelo apoio e incentivo nos momentos críticos da execução deste trabalho.

**Dedico este trabalho a
Prof.^ª. Dr.^ª. Fátima Pereira de Souza
pela orientação intensiva e amizade
a mim dispensadas**

RESUMO

O vírus sincicial respiratório humano (hRSV) é o principal agente causador de infecções respiratórias agudas (IRA) em crianças menores que 5 anos de idade. Estudos de variabilidade genética tem identificado 2 grupos antigênicos de hRSV (A e B). A proteína G tem sido alvo destes estudos e tem fornecido informações importantes sobre as características clínicas e epidemiológicas do vírus. Os objetivos deste estudo foram determinar o genótipo, identificar o padrão de circulação das variantes de hRSV e comparar o diagnóstico apresentado por crianças provenientes de grupos clinicamente distintos. Foram colhidas amostras de aspirado nasofaríngeo de crianças menores que 6 anos de idade com IRA que freqüentaram uma creche municipal no período de julho de 2003 a setembro de 2005 e que foram internadas no Hospital de Base entre maio de 2004 e setembro de 2005 em São José do Rio Preto-SP. O diagnóstico viral foi realizado por RT-PCR e a genotipagem por sequenciamento da região variável (G2) do gene da proteína G. As árvores filogenéticas foram construídas a partir de alinhamentos das seqüências com outras disponíveis no GenBank para hRSV A e B. Foram identificadas 142 amostras positivas para hRSV (29% - 79/272 nas crianças hospitalizadas; e 7,7% - 63/817 nas crianças da creche), das quais 61 foram genotipadas (29 da creche e 32 do hospital). Destas, 92% (56/61) pertencem a hRSV A e 8% (5/61) ao hRSV B. As análises filogenéticas hRSVA mostraram a existência de três agrupamentos, GA1, GA2 e GA5, que co-circularam durante o período analisado. Nos isolados de crianças de creche, houve apenas detecção de hRSV GA1 (isolados muito similares a cepa protótipo A2). Os isolados do subgrupo B pertencem ao genótipo BA – GB3 e foram identificados apenas nas crianças hospitalizadas. Nossos isolados foram similares aos identificados nas cidades de Ribeirão Preto, São Paulo e outras localidades brasileiras, e também com isolados do Kenia, da África do Sul e dos Estados Unidos. Quando se comparou os dois grupos deste estudo, crianças de creche e de hospital, sintomas clínicos mais severos como chiado, falta de ar, febre, retração e sibilância aguda foram associados aos pacientes hospitalizados ($p < 0,001$). Com relação à detecção de estirpes evolutivamente mais recentes, IRA foram mais comuns em crianças menores de 2 anos de idade (100% de IRA por GA2, GA5, GB3 e GB3BA). Em conclusão, as duas variantes antigênicas de hRSV foram identificadas, ocorrendo a prevalência de GA1, que não era detectada desde meados da década de 90, co-circulando com hRSV GA2, GA5, GB3 e GB3BA. Análises evolutivas das estirpes virais identificadas mostraram uma seleção negativa fraca atuando sobre os isolados de hRSVA; no entanto, nas análises apenas para os isolados de hRSVA GA1, houve detecção de seleção negativa forte. Não foi observado nenhum agrupamento específico dos sintomas nem de diagnóstico clínico com as estirpes identificadas. Entretanto, as análises dos diagnósticos com a presença de hRSV mostraram prevalência de sintomas mais severos e de cepas mais recentes nas IRAs de crianças hospitalizadas menores que 2 anos de idade.

Palavras-chave: Infecções Respiratórias Agudas na Infância, Padrão de Circulação de Variantes Antigênicas do hRSV, Crianças Hospitalizadas, Crianças de Creche

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 – Infecções Respiratórias Agudas (IRAs) na Infância: um Problema de Saúde Pública.....	1
1.2 - O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV).....	3
1.2.1 – Caracterização Viral.....	3
1.2.2 – A Proteína G e a Variabilidade Genética do hRSV.....	6
1.2.3 – As Características Epidemiológicas, a Patogênese e o Tratamento das Infecções por hRSV.....	9
2. Objetivos.....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1 – Considerações Éticas.....	17
3.2 – Casuística.....	17
3.3 – Histórico dos Pacientes.....	17
3.4 – Processamento das Amostras de Secreção Nasofaringe.....	18
3.5 – Cultivo em Células Hep2 (<i>Human Epitelial Cells Type 2</i>) para Isolamento de hRSV.....	18
3.6 – Extração de RNA.....	21
3.7 – Transcrição Reversa.....	21
3.8 – Amplificação por PCR e Semi-Nested PCR.....	22
3.9 – Purificação dos Produtos Amplificados.....	23
3.10 – Sequenciamento de DNA.....	24
3.11 – Análises de Bioinformática e Estatística.....	26
4. Resultados.....	31
4.1 – População de Estudo e Caracterização Epidemiológica do hRSV.....	31
4.2 – Análises Filogenéticas de hRSV Circulantes em São José do Rio Preto.....	34
5. Discussão.....	44
6. Conclusões.....	55
7. Referências Bibliográficas.....	56
8. Anexos.....	65
Anexo I – Parecer do Comitê de Ética.....	65
Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	66
Anexo III – Histórico do Paciente: Dados Gerais.....	67
Anexo IV – Histórico do Paciente: Dados Referentes a Infecção Respiratória Aguda Atual...	68

1. Introdução

1.1. Infecções Respiratórias Agudas (IRAs) na Infância: um Problema de Saúde Pública

As infecções respiratórias agudas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade de crianças menores de 5 anos de idade no mundo, estimando-se que sejam responsáveis por 20% das mortes. Os principais diagnósticos identificados são pneumonia, bronquiolite e bronquite, sendo que 90% das mortes são causadas por pneumonia. No Brasil, doenças do sistema respiratório (incluindo IRAs) e diarreias correspondem a 15,2% das mortes em crianças desta faixa etária (WHO, 2009)

A elevada incidência mundial de IRAs na infância é responsável pelo aumento da necessidade de atendimento médico hospitalar em muitos países (FÉ, 2007). No Brasil, as IRAs são responsáveis por 20% das internações de crianças no Sistema Único de Saúde (SUS) (FAÇANHA e PINHEIRO, 2004) e mais de 50% das consultas ambulatoriais pediátricas (BOSSO et al., 2004). Doenças do aparelho respiratório são a quarta causa de óbito no país (SAÚDE BRASIL, 2004). No entanto, não existem políticas públicas brasileiras direcionadas exclusivamente a prevenção, controle e tratamento de tais infecções.

Muitos fatores de risco estão associados à predisposição as IRAs na infância. Dentre estes, crianças que apresentam baixo peso ao nascimento, desnutrição ou subnutrição e não aleitamento materno tende a uma maior predisposição para contrair pneumonia e conseqüentemente morrerem devido a tais infecções (WHO, 2009).

A frequência a creches também tem sido apontada como um potencial fator de risco às IRAs (SOUZA et al., 2003). Portanto, é relevante a realização de estudos sobre a etiologia das IRAs nestas populações, pois as creches certamente constituem um ambiente propício para a transmissão de patógenos respiratórios comuns entre hospedeiros susceptíveis. A implantação de eventuais intervenções para a prevenção das IRAs em crianças de creche em áreas tropicais dependerá da avaliação da frequência, etiologias e sazonalidade destas infecções.

As IRAs podem ser causadas por bactérias (mais comumente *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*) ou agentes virais. No entanto, não é possível diferenciar infecções bacterianas das infecções virais baseando-se apenas em sinais clínicos ou radiológicos (WHO, 2009).

Os vírus são os principais agentes etiológicos das IRAs na infância, responsáveis por 50 a 90% destas infecções (MANOHA et al., 2008). O reconhecimento inicial deste agente e o pronto atendimento auxiliariam na adoção de estratégias de prevenção, controle e terapêutica mais adequadas aos pacientes, além de reduzir os gastos com tratamento antibióticos em hospitais (RODRIGUES et al., 2004) e o possível surgimento de microorganismos multirresistentes a drogas.

Para a identificação de IRAs de etiologia viral têm-se utilizado técnicas de isolamento viral (cultivo celular), ensaios imunoenzimáticos, testes de inibição da hemaglutinação e métodos moleculares (MAHONY, J.B., 2008). No entanto, métodos sorológicos têm estabelecido apenas um relacionamento temporal, mas não causal entre as infecções virais e a síndrome clínica. Em adição, um resultado sorológico positivo pode ser não confiável em épocas de alta prevalência de um determinado agente viral (KESSON, 2007).

Os testes moleculares têm demonstrado ser altamente sensíveis, específicos e relativamente rápidos nos diagnósticos de IRAs virais (MAHONY, 2008), porém também ainda não se encontram disponíveis na prática clínica na maioria dos centros de saúde públicos brasileiros.

A Organização Mundial de Saúde tem recomendado estudos epidemiológicos sobre as IRAs de etiologia viral em crianças no Brasil (RABONI et al., 2003). Alguns estudos realizados por diversos centros de pesquisa em populações pediátricas brasileiras têm apontado a importância destes agentes patológicos nas infecções respiratórias (MOURA et al., 2006; THOMAZELLI et al., 2007; SILVA et al., 2008). A maioria destas infecções tem

sido associada ao Vírus Sincicial Respiratório, Influenza Vírus, Parainfluenza Vírus, Metapneumovirus e Picornavirus (MANOHA et al., 2007).

A importância do hRSV (do Inglês *human Respiratory Syncytial Vírus*) como patógeno causador de IRAs é reconhecida há mais de 40 anos. O desenvolvimento de vacinas contra este vírus tem sido dificultado por diversos fatores, incluindo o risco de potencialização da doença que ocorre naturalmente, como foi observado no início dos anos 60 (WHO, 2009).

1.2 – O Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV)

1.2.1 – Caracterização Viral

O Vírus Sincicial Respiratório (RSV) foi isolado de chimpanzés e caracterizado pela primeira vez em 1956 (CHANOCK et al., 1957). Foram descritos isolados de RSV que infectam animais, incluindo o RSV bovino (BRSV) e o vírus da pneumonia de ratos (PVM). Entretanto, não há relatos de animais reservatórios para o hRSV (COLLINS e GRAHAM, 2008).

O hRSV é classificado no Gênero *Pneumovirus*, Família *Paramixoviridae*, Ordem *Mononegavirales* (MACLELLAN et al., 2007). É um vírus envelopado que apresenta tamanho médio de 120 a 300 nm, simetria helicoidal e morfologia esférica. O envelope é composto de uma bicamada lipídica originado a partir da membrana plasmática da célula infectada durante a liberação do vírus por brotamento (figura 1).

Proteínas da superfície viral (G, F e SH) são responsáveis pelo processo de ligação e fusão do envelope viral a célula hospedeira por meio de receptores específicos. Após a realização deste processo endocítico mediado por clatrin, o nucleocapsídeo chega ao citoplasma, sofre desnudamento, e a partir de então, dá-se início aos processos de expressão e replicação do RNA viral. Todo o processo ocorre no citoplasma, onde os vírions são

montados e liberados por brotamentos a partir da membrana plasmática (SASTRE et al., 2007).

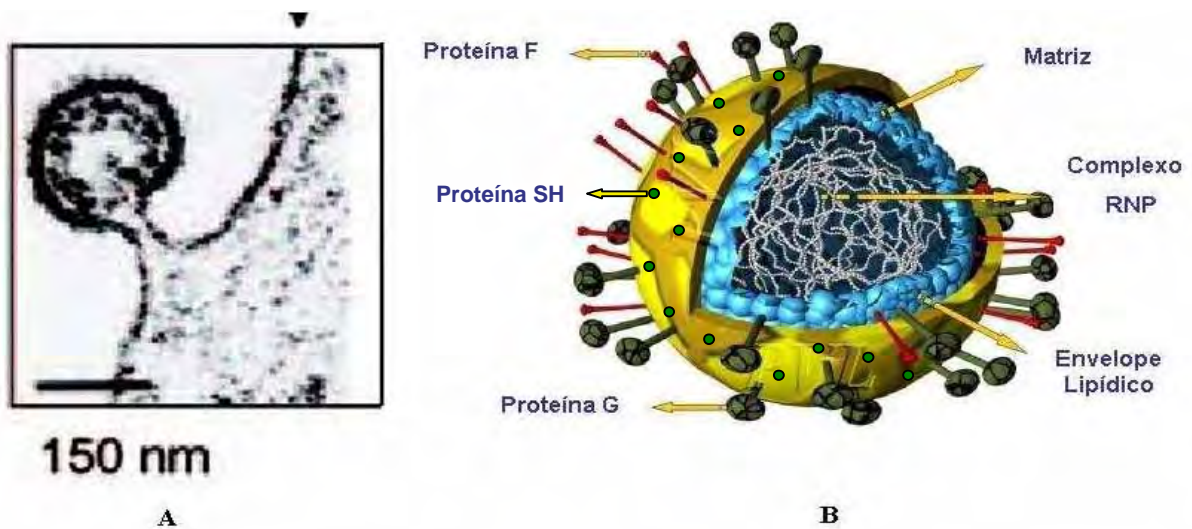


Figura 1: A: Fotomicrografia eletrônica mostrando o brotamento de hRSV a partir de uma célula infectada (COLLINS e GRAHAM, 2008); B: Representação esquemática do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV); destacam-se no esquema a bicamada lipídica, o complexo ribonucleoprotéico (RNP) e as proteínas de ligação G, de fusão F e a matriz viral (Modificada a partir de imagem disponível em <http://pathology5.pathology.jhmi.edu/micro/Image23.jpg>)

O genoma do hRSV é constituído por RNA fita simples, polaridade negativa, não segmentado, composto por aproximadamente 15.222 nucleotídeos. Apresenta uma região *lider* 3', 10 genes organizados linearmente que codificam 11 proteínas virais e uma região *trailer* 5' (Figura 2). Cada gene é transcrito separadamente, e cada *mRNA* codifica uma única proteína viral, exceto no caso do *mRNA* M2 que contém sobreposição de 2 *Open Reading Frames (ORFs)* e é expresso em duas proteínas distintas, M2-1 e M2-2 (GOULD e EASTON, 2007) (figura 2).

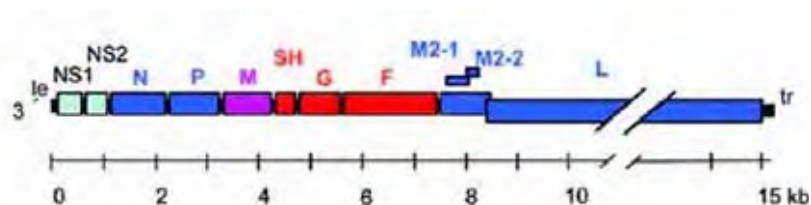


Figura 2: Representação esquemática da fita de RNA genômico *sense* negativa 3'-5' do Vírus Sincicial Respiratório Humano linhagem A2 (hRSV), mostrando a região extragênica 3' *lider* (*le*) e 5' *trailer* (*tr*) e os 10 genes virais (retângulos) que são expressos em *mRNAs* separados. M2-1 e M2-2

apresentam *Open Reading Frames (ORFs)* sobrepostas no *mRNA* M2. M2 e L se sobrepõem ligeiramente e a polimerase L é expressa por backtracking (COWTON et al., 2006).

As 11 proteínas codificadas são descritas como estruturais e não estruturais. A nucleoproteína (N), a proteína de fusão (F), a glicoproteína de superfície (G), a matriz protéica (M) compõem a estrutura viral, enquanto as proteínas não estruturais, incluindo a proteína L (replicase) e os fatores de virulência NS1 e NS2, apresentam funções variadas, inclusive resistência ao interferon (COLLINS et al., 2001).

A proteína P é o principal co-fator na replicação do RNA viral e ainda pode estar associada às proteínas N e L, para mantê-las na forma solúvel, facilitando a montagem e integração do nucleocapsídeo (COLLINS e GRAHAM, 2008).

As proteínas M2-1 e M2-2 estão relacionadas, respectivamente, à transcrição e à modulação do balanço transcrição-replicação do RNA viral (FEARNS e COLLINS, 1999).

O envelope viral é formado pela bicamada lipídica e pela organização de outras quatro proteínas virais (COLLINS e CROWE, 2007). A proteína M é importante para a morfogênese do vírion, uma vez que ficam organizadas na superfície interna do envelope. As proteínas G, F e SH são glicoproteínas transmembrânicas inseridas no envelope, sendo responsáveis pelo processo de ligação (proteína G) e fusão (F auxiliada pelas proteínas G e SH) (COLLINS e GRAHAM, 2008).

A proteína F direciona a penetração viral pela fusão do envelope à membrana da célula hospedeira e ainda é responsável pela formação do sincício, um efeito citopático que surge pela fusão das membranas de células infectadas adjacentes. Esta proteína é sintetizada com um precursor F₀, que é ativado por clivagens de proteases celulares. A clivagem ocorre em dois sítios (aa 109/110 e 136/137). O processo de clivagem resulta em 2 domínios: F₂ (109aa – amino terminal); p27 (27aa); F₁ (438aa – carboxi terminal). Os domínios F₂ e F₁ permanecem ligados por uma ponte dissulfeto e representam a forma ativa da proteína F (COLLINS e GRAHAM, 2008).

A proteína SH, além de auxiliar no processo de fusão viral à célula hospedeira, também participa da formação do sincício (GONZÁLEZ-REYES et al., 2001). Estudos têm apontado que esta proteína é capaz de modificar algumas propriedades do complexo de Golgi, como a acidez, um mecanismo que facilita o transporte das proteínas virais (RIXON et al., 2004). A glicoproteína G exerce um importante, mas, não exclusivo papel no processo de ligação do vírus a célula hospedeira (SULLENDER, 2000).

As proteínas F e G são os únicos dois elementos que induzem anticorpos neutralizantes contra hRSV. A sequência da proteína F é altamente conservada entre os isolados de hRSV, no entanto, a da proteína G é altamente variável (SULLENDER, 2000). A parte conservada da proteína F e a proteína G têm sido amplamente utilizadas para o desenvolvimento de uma vacina que seja eficaz contra ambos os grupos antigênicos (MEYER et al., 2008).

1.2.2 – A Proteína G e a Variabilidade Genética do hRSV

A glicoproteína G é uma proteína de membrana integral tipo II altamente glicosilada, sendo codificada por 289 a 299 aminoácidos, dependendo da variante (JOHNSON et al., 1987; CANE et al., 1991), e apresenta altos índices dos aminoácidos Serina, Treonina e Prolina (COLLINS et al., 2002).

A variabilidade desta proteína está concentrada em seu ectodomínio, o qual consiste de duas regiões hipervariáveis separadas por uma região central conservada de 13 aminoácidos (posições 164–176). Esta sequência motivo conservada é considerada como provável sítio de ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira, seguida por quatro cisteínas proximamente posicionadas (C¹⁷³, C¹⁷⁶, C¹⁸² e C¹⁸⁶), identificada em ambos os grupos antigênicos de hRSV. A segunda região hipervariável, próxima da extremidade C-terminal, tem sido descrita como a porção mais representativa da variabilidade genética (JOHNSON et al., 1987; CANE et al., 1991; PERET et al., 1998).

A proteína G tem características incomuns quando comparadas a glicoproteínas de outros *Paramyxovirus*. É sintetizada como um precursor de 36kDa que é modificado pela adição de açúcares na região N-terminal, originando um complexo intermediário de 45kDa. Estes açúcares formam complexos por meio da ligação ao oxigênio de outros açúcares e assim produzem a proteína ativa de aproximadamente 90kDa (COLINS et al., 2002).

Esta glicoproteína de superfície apresenta uma porção hidrofóbica correspondente aos aminoácidos 38 a 66, que fica ancorada à membrana do envelope viral. Existem poucos estudos que mostram a composição de sua estrutura secundária, e estes relatam uma composição predominante de folha *beta* (JOHNSON et al., 1987; CANE et al., 1991). Entretanto, tais interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Phe-165, Phe-168, Phe-170, Val-171, Pro-155, Pro-156 e Pro-159 parecem estabilizar um *loop* bem definido do resíduo 151-176 com elementos de estrutura secundária (GORMAN et al., 2001).

A proteína G é o maior alvo da resposta imune humoral. Estudos prévios têm analisado a reação de seres humanos a peptídeos baseados na sequência de aminoácidos do ectodomínio por anticorpos monoclonais (do Inglês *Monoclonal Antibodies – MAbs*), para detectar e mapear os epítomos nesta glicoproteína (GARCIA et al., 1993).

No entanto, sua estrutura madura é semelhante à mucina, característica exclusiva de hRSV. Tal similaridade pode alterar as propriedades físico-químicas do vírus, facilitando a disseminação ou evasão deste por meio do muco da célula hospedeira (COLLINS e GRAHAM, 2008). Também apresenta característica estrutural e funcional mimético ao da fractalcina, uma quimiocina pró-inflamatória que medeia a migração e adesão de leucócitos (TRIPP et al., 2001), o que explica seu papel na patogênese viral (HARCOURT et al., 2006).

Estudos iniciais com *MAbs* obtidos a partir das proteínas F e G do hRSV dividiram o vírus em dois grandes grupos: hRSVA e hRSVB (ANDERSON et al., 1985). Estudos de sequenciamento e RFLP (do Inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) baseados em diversos genes do hRSV tem mostrado uma subdivisão destes grupos antigênicos,

permitindo uma classificação genotípica adicional (ZLATEVA et al., 2005). Tais estudos têm utilizado principalmente o gene da proteína G.

A seqüência de aminoácidos da proteína G é altamente divergente, com identidade de 53% entre os grupos antigênicos (hRSVA e hRSVB) e até 20% de divergência dentro do mesmo grupo (JOHNSON et al., 1987). A existência dessa alta variabilidade pode ser responsável pela ocorrência de repetidas infecções pelo vírus (ZLATEVA et al., 2007). Tais características tem sido exploradas em estudos epidemiológicos do hRSV, para determinar o padrão dos genótipos circulantes em diversas regiões do mundo.

Os grupos antigênicos de hRSV apresentam padrão de circulação complexo, podendo múltiplos genótipos co-circularem numa mesma epidemia na comunidade e ainda há possibilidade de ocorrer à substituição anual do genótipo predominante (SATO et al., 2005). Um exemplo deste fenômeno foi descrito por Valdes e colaboradores (1998) que mostraram isolados de hRSV circulantes em Cuba em 1994-1995 similares a linhagem *Long*, isolada 40 anos antes.

Estudos de epidemiologia molecular têm identificado a circulação simultânea dos grupos de hRSV-A e B, durante surtos epidêmicos em diferentes anos nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul brasileiras (MOURA et al., 2004). Na cidade de Campinas-SP, a co-circulação dos diferentes genótipos também foi observada no período de abril a setembro de 2004 (SILVA et al., 2008).

As infecções causadas por variantes do hRSVA têm sido associadas a quadros clínicos mais severos e a produção de cargas virais significativamente mais altas do que as causadas por hRSVB (CAMPANINI et al., 2007). A predominância do sorotipo A nas epidemias tem sido atribuída a uma maior variabilidade dentro deste grupo (CAMPOS et al., 2007).

O estudo da diversidade genética do hRSV e a associação da distribuição sazonal de suas variantes antigênicas (A e B) com os quadros clínicos auxiliaria no estabelecimento de métodos de controle das epidemias em populações pediátricas regionais.

1.2.3 – As Características Epidemiológicas, a Patogênese e o Tratamento das Infecções por hRSV.

A principal característica epidemiológica do hRSV é a sazonalidade que varia de acordo com a região (LEE et al., 2007). Este fator dificulta a análise global do impacto de tais infecções, sendo necessários estudos epidemiológicos regionais.

A circulação das variantes antigênicas do hRSV pode diferir entre diferentes surtos epidêmicos, e estarem agrupadas de acordo com a localização geográfica (ZLATEVA et al., 2007). Em locais de clima temperado, um maior número de infecções está associado aos meses de inverno (THOMAZELLI et al., 2007). Em regiões tropicais e subtropicais, as epidemias ocorrem anualmente, podendo variar em função de fatores climáticos como temperatura, pluviometria e umidade relativa do ar ao longo do ano (MOURA et al., 2006).

Embora na América do Sul os picos de infecção tenham sido registrados nas estações de outono e inverno (VIEIRA et al., 2001), diferenças na sazonalidade do vírus são observadas no Brasil. O Brasil é um país de grande extensão territorial e apresenta diversidade climática regional. Enquanto no norte as chuvas representam o principal determinante climático, as variações de temperatura exercem um papel mais significativo nas regiões Sul e Sudeste brasileiras (CINTRA et al., 2001).

Na cidade de São Paulo (SP – Sudeste do Brasil), que apresenta clima subtropical, surtos epidêmicos de hRSV têm ocorrido no outono e inverno, com picos em maio (THOMAZELLI et al., 2007). Em Fortaleza (CE – Nordeste brasileiro), cidade de clima tropical típico, as epidemias de hRSV são distribuídas ao longo do ano, porém um aumento no número de casos também é observado nos meses de abril, maio e junho (MOURA et. al.,

2006). Em São José do Rio Preto (SP), o hRSV esteve associado aos períodos de seca (escassez ou ausência de chuvas e baixa umidade do ar) e temperaturas amenas, sendo detectados entre o outono e a primavera (SIMAS et al., dados não publicados).

As estimativas da incidência de hRSV nos países em desenvolvimento ainda são escassas. No entanto, os dados existentes indicam claramente que o vírus é encontrado em elevadas proporções de IRAs em crianças. Estudos realizados no Brasil, na Colômbia e na Tailândia sugerem que o hRSV sejam responsáveis por 20 a 30% dos casos de IRAs em crianças menores que 4 anos de idade, uma proporção similar a apresentada pelos países desenvolvidos (WHO, 2009).

Ricceto e colaboradores (2006) reportaram que, nos países em desenvolvimento, de 0,5% a 2% de todas as crianças infectadas por hRSV são hospitalizadas. Destas, de 7% a 21% desenvolveram insuficiência respiratória, levando a morte aproximadamente 0,5 a 1,5% dos casos.

Pesquisas realizadas em hospitais universitários brasileiros com crianças internadas por IRAs têm identificado hRSV variando entre 21 e 67% dos casos. A variabilidade na prevalência encontrada por tais estudos está relacionada principalmente às diferenças entre as populações e metodologias empregadas para o diagnóstico da infecção viral (FÉ, 2007). No entanto, estes dados ainda são pouco conhecidos na população brasileira, necessitando-se de maiores investigações relacionadas à prevalência do hRSV, e assim se estabelecer métodos de controle dos surtos epidêmicos.

O espectro da doença provocada pelo hRSV inclui uma grande variedade de sintomas, desde rinite e otite média à pneumonia e bronquiolite. Os seres humanos são reconhecidos como o único reservatório conhecido para hRSV (WHO, 2009). A disseminação viral ocorre a partir de secreções nasais contaminadas, e pelo contato direto com indivíduos infectados ou superfícies contaminadas (YUSUF et al., 2007).

O vírus pode persistir durante várias horas em brinquedos ou outros objetos, o que explica a elevada taxa de infecções por hRSV, particularmente em berçários, creches e enfermarias pediátricas (LOURENÇÃO et al., 2005). As infecções por hRSV acometem cerca de 70% das crianças no primeiro ano de vida e 100% das crianças com idade inferior a 24 meses (BUENO et al., 2008).

Quando IRAs provocadas pelo hRSV acometem somente o trato respiratório superior, são em geral caracterizadas por coriza, congestão nasal, tosse e febre. O vírus se multiplica nas células epiteliais do trato respiratório superior, onde causa um processo inflamatório que destrói o epitélio, provocando edema e aumento na produção de muco (KIM et al., 2007). No entanto, em hospedeiros susceptíveis, tais sinais clínicos comumente precedem, por poucos dias (em geral 2 a 3 dias), o acometimento do trato respiratório inferior (HENDERSON et. al., 2005).

O hRSV é a principal causa de doenças do trato respiratório inferior (DTRI) em crianças (KARRON, 2008), provocando quadro clínicos mais graves. Estima-se que seja responsável por 64 milhões de casos de IRAs e 160 mil mortes anuais no mundo (WHO, 2009). Infecções por hRSV também representam um problema grave para idosos (FALSEY e WALSH, 2000), indivíduos com doenças cardiopulmonares (WALSH e FALSEY, 1999) ou imunocomprometidos (RABONI et al., 2003).

Segundo a Classificação Internacional de Doenças, bronquiolite e pneumonia são as principais manifestações clínicas diagnosticadas nas infecções agudas do trato respiratório inferior (do Inglês *Lower Respiratory Tract Infections* – LRTI) (LANATA et al., 2004).

As células ciliadas dos bronquíolos e os pneumócitos do tipo I nos alvéolos são os maiores alvos do hRSV nas LRTIs (COLLINS e GRAHAM, 2008). Tais infecções provocam quadros clínicos mais graves, pois a rápida replicação viral induz à lesões no epitélio respiratório e conduz a deficiência funcional do pulmão, podendo levar à morte (DEVINCENZO, 2007).

Estudos baseados no diagnóstico clínico de infecções graves causadas por hRSV em crianças hospitalizadas têm reportado que o vírus é responsável por 50 a 90% dos casos de bronquiolite (YANNEY e VYAS, 2008) e 25% dos casos de pneumonia (ENNACIRI et al, 2007).

A bronquiolite provoca inflamação aguda, edema e necrose das células epiteliais das vias aéreas, o que aumenta a produção de muco e broncoespasmo (YANNEY e VYAS, 2008). O broncoespasmo é caracterizado pelo estreitamento transitório das vias aéreas, que leva ao estresse muscular provocado pelo aumento da ventilação pulmonar ou perfusão gasosa. As lesões virais estimulam o desencadeamento da resposta broncoconstritora (SUBCOMMITTE, 2006).

O derrame pleural também é diagnosticado nos casos mais graves. É um quadro clínico com presença de fluído no espaço lateral pleural, entre o pulmão e a parede da caixa torácica. Quando se examina a caixa torácica de uma criança com derrame pleural por ausculta, nota-se diminuição dos sons respiratórios e dificuldade para emitir sons vocais (LANATA et al., 2004).

A primeira infecção por hRSV está associada a um alto risco de infecção no trato respiratório inferior (ZHANG et al., 2007). No entanto, re-infecções podem ocorrer dentro de poucos meses após a exposição inicial ao vírus (SCOTT et al., 2006). A recidiva da infecção por hRSV tende a causar sintomas menos severos. No entanto, as re-infecções em crianças geralmente provocam uma freqüente ativação das células do sistema imune inato. Isto resulta em um microambiente pulmonar alterado e predispõe a criança re-infectada a doenças inflamatórias alérgicas, como a asma e chiado (BOUKHVALOVA et al., 2007).

Crianças infectadas por um determinado grupo antigênico são mais comumente re-infectadas com um grupo heterólogo (WARIS et al., 1991). Entretanto, tem-se observado que também pode ocorrer re-infecções por vírus pertencentes ao mesmo grupo antigênico ou genótipo detectados em infecções prévias (SATO et al., 2005). Os mecanismos da relativa

contribuição da diversidade antigênica e/ou a resposta imune inadequada no estabelecimento de re-infecções ainda precisam ser elucidadas.

Em adição, hRSV adquiridos naturalmente na comunidade não proporcionam uma resposta imunológica adaptativa completa nem durável. Crianças mais velhas e adultos, entretanto, usualmente são protegidos contra doença severa provocada pelo hRSV, sugerindo que a proteção duradoura ocorra tardiamente, após várias re-infecções (WHO, 2009).

A análise do soro e de secreções nasais de crianças infectadas por hRSV mostraram níveis aumentados de citocinas e quimiocinas ativadoras de Th-2, incluindo IL-4, IL-5 e MIP-1, bem com anticorpos IgE não neutralizantes. A proteína G induz a liberação de citocinas que ativam células TCD4+, mastócitos, basófilos e eosinófilos, o que provoca uma eosinofilia pulmonar severa e exacerbação da asma (ZHAO et al., 2002). Infecções repetidas em camundongos similarmente induziram uma inflamação persistente das vias aéreas e hipersensibilidade, que são características de asma (MATSUSE et al., 2007).

Não há até o presente nenhum tratamento específico contra as IRAs por hRSV. O controle das infecções é obtido principalmente por meio da imunoprofilaxia. Nos casos de IRAs severas, tem-se utilizado Ribavirina, suporte com O₂ e algumas de medidas de suporte, como aumento na administração de fluídos para prevenir a desidratação e uso de anti-térmicos para reduzir a febre. O uso de antibióticos também é indicado para evitar infecções bacterianas oportunistas (WHO, 2009).

A imunização passiva na forma de imunoglobulinas (Ig) hRSV-neutralizantes ou anticorpos monoclonais tem sido administrada profilaticamente para prevenir infecções por hRSV. No entanto, esta medida é de alto custo e é utilizada apenas em populações de alto risco, como crianças prematuras e indivíduos com doenças cardiopulmonares (CARDENAS et al., 2005; PUDDU e FANOS, 2007).

O sucesso obtido pelo processo de imunização passiva demonstra que os anticorpos humorais exercem um importante papel protetor contra as infecções por hRSV. Em geral,

secreções de IgAs e anticorpos séricos parecem proteger contra as infecções tanto do trato superior quanto do trato inferior, enquanto que a imunidade mediada por células T se encarregam por ajudar a exterminar as infecções virais (WHO, 2009).

Muitos trabalhos têm sido realizados para o desenvolvimento de vacinas ou inibidores virais para a prevenção e tratamento da doença por hRSV. No entanto, a produção de vacinas tem sido complicada principalmente pelo fato da resposta do sistema imune do hospedeiro exercer um significativo papel na patogênese da doença provocada pelo vírus (CARDENAS et al., 2005; PUDDU e FANOS, 2007).

Crianças que foram imunizadas com vacinas de hRSV-formalina inativos na década de 60 apresentaram doenças mais severa e eosinofilia pulmonar, levando a 80% de hospitalização e 2 mortes (CHIN et al., 1969), provavelmente devido a uma resposta exacerbada pelas células Th-2 e falha na indução da resposta por células TCD8+ (CASTILOW et al., 2008).

Estratégias como mutações genéticas ou deleções do material genético viral tem sido utilizadas para a produção de vacinas a partir de hRSV atenuados (COLLINS e MURPHY, 2002). No entanto, um balanço apropriado entre a atenuação e a imunogenicidade tem sido o maior obstáculo para o desenvolvimento destas vacinas (WHO, 2009).

Outras estratégias para a produção de vacinas tem sido desenvolvidas a partir de vetores bacterianos e virais utilizados para expressão principalmente das proteínas F e/ou F e G do hRSV. No entanto, os testes realizados em adultos saudáveis tem mostrado baixa imunogenicidade (ISON et al., 2002), ou ainda proporcionado efeitos colaterais severos (reação de hipersensibilidade do tipo 3, por exemplo) (WHO, 2009).

A vacina RSV/PIV-3 (MEDI 534TM), um vetor para expressar as proteínas F, ou F e G dos subgrupos A ou B de hRSV, mostrou-se segura e bem tolerada nos estudos clínicos de fase I. Tais estudos foram conduzidos pela *MedImmune*, nos Estados Unidos, em adultos e

crianças soropositivas com idade entre 1 e 9 anos. Os testes estão no início da fase IIa para triagem clínica em crianças de 0-2 meses e 6-24 meses de idade (WHO, 2009).

Na ausência de uma vacina imunogenicamente eficaz e de tratamento específico contra infecções pelo hRSV, é necessário entender a epidemiologia molecular regional e global do vírus. Dessa forma, é preciso determinar a relação entre os padrões de circulação dos seus genótipos e associar as características clínicas com infecções repetidas em diferentes comunidades.

Algumas das características associadas à heterogeneidade dos isolados parecem sugerir que a diversidade é crucial para a infecção e doença provocadas pelo hRSV. No entanto, mais estudos longitudinais são necessários para definir o papel da variação genética nas re-infecções por hRSV em diferentes comunidades.

A maioria dos trabalhos epidemiológicos do hRSV são realizados com populações hospitalizadas, assim, o impacto das IRAs virais, bem como do hRSV, em crianças assistidas em creches são escassos. Estas crianças são altamente susceptíveis a re-infecções e estudos sobre a incidência destes agentes etiológicos forneceriam dados relevantes sobre tais agentes bem como das pressões seletivas que atuam na evolução dos vírus circulantes.

Este trabalho foi motivado a partir da Rede de Diversidade Genética de Vírus – VGDN (do Inglês, *Viral Genetic Diversity Network*), lançada pela FAPESP, dentro do programa Genoma FAPESP. Este é o primeiro estudo realizado sobre o padrão de circulação de hRSV em São José do Rio Preto-SP, integrado ao projeto “Investigação de Vírus Respiratórios e Sequenciamento de RSV Coletadas de Crianças com Infecções Respiratórias na Cidade de São José do Rio Preto” (Processo 07/54586-3).

2. Objetivos

2.1 – Objetivo Geral:

O objetivo geral deste estudo foi realizar a caracterização molecular de vírus sincicial respiratório humano (hRSV) isolados a partir de amostras de aspirado nasofaringe colhidas de crianças de 0 a 6 anos com infecção respiratória aguda, procedentes da creche municipal “Maria Inês Arnal” e internadas no Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP.

2.2 – Objetivos Específicos:

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Determinar o genótipo dos isolados de hRSV por meio do sequenciamento da região variável (G2 – carboxi terminal) do gene da proteína G e construir a topologia;
2. Identificar o padrão de circulação dos diferentes grupos antigênicos de hRSV (A e B) e seus subgrupos, nos grupos de estudo;
3. Associar dados clínicos com a presença do hRSV dentro das e/ou entre os grupos de estudo.

3. Material e Métodos

3.1 – Considerações éticas

Este trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Projeto nº 3777/2001 e aprovado em 11 de Junho de 2001 com o parecer 062/2001 (Anexo I).

Os responsáveis pelas crianças foram contatados e informados sobre o estudo, sendo livre a participação ou não na pesquisa. Foram incluídas no estudo apenas crianças cujos pais ou responsáveis autorizaram os procedimentos de colheita das amostras e a utilização das mesmas nos experimentos laboratoriais.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II) garante aos participantes sigilo e anonimato nas análises assim como na divulgação dos resultados da pesquisa. Os pesquisadores estarão à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa e resultados.

3.2 – Casuística

O estudo foi conduzido utilizando-se amostras de secreção nasofaringe obtidas de crianças com idade entre 0 e 6 anos provenientes da creche municipal “Maria Inês Arnal” (817) e de crianças internadas no Hospital de Base (272) de São José do Rio Preto-SP com sintomas de infecções respiratórias agudas. As amostras foram colhidas entre julho de 2003 e setembro de 2005 na creche e entre maio de 2004 e setembro de 2005 no hospital.

3.3 – Histórico dos pacientes

Para a obtenção do histórico da criança foram utilizados dois questionários para pesquisa, um para coletar dados gerais (identificação, idade e sexo; antecedentes pessoais e familiares; histórico de infecções respiratórias – presença e caracterização de chiado; internações anteriores), e outro para obtenção de dados clínicos no decorrer da infecção

respiratória aguda (dados clínicos; dados de exames físicos; dados de medicações em uso; dados complementares – necessidade de internação e uso de O₂) (Anexos III e IV).

Nos episódios de re-infecções, para assegurar que o agente etiológico encontrado fosse característico da infecção respiratória atual e não o patógeno residual causador de infecções respiratórias anteriores, foi respeitado um intervalo de 7 dias ou mais entre o final e o reinício dos sintomas.

3.4 – Processamento das Amostras de Secreção Nasofaringe

A obtenção do material de secreção nasofaringe foi conduzida por um enfermeiro ou um fisioterapeuta. A secreção nasal foi fluidificada com 1mL de *Ringer-Lactato* (Sanobiol – Brasil) e posteriormente colhida com *swab* e sonda de aspiração neonatal estéril e descartável. Os aspirados obtidos foram armazenados em frascos estéreis identificados com nome e um número de protocolo individual para cada criança, contendo 3mL de *Ringer-Lactato* (Sanobiol – Brasil) em cada frasco, mantidos em gelo e encaminhados ao laboratório para serem processados.

Nos procedimentos laboratoriais, os aspirados foram diluídos em PBS pH 7,2 (*Phosphate Buffered Saline* – NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄). Foram adicionados antibiótico (10mg/mL de penicilina/estreptomicina, Cultilab – Brasil) e antifúngico (50mg/mL de sulfato de gentamicina, Cultilab – Brasil) aos fluidos, que foram divididos em duas alíquotas de 250µL cada, uma para procedimentos de cultivo celular (adição de 750µL de Meio Mem EARLE (Cultilab – Brasil) e outra para a extração de RNA (adição de 750µl de Trizol-LS (*Invitrogen*[®] – USA)). Todas as amostras foram armazenadas a –80°C.

3.5 – Cultivo em Células Hep2 (*Human Epithelial Cells Type 2*) para Isolamento de hRSV

Para o isolamento do Vírus Sincicial Respiratório Humano utilizou-se cultivo em células Hep2 (*Human Epithelial Cells Type 2*, originárias de carcinoma de laringe –

fornecidas pelo laboratório da Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune – UNESP, Campus de Botucatu). As células Hep2 estocadas em Meio DMEM (Cultilab – Brasil) e 15 % de Glicerol (IQT – Brasil) encontravam-se armazenadas em nitrogênio líquido e foram descongeladas à temperatura ambiente. Após o descongelamento, foram adicionados, em garrafas de 25cm², 1mL de células a 4mL de meio de crescimento (Meio DMEM, Cultilab – Brasil; enriquecido com 10% de soro fetal bovino, Cultilab – Brasil; 10mg/mL de penicilina/estreptomicina, Cultilab – Brasil; 50mg/mL de sulfato de gentamicina, Cultilab – Brasil; 10mM aminoácido não essencial, Cultilab – Brasil; e 100mM de piruvato de sódio, Na(HCO)₃). As células foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, e foram observadas diariamente. O meio foi trocado a cada 48 horas.

Quando se observou 100% de confluência das células nas garrafas (tapete celular completo), o meio foi desprezado e o tapete celular lavado 2 vezes com tampão PBS pH 7,2. Para a realização do repique celular, foi adicionado 1mL de Tripsina–EDTA (Cultilab – Brasil), movimentando-se suavemente a garrafa de 30 a 60 segundos por inversão e a mesma foi mantida em estufa à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por aproximadamente 10 minutos.

Após o período de incubação, o tapete celular foi ressuspensionado em 5mL de meio crescimento. A suspensão (500µL) contendo as células foi distribuída em placas para cultura (24 *wells*) (figura 3) que foram mantidas em estufa à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 48 horas até a observação de semiconfluência no tapete celular (tapete celular aproximadamente 80% completo), etapa em que foi realizado o procedimento de inoculação viral.

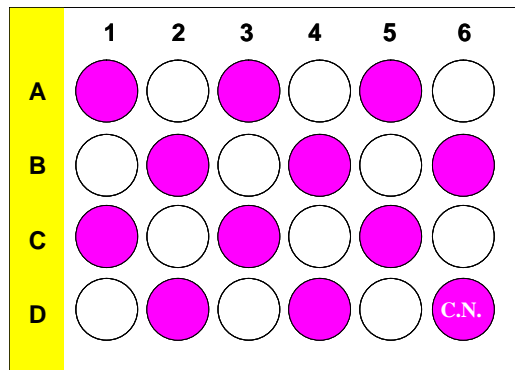


Figura 3: Representação esquemática do modelo executado no cultivo de células Hep2 para o isolamento do Vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV). Círculos brancos: *wells* vazios, sem células; Círculos rosas: cultivo de células *Hep2* e inóculos de hRSV; Círculo rosa D6 (C.N. – controle negativo): presença de células *Hep2* sem inoculação viral)

Para o processo de inoculação viral, o meio foi retirado por aspiração e o tapete celular foi lavado 2 vezes com 2mL de tampão PBS pH 7,2. Em seguida, foi inoculado 300µL de amostra de secreção nasofarínge positivas para hRSV armazenadas em Meio DMEM (Cultilab – Brasil). Cada inóculo foi espalhado uniformemente sobre o tapete celular, adicionando-se em seguida 500µL de meio de manutenção (Meio DMEM, Cultilab – Brasil; enriquecido com 2% de soro fetal bovino, Cultilab – Brasil; 10mg/mL de penicilina/estreptomicina, Cultilab – Brasil; 50mg/ml de sulfato de gentamicina, Cultilab – Brasil; 10mM aminoácido não essencial, Cultilab – Brasil; e Na(HCO)₃), mantendo-se a cultura em estufa à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

As placas foram observadas diariamente para visualização do efeito citopático. O meio foi trocado 72 horas após a inoculação viral e posteriormente a cada 48 horas. O repique da cultura infectada foi realizado a cada 7 dias até se completarem 21 dias, e as células foram estocadas em Trizol-LS (*Invitrogen*[®] - USA) à temperatura –80°C para posterior extração de RNA.

3.6 – Extração de RNA

Às alíquotas de cada amostra contendo Trizol-LS (*Invitrogen*[®] – USA) foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck – GER); a mistura foi homogeneizada e incubada em gelo por 5 minutos. O material foi centrifugado a 13400g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril adicionando-se 400µL de Isopropanol (Sigma – USA), o qual foi homogeneizado e incubado por 15 minutos em gelo. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas novamente a 13400g, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 800µL de Etanol 75% (Merck – GER) aos tubos contendo o precipitado. Em seguida, o material foi centrifugado a 6000g, por 8 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado de RNA foi deixado a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos e em seguida ressuspenso em 50µL de água MilliQ tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato – Sigma – USA) contendo 80U de inibidor de *RNAse* (*RNAse OUT* – *Invitrogen* – USA – 40U/µL).

3.7 – Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando *High Capacity cDNA Archive Kit* – *Applied Biosystems* (USA), conforme instruções do fabricante. Para cada amostra, as reações foram preparadas contendo 50µL de RNA diluído em água livre de *RNAse*, 10µL de 10X *Random Primers*; 10µL de 10X RT Buffer, 4µL de 25X dNTP (100mM), 6µL de *Multiscribe (Reverse Transcriptase Enzyme* – 2.5U/µL) e de água MiliQ tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato – Sigma – USA) q.s.p. 100µL. A reação foi submetida ao *GeneAmp*[®] *PCR System 9700 Thermocycler* (*Applied Biosystems*) a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, mantida a 4°C por curto intervalo de tempo e posteriormente estocada à -20°C.

3.8 – Amplificação por PCR e Semi-Nested PCR

As reações de amplificação por PCR e Semi-Nested PCR foram realizadas com 1X Buffer (*Biotoools* – Espanha), 1mM de MgCl₂ (*Biotoools* – Espanha), 0,2mM de dNTPs (*Applied Biosystems* – USA), 0,2pmol/μL de cada um dos *primers* específicos (tabela 1) e 2U de DNA polimerase (*Biotoools* – Espanha).

Nas reações de PCR, foram utilizados os *primers* FV e GAB (tabela 1) e 5μL de cDNA, adicionando-se água MilliQ q.s.p. 50μL de reação. Quando não houve amplificação na reação de PCR, a amostra foi submetida à reação de Semi-Nested PCR.

Nas reações de Semi-Nested PCR, foram mantidas as condições iniciais da reação de amplificação por PCR, utilizando-se os *primers* F1AB e GAB (tabela 1) e 1μL de produto de PCR, adicionando-se água MilliQ q.s.p. 50μL de reação.

As reações foram submetidas ao *GeneAmp® PCR System 9700 Thermocycler* (*Applied Biosystems*) à 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos, e um passo de extensão final de 72°C por 7 minutos. Após término da amplificação, o produto de reação foi mantido a 4°C e posteriormente estocado à -20°C.

Em todas as reações foram utilizados um controle positivo e um controle negativo. Para o controle positivo foram utilizadas amostras de cDNA (hRSVA padrão cultivado células *Hep2*, fornecidas pelo laboratório da Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune – UNESP, Campus de Botucatu) ou de produto de PCR. O controle negativo continha todos os reagentes da PCR e/ou Semi-Nested PCR e água. Foram considerados apenas os resultados obtidos nas reações em que houve amplificação no controle positivo e concomitantemente não houve contaminação do controle negativo.

Tabela 1: Relação dos *primers* utilizados para reações de amplificação nas reações de PCR, Semi-Nested PCR e Sequenciamento dos isolados de hRSV, destacando-se para cada *primer* sua seqüência e em que reação foi utilizada, a região genômica e a posição em ocorreu o anelamento. Nota: Y corresponde aos nucleotídeos C ou T

Primers	Reação	Região genômica	Posição de anelamento	Seqüência e Referência
FV (-)	PCR e Sequenciamento	Proteína F	163 – 186	5' GTT ATG ACA CTG GTA TAC CAA CC 3' Zheng et. al , 1996
GAB (+)	PCR/Semi-nested PCR e Sequenciamento	Proteína G	504 – 524	5' YCA YTT TGA AGT GTT CAA CTT 3' Peret et. al., 2000
F1AB (-)	Semi-Nested PCR e Sequenciamento	Proteína F	3 – 22	5' CAA CTC CAT TGT TAT TTG CC 3' Peret et. al., 1998

A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,3%, utilizando-se de Brometo de Etídeo (0,5µg/mL) para visualização das bandas sob trans-illuminação Ultra Violeta. Os tamanhos dos produtos de PCR e Semi-Nested PCR foram de aproximadamente 650 e 500bp, respectivamente.

3.9 – Purificação dos Produtos Amplificados

A purificação dos produtos de PCR e Semi-Nested PCR foi realizada em colunas com a utilização do *Qiagen PCR Purification Kit* (*Qiagen – USA*), conforme instruções do fabricante.

Para o procedimento, todas as centrifugações foram realizadas a temperatura ambiente por 1 minuto a 16000g. Foram adicionados à coluna 5 volumes de *Buffer PB* (*Qiagen – USA*) para cada volume de produto de PCR/Semi-Nested PCR a ser purificado. As colunas foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 750µL de *Buffer PE* (*Qiagen – USA*) contendo Etanol 100% (*Merck – GER*), centrifugando-se novamente. As colunas foram transferidas para tubos 1,5mL. Foram adicionados 30µL de

Elution Buffer (10mM Tris-Cl, pH 8,5 – *Qiagen* – USA) às colunas, que foram incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente e em seguida centrifugadas.

A eficiência da purificação também foi verificada em gel de agarose 1,3% corado com Brometo de Etídeo (0,5µg/mL) para confirmação das bandas sob trans-iluminação Ultra Violeta.

3.10 – Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas com *Big Dye Sequencing Kit v.3* (*Applied Biosystems*). Para cada reação, utilizou-se 2µL de reagente para marcação fluorescente fornecido pelo kit, 0,4µL de *primer* (10pmol/µL) (F1AB), 5,6µL de produto de PCR/Semi-Nested PCR purificado. As condições de termociclagem foram 96°C por 60 segundos acrescidos de 25 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos em *GeneAmp® PCR System 9700 Thermocycler* (*Applied Biosystems*). As amostras foram armazenadas a –20°C ao abrigo da luz até serem precipitadas.

O procedimento de precipitação foi realizado conforme instruções do fabricante do kit (*Big Dye Sequencing Kit v.3 - Applied Biosystems*), à temperatura de 20°C. Foram adicionados 60µL de Isopropanol 100% (Merck – GER) e 30µL de água ultra-pura às reações de sequenciamento, homogeneizando-se em *vortex* por 15 segundos e incubando-se a temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 2254g por 30 minutos para a precipitação do DNA. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a placa permaneceu invertida sobre papel absorvente ao abrigo da luz por 10 minutos e posteriormente, ainda invertida, foi submetida a uma nova centrifugação a 35g por 1 minuto. Foram adicionados 150µL de Etanol 75% (Merck – GER) às amostras, centrifugando-se novamente por 30 minutos 2254g. O etanol foi descartado e a placa contendo as amostras foi novamente incubada invertida em papel absorvente ao abrigo

da luz por 10 minutos e em seguida centrifugada invertida por 1 minuto a 35g. As amostras foram armazenadas a -20 °C ao abrigo da luz até serem seqüenciadas.

Para cada amostra, foi adicionado 10µL de Formamida (*Applied Biosystems* – USA), incubando-se por 5 minutos à 95°C e em seguida por 2 minutos em gelo até serem submetidas ao seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado *ABI 3130XL DNA Sequencer* (*Applied Biosystems*).

3.11 – Análises de Bioinformática e Estatísticas

Todas as amostras foram seqüenciadas ao menos duas vezes para a obtenção das seqüências consensos. A análise qualitativa dos cromatogramas resultantes do seqüenciamento e a obtenção dos *contigs* de cada amostra foram realizadas pelo programa *Electropherogram Quality Analysis* (Disponível no site: <http://asparagin.cinargen.embrapa.br/phph/>).

Seqüências parciais de hRSV dos grupos A e B isolados por este estudo foram comparadas a seqüências referências disponíveis no *GenBank*, conforme distribuição apresentadas nas tabelas 2 (hRSV A) e 3 (hRSV B).

Todas as seqüências *contigs* de 270 e 330 nucleotídeos foram organizadas com o programa *Muscle* (EDGARD, 2004), correspondentes aos nucleotídeos de 649-918 (grupo A, linhagem protótipo A2 – M11483) e 652-921 (grupo B, linhagem protótipo – CH18537) do gene G do hRSV (PERET et al., 1998).

O alinhamento múltiplo das seqüências foi realizado usando o programa *Clustal W version 1.83* (GIBSON, 1998) e a edição foi realizada manualmente com os programas *GeneDoc 2.6.002* (NICHOLAS et al., 1997) e *BioEdit 5.0.9* (HALL, 1999).

As árvores foram obtidas utilizando *PAUP* version 4.0b10* (SWOFFORD, 1999). A robustez dos agrupamentos de cada árvore filogenética foi realizada com *bootstrap* de 1000 repetições para o *Neighbor-Joining* (NJ) e por *Zero Branch Length Test* para as árvores de ML. O melhor modelo de substituição nucleotídica foi HKY85, determinado a partir dos

dados com *Modeltest version 3.7* (POSADA e CRANDALL, 1998). As árvores foram plotadas usando *Treeview version 1.4* (PAGE, 1996).

As seqüências *USA/Long/56* (M17212, grupo A – tabela 2) e CH18537 e NC1781 (grupo B – tabela 3) foram incluídas como *outgroup* nas análises filogenéticas.

As relações evolutivas entre os diferentes haplótipos foram reconstruídas pelo método *Media Joining Network* (BANDELT, 1999), mutaçõespor meio do software *Fluxus Network, versão 4.5.1.0*, gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Cláudia Márcia Aparecida Carareto. Este programa permite uma representação gráfica – redes filogenéticas – das relações de parentesco entre as seqüências (ancestral-descendente).

Foram realizadas análises de divergência entre as seqüências estimando-se os índices de diversidade nucleotídica (π), que corresponde ao número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas seqüências, pelo programa *DnaSP version 5.00.07* (ROZAS et al., 2009) e a distância genética média utilizando o programa *MEGA4* (TAMURA et al., 2007), usando-se o modelo de substituição nucleotídica *p-distance pairwise deletion*. Foram feitos também testes de neutralidade (D de Tajima, TAJIMA, 1989) utilizando o programa *DnaSP version 5.00.07* (ROZAS et al., 2009).

As análises estatísticas utilizadas para a associação dos dados clínicos das crianças com os fatores epidemiológicos virais foram realizadas com o auxílio do programa *MINITAB™ version 15*. A significância estatística dos resultados encontrados foi calculada pelo Teste do Qui-quadrado (FISHER, 1922; PLACKETT, 1983; PUHAN et al., 2005). Apenas valores de *p value* < 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

A nomenclatura das amostras isoladas por este estudo foi representada pelas siglas: Identificação do Isolado (3 letras para os isolados provenientes de crianças de creche; números contendo 2 ou 3 algarismos para os isolados de crianças hospitalizadas) + Ano de Isolamento (com 2 algarismos; Ex: 04 para isolados do ano de 2004) + Local de Origem (H – para crianças hospitalizadas; C – para crianças de creche).

Tabela 2: Sequências referências hRSVA utilizadas para a genotipagem e construção da topologia dos isolados de hRSV de São José do Rio Preto. As informações representam o número de acesso ao banco de dados, o local de isolamento e a que genótipo pertence.

Número de Acesso - Nome	Local de Isolamento	Genótipo
M17212 – Long	USA – 1956	OUTGROUP
M11486 – A2	Melbourne – AUS – 1961	
AF065257 – CH34	Rochester – USA	
AF233902 – AL19471-5	Alabama – USA	GA1
AF233914 – MO48	Saint Louis – USA	
AF233917 – NY108	Rochester – USA	
AF233900 – AL19376-1	Alabama – USA	
AF233915 – MO55	Saint Louis – USA	
AF233923 – TX69564	Houston – USA	
AF065256 – CH28		
AF065258 – CH57	Rochester – USA	
EU582161 – BR266-05		GA2
EU582162 – BR292-05	São Paulo – BRA	
SPAL397-05		
RP1836-05		
RP221-05	Ribeirão Preto – BRA	
AF233911 – MO13	Manitoba – CAN	
AF233905 – CN2395		
EU582169 – BR117/96	BRA	
EU285170 – BR06-97		GA3
AF233913 – MO16	Saint Louis – USA	
AF233920 – TX68481		
AF233921 – TX68532	Houston – USA	
AF065254 – CH09	Rochester – USA	
FJ391391 – GER2733-00-01	Berlim – GER	
AY146423 – Ab34Pt00	South Africa	GA4
AF193306 – SK91242	South Korea	
AF065255 – CH17	Rochester – USA	
AF233903 – AL19556-3	Alabama – USA	
AF233906 – CN2708		
AF233908 – CN3114	Manitoba – CAN	
AF233909 – MO01		
AF233912 – MO15	Saint Louis – USA	
AF233916 – NY103	Rochester – USA	
AF233919 – TX67951		GA5
AF233922 – TX69343	Houston – USA	
EU582165 – BR181-05		
EU582166 – BR278-05	BRA	
EU582167 – BR306-05		
EU582168 – BR315-05		

Tabela 2: continuação Sequências referências hRSVA utilizadas para a genotipagem e construção da topologia dos isolados de hRSV de São José do Rio Preto. As informações representam o número de acesso ao banco de dados, o local de isolamento e a que genótipo pertence.

Número de Acesso - Nome	Local de Isolamento	Genótipo
EU582352 – BR153-05	BRA	
EU635818 – RP080-05		
EU635820 – RP111-05	Ribeirão Preto - BRA	GA5
RP1102-04		
SPAL263-05		
SPAL306-05	São Paulo – BRA	
AF233901 – AL19452-2	Alabama - USA	
AF233918 – NY20	Rochester – USA	GA6
AF233907 – CN2851	Manitoba - CAN	
AF233910 – MO02	Saint Louis – USA	GA7

Tabela 3: Sequências referências hRSVB utilizadas para a genotipagem e construção da topologia dos isolados de hRSV de São José do Rio Preto. As informações representam o número de acesso ao banco de dados, o local de isolamento e a que genótipo pertence.

Número de Acesso - Nome	Local de Isolamento	Genótipo	
M73545 – Sw8-60	SWE	OUTGROUP	
M17213 – CH18537-62	Columbia – USA		
M73541 – WV10010-83	West Virginia – USA		
NC1781		GB1	
M73543 – NM1355-89	New Mexico – USA		
AF065250 – CH10b-91	USA		
AF065251 - CH93-9b	USA	GB2	
AF233925 – AL19794-1	Birmingham – USA		
AF065252 – CH93-18b	USA		
AF065253 – CH93-53b			
AF233927 – CN3521	Winnipeg – CAN	GB3	
AF233929 – MO35	Saint Louis – USA		
AF233930 – MO53			
AF233932 – NY97	Rochester – USA		
AF348820 – SA98V220	South Africa		
AF233933 – TX69208	Houston – USA		
RP040 2005			
RP103 2005			
RP108 2005	Ribeirão Preto-SP – BRA		
RP161 2005			
RP193 2005			
RP259 2005			
DQ227399 – BA144502			
AY333362 – BA3833-99B			
DQ227404 – BA/4909/03			
DQ227392 – BA/4974/03			
DQ227390 – BA/4915/03		BA	GB3
DQ227394 – BA/6564/03			
DQ227388 – BA/1889/02			
DQ227387 – BA/1856/02			
DQ227405 – BA/5021/03	Buenos Aires – ARG		
DQ227397 - BA/1607/04			
DQ227408 – BA/1526/04			
DQ227395 – BA/100/04			
DQ227396 – BA/524/04			
DQ227406 – BA/354/04			
DQ227407 – BA/493/04			
AY333364 – BA4128-99B			
DQ227398 – BA/1326/99			
AY333363 – BA3859-99B			

Tabela 3: continuação Sequências referências hRSVB utilizadas para a genotipagem e construção da topologia dos isolados de hRSV de São José do Rio Preto. As informações representam o número de acesso ao banco de dados, o local de isolamento e a que genótipo pertence.

Número de Acesso - Nome	Local de Isolamento	Genótipo	
AY660681 – Ken29-03	Kenia		
AY927402 – QUE/29/01-02			
AY927412 – QUE/155/01-02	Quebec - CAN		
AY927401 – QUE/18/02-03			
AB175819 – NG-004-03			
AB175821 – NG-153-03	Nigata – JAP		
AB175820 – NG-006-03			
AY751104 – BE/1162/02		BA	GB3
AY751102 – BE/11609/01			
AY751123 – BE/1066/03			
AY751103 – BE/1613/02	Belgium		
AY751127 – BE/758/02			
AY751130 – BE/12369/01			
AY751131 – BE/13417/99			
DQ289649 – BeijingB/04/11	Beijing		
AF233926 – CN1839	Winnipeg – CAN		
AF233928 – MO30	Saint Louis – USA		
AF233924 – AL19734-4	Birmingham – USA	GB4	
AF233931 – NY01	Rochester – USA		
EU582427 – BR42-1999	BRA		
AY226535 – V0041KS01			
AY226522 – G19S01			
AF348825 – SA0025	Soweto – SAF	SAB1	
AF348826 – SA98D1656			
AF348822 – SA99V1325			
AF348821 – SA99V800	Soweto – SAF	SAB2	
AY226536 – V2004KS01			
AY226526 – 0112KS01			
AY226537 – VG72S01			
AY226525 – 0072S01	Soweto – SAF	SAB3	
AY226519 – G102S01			

4. Resultados

4.1 – População de Estudo e Caracterização Epidemiológica do hRSV.

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras previamente testadas para presença de hRSV. O diagnóstico molecular foi realizado pelo método de RT-PCR e desta análise obteve-se uma positividade de 7,7% (63/817) nas amostras provenientes de crianças da creche de 29% (79/272) nas amostras provenientes de crianças hospitalizadas.

A figura 4 representa uma fotografia de um gel de agarose 1,3% contendo os amplificados (500bp) obtidos por reação de Semi-Nested PCR da porção hipervariável G2 do gene da proteína G do hRSV. São evidenciados PM (peso molecular de 100bp), o padrão de amplificação para as amostras 145HB05 e C+ (controle positivo da reação), e Br (branco controle negativo da reação).

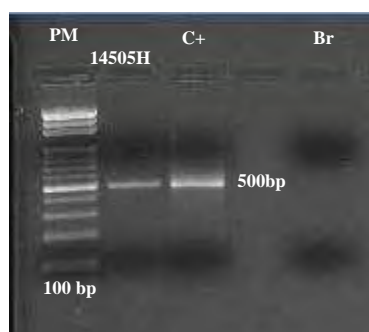


Figura 4: Fotografia de um gel de agarose 1,3% destacando o padrão do *amplicon* obtido na reação de Semi-Nested PCR das amostras 14505H e controle positivo (produto de PCR obtido a partir de cDNA de cultivo de HRSVA em células Hep2). PM: marcador de peso molecular de 100 pares de bases; 14505H: amostra 145 proveniente de criança hospitalizada isolada no ano de 2005; C+: controle positivo da reação; Br: controle negativo da reação. Os produtos amplificados pela reação de Semi-Nested PCR apresentaram tamanho aproximado de 500pb.

Em relação às infecções por hRSV, evidenciou-se uma maior prevalência em crianças com idade inferior a 4 anos (cerca de 80% das infecções). Nas crianças hospitalizadas, o principal motivo diagnóstico identificado foi pneumonia (53,2% dos casos de infecções respiratórias), que apresentaram sintomas referidos a quadro clínicos mais severos, como sibilos e falta de ar. A relação da presença de hRSV com o sexo, idade, motivo

diagnóstico da internação (descrição disponibilizada apenas para as crianças hospitalizadas) e sintomas apresentados pelas crianças está descrita na tabela 4.

Tabela 4: Relação da presença de hRSV em amostras de secreção nasofaringe com o sexo, idade, motivo diagnóstico para internação (descrição disponibilizada apenas para as crianças hospitalizadas) e sintomas apresentados por crianças que freqüentavam a creche municipal “Maria Inês Arnal” no período de julho de 2003 a setembro de 2005 e que tiveram internadas no Hospital de Base no período de maio de 2004 a setembro de 2005 em São José do Rio Preto-SP.

Variáveis		hRSV	
		Creche % (n = 63)	Hospital % (n = 79)
Sexo	Masculino	55,6 (35)	48,1 (38)
	Feminino	44,4 (28)	51,9 (41)
Idade (meses)	0 a 24	50,8 (32)	35,4 (28)
	25 a 48	31,7 (20)	46,8 (37)
	Acima de 49	17,5 (11)	17,8 (14)
Motivo Diagnóstico na Internação	Pneumonia (PNM)	-	53,2 (42)
	Broncoespasmo (BCE)	-	13,9 (11)
	Bronquiolite (BLT)	-	38 (30)
	Derrame Pleural (DPL)	-	8,9 (7)
	PNM + BLT	-	2,5 (2)
	PNM + BCE	-	1,25 (1)
	PNM + DPL	-	8,9 (7)
Sintomas	Tosse	55,6 (35)	91,1 (72)
	Febre	6,3 (4)	88,6 (70)
	Falta de Ar	-	70,9 (56)
	Chiado	4,8 (3)	69,6 (55)
	Coriza	95,2 (60)	59,5 (47)
	Sibilos	-	51,9 (41)
	Obstrução Nasal	30,2 (19)	41,8 (33)

Quanto à distribuição sazonal do hRSV nas crianças da creche (63/817), o vírus foi detectado nos meses julho (4/28), agosto (5/34), setembro (9/34) e outubro (2/22) de 2003; em março (1/19), maio (4/38), junho (3/65), julho (2/20), outubro (3/43), novembro (1/34) e dezembro (1/9) de 2004; e em março (5/31), abril (1/50), maio (4/64), agosto (12/49) e setembro (6/48) de 2005. Embora tenham sido colhidas amostras nos meses de novembro e dezembro de 2003, de agosto e setembro de 2004, e de junho e julho de 2005, não houve

deteccção de hRSV. O mês de janeiro representou o período de férias das crianças e dessa forma não há dados referentes às infecções respiratórias (figura 5).

Nas crianças hospitalizadas, houve deteção de hRSV durante todos os meses avaliados em 2004 (maio (3/4), junho (1/6), julho (12/15), agosto (6/11), setembro (11/16), outubro (10/32), novembro (5/22) e dezembro (1/9)); e nos meses de março (10/27), abril (10/40), maio (2/28), junho (3/17), agosto (4/25) e setembro (1/6) de 2005. Pelo fato do período de estudo ter se iniciado em maio de 2004 e ter se encerrado em setembro de 2005, não há registros de infecções respiratórias de janeiro a abril (2004) nem de outubro a dezembro (2005) (figura 5).

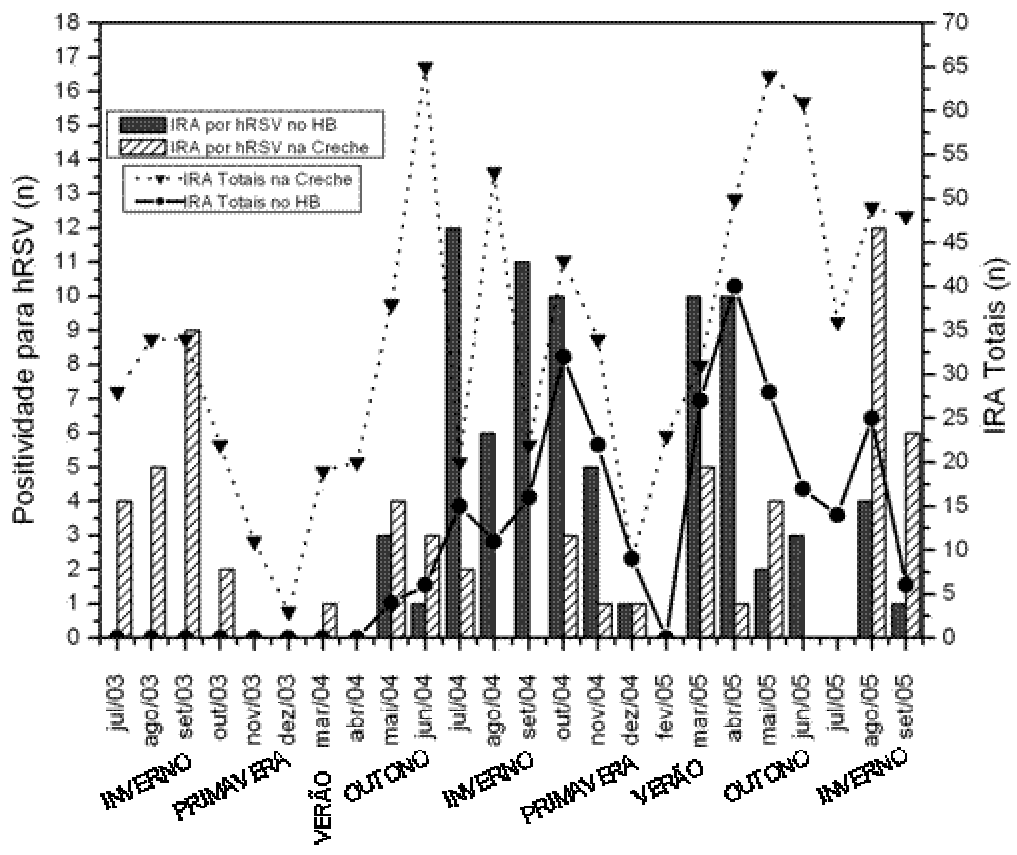


Figura 5: Análise da distribuição sazonal de infecções respiratórias agudas em crianças de 0 a 6 anos de idade que freqüentaram a Creche Municipal “Maria Inês Arnal” durante o período de julho de 2003 a setembro de 2005, e que tiveram internadas no Hospital de Base entre maio de 2004 a setembro de 2005, em São José do Rio Preto-SP, comparando-se a positividade para o vírus sincicial respiratório humano (hRSV) com o total das infecções.

4.2 – Análises Filogenéticas de hRSV Circulantes em São José do Rio Preto

A variabilidade genética do hRSV foi determinada pelo sequenciamento de um fragmento de 270 e 330bp do gene da proteína G (região hipervariável G2 – a partir da posição 651 para hRSVA e 653 para hRSVB respectivamente). Das 142 amostras positivas para hRSV (63 da creche e 79 do hospital), foram genotipadas 43% (61/142, sendo 29 da creche e 32 do hospital). Destas, 92% (56/61) foram agrupadas com seqüências referências para hRSVA e 8% (5/61) com seqüências referências para hRSVB (figura 6). Foi observado a existência de 2 agrupamentos distintos e distantes filogeneticamente, confirmando a separação dos 2 grupos antigênicos de hRSV (A e B, conforme figura 6).

Após a identificação dos genótipos, as seqüências foram reorganizadas em bancos de dados distintos. Dessa forma, foi criado um *data set* para linhagens de hRSVA e outro para linhagens de hRSVB. Foram incluídas seqüências de linhagens circulantes nas cidades de Ribeirão Preto e São Paulo no mesmo período analisado por este estudo (figuras 6, 7 e 8).

Por meio das análises filogenéticas, foram identificadas circulando em São José do Rio Preto linhagens GA1 (81%, 49/61), GA2 (8%, 5/61) e GA5 (3%, 2/61) (figuras 6 e 7), pertencentes ao grupo de hRSVA. Para a genotipagem de hRSVB, devido a dificuldade em se identificar os agrupamentos na filogenia obtida pelo método ML (figura 8), foi utilizada a filogenia obtida por NJ (figura 9) para confirmação dos agrupamentos previamente descritos na literatura. Dentre os isolados de hRSVB, foi observado a circulação dos genótipos GB3 (1,4%, 1/61) e GB3BA (6,6%, 4/61) (figuras 8 e 9).

Nas amostras obtidas de crianças de creche foram identificadas apenas linhagens de hRSV GA1. Nas amostras obtidas de crianças hospitalizadas, houve prevalência de infecções pelo genótipo GA1 e também se observou agrupamentos com linhagens circulantes de GA2, GA5, GB3 e GB3BA.

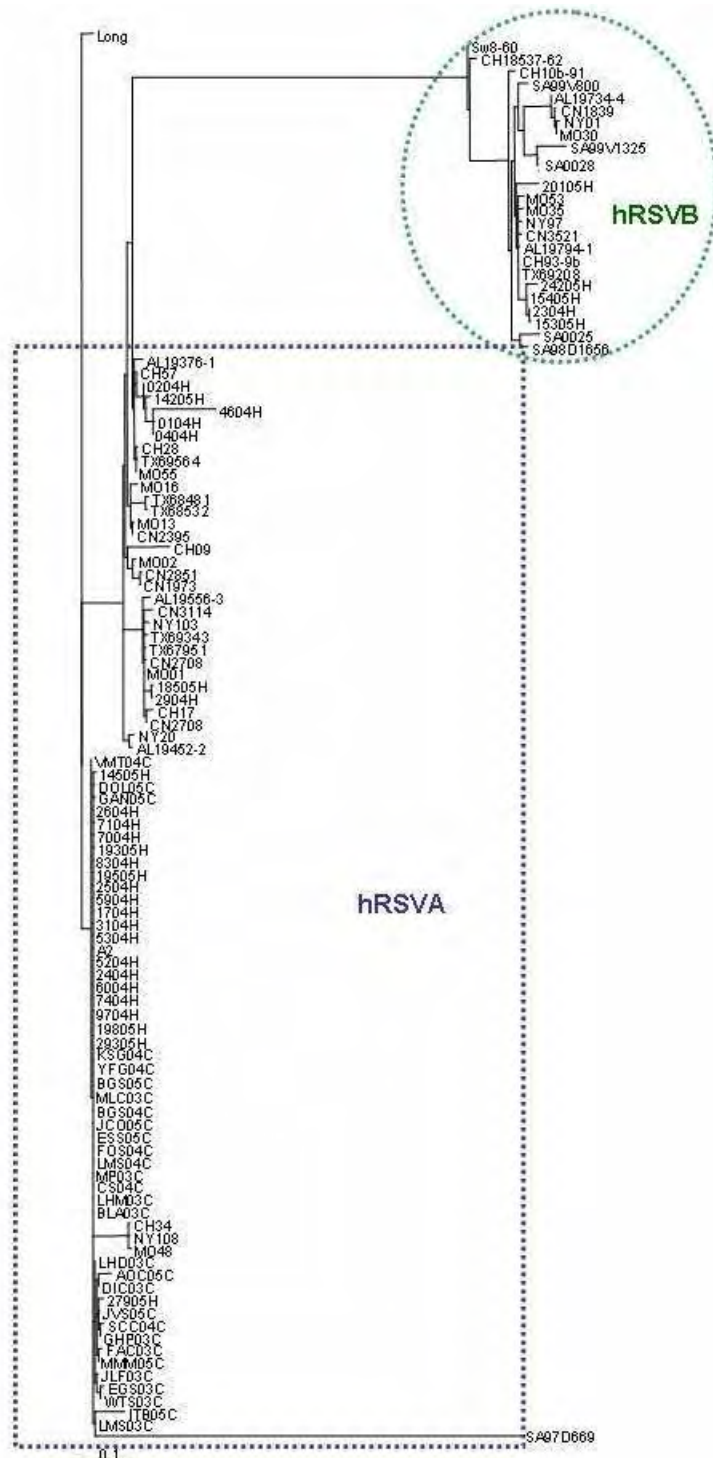


Figura 6: Árvore filogenética de hRSV isolados de crianças de São José do Rio Preto. O alinhamento das seqüências foi realizado usando o programa *Clustal W* e a árvore foi obtida pelo método ML com *PAUP**. Amostras provenientes de crianças hospitalizadas (Número do isolado + Ano de Isolamento + H; ex: 19805H – Isolado 198 do hospital no ano de 2005); Isolados provenientes de crianças da creche (Identificação do Isolado + Ano de Isolamento da Amostra + C; ex: BGS05C – Isolado BGS da creche no ano de 2005). As demais siglas correspondem a seqüências referências, conforme listadas nas tabelas 2 e 3. As diferentes cores representam os agrupamentos de hRSVA (azul) e hRSVB (verde). 0,1 representa a escala de distância entre os diferentes clados.

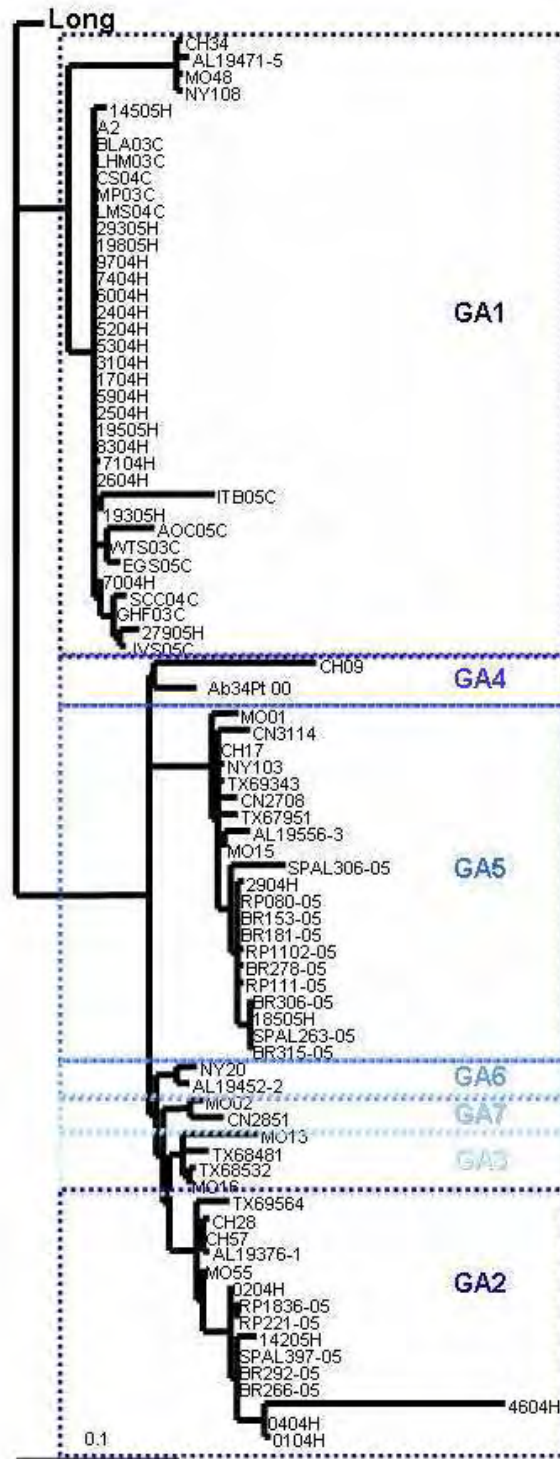


Figura 7: Árvore filogenética de hRSVA isolados de crianças de São José do Rio Preto. O alinhamento das seqüências foi realizado usando o programa *Clustal W* e a árvore foi obtida pelo método ML com *PAUP**. Amostras provenientes de crianças hospitalizadas (Número do isolado + Ano de Isolamento + H; ex: 19805H – Isolado 198 do hospital no ano de 2005); Isolados provenientes de crianças da creche (Identificação do Isolado + Ano de Isolamento da Amostra + C; ex: BGS05C – Isolado BGS da creche no ano de 2005). As diferentes cores representam os agrupamentos referentes aos respectivos genótipos comparados às seqüências referências, conforme listadas na tabela 2. 0,1 representa a escala de distância entre os diferentes clados.

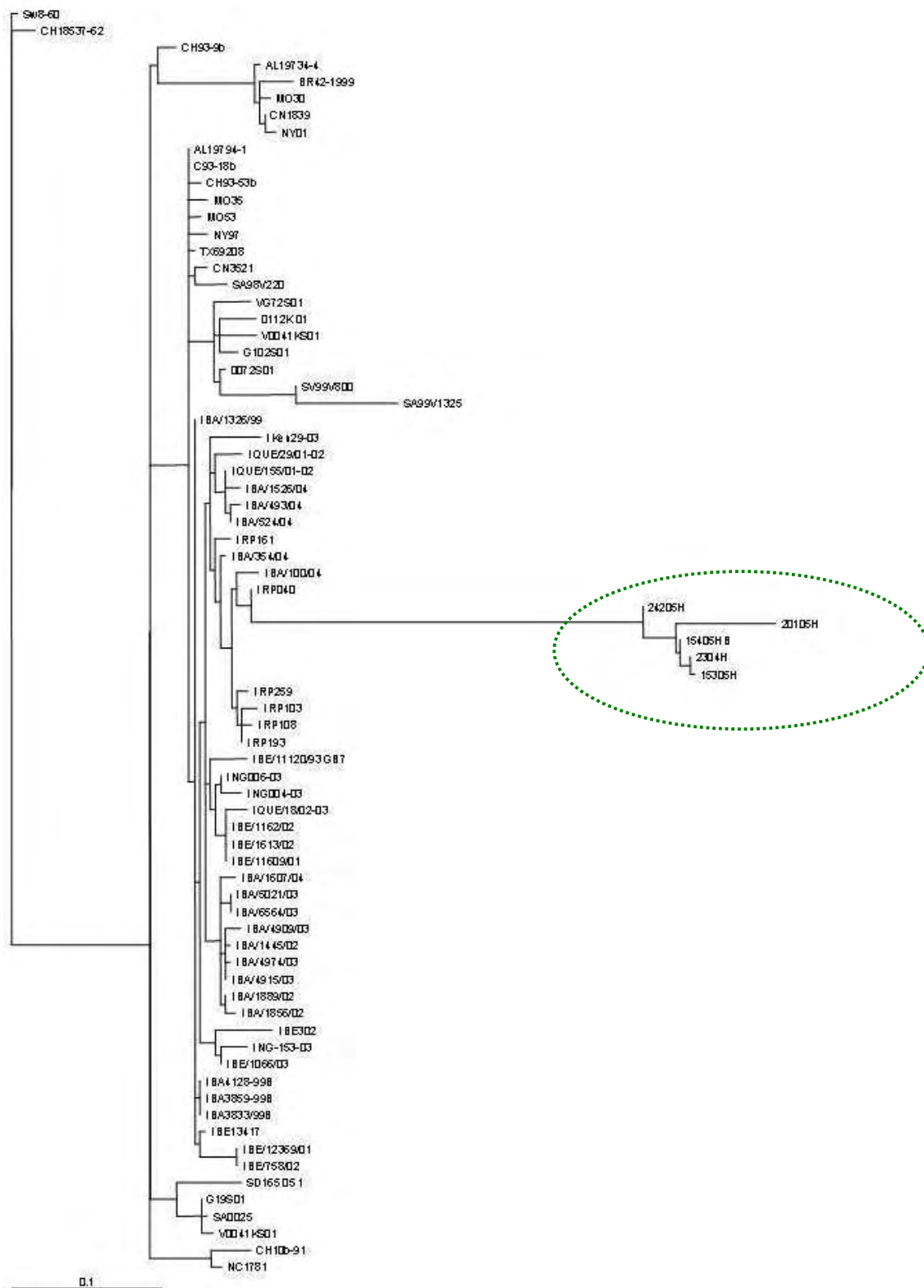


Figura 8: Árvore filogenética de hRSVB isolados de crianças de São José do Rio Preto. O alinhamento das seqüências foi realizado usando o programa *Clustal W* e a árvore foi obtida pelo método ML com *PAUP**. Amostras provenientes de crianças hospitalizadas (Número do isolado + Ano de Isolamento + H; ex: 15305H – Isolado 153 do hospital no ano de 2005); As diferentes cores representam os agrupamentos referentes aos respectivos genótipos comparados às seqüências referências, conforme listadas na tabela 3. 0,1 representa a escala de distância entre os diferentes clados.

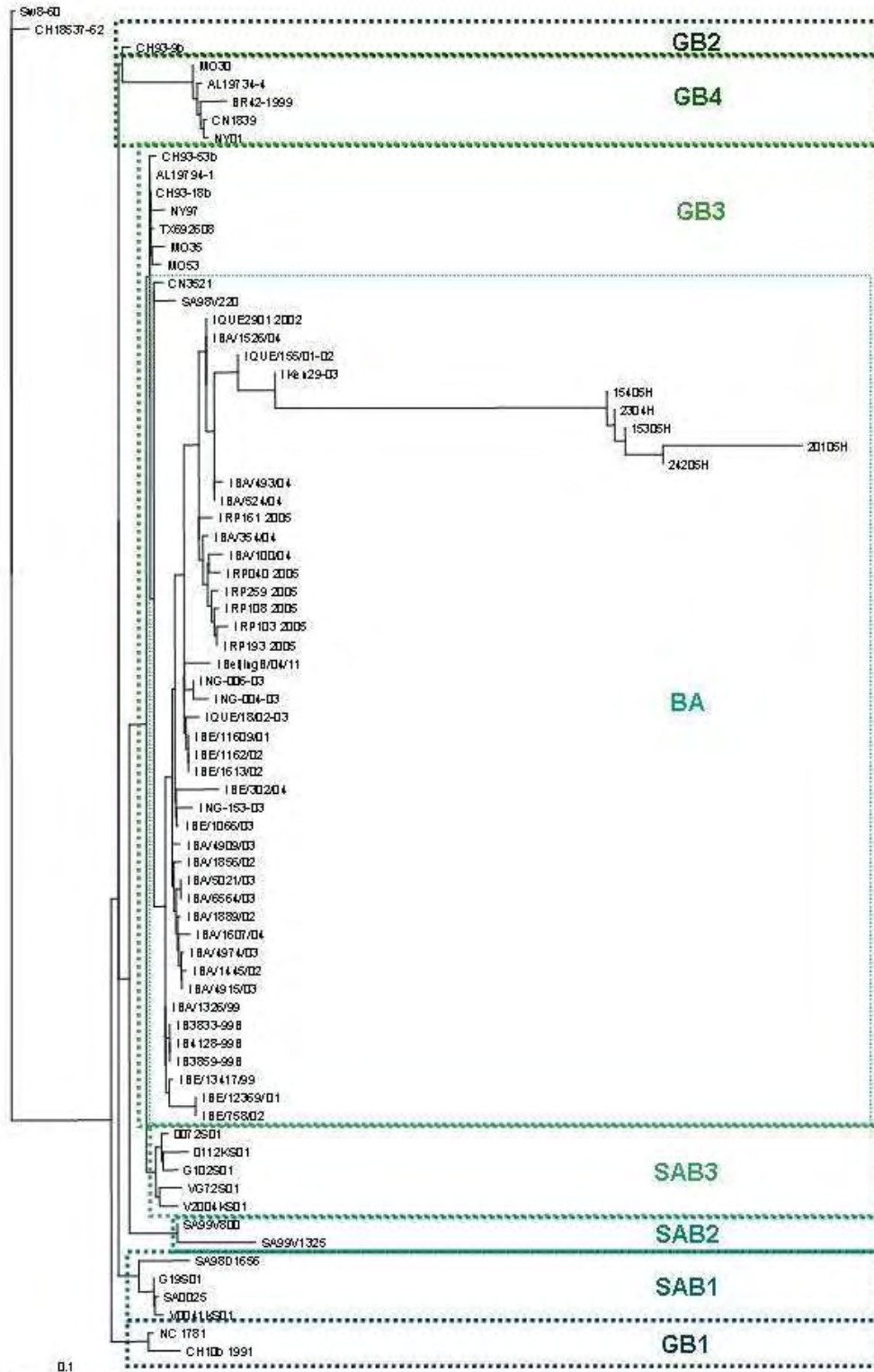


Figura 9: Árvore filogenética de hRSVB isolados de crianças de São José do Rio Preto. O alinhamento das seqüências foi realizado usando o programa *Clustal W* e a árvore foi obtida pelo método NJ com *PAUP**. Amostras provenientes de crianças hospitalizadas (Número do isolamento + Ano de Isolamento + H; ex: 15305H – Isolado 153 do hospital no ano de 2005); As diferentes cores representam os agrupamentos referentes aos respectivos genótipos comparados às seqüências referências, conforme listadas na tabela 3. 0,1 representa a escala de distância entre os diferentes clados.

Para se estabelecer uma relação mais informativa entre as estirpes de hRSV identificadas neste estudo, foi utilizado uma rede filogenética (*Network*) (figuras 10). A rede filogenética foi apresentada em maior aumento nas figuras 10B, 10C e 10D, para os agrupamentos de hRSVA GA1, hRSVA GA2 e GA5 e hRSVB GB3 e GB3BA, respectivamente.

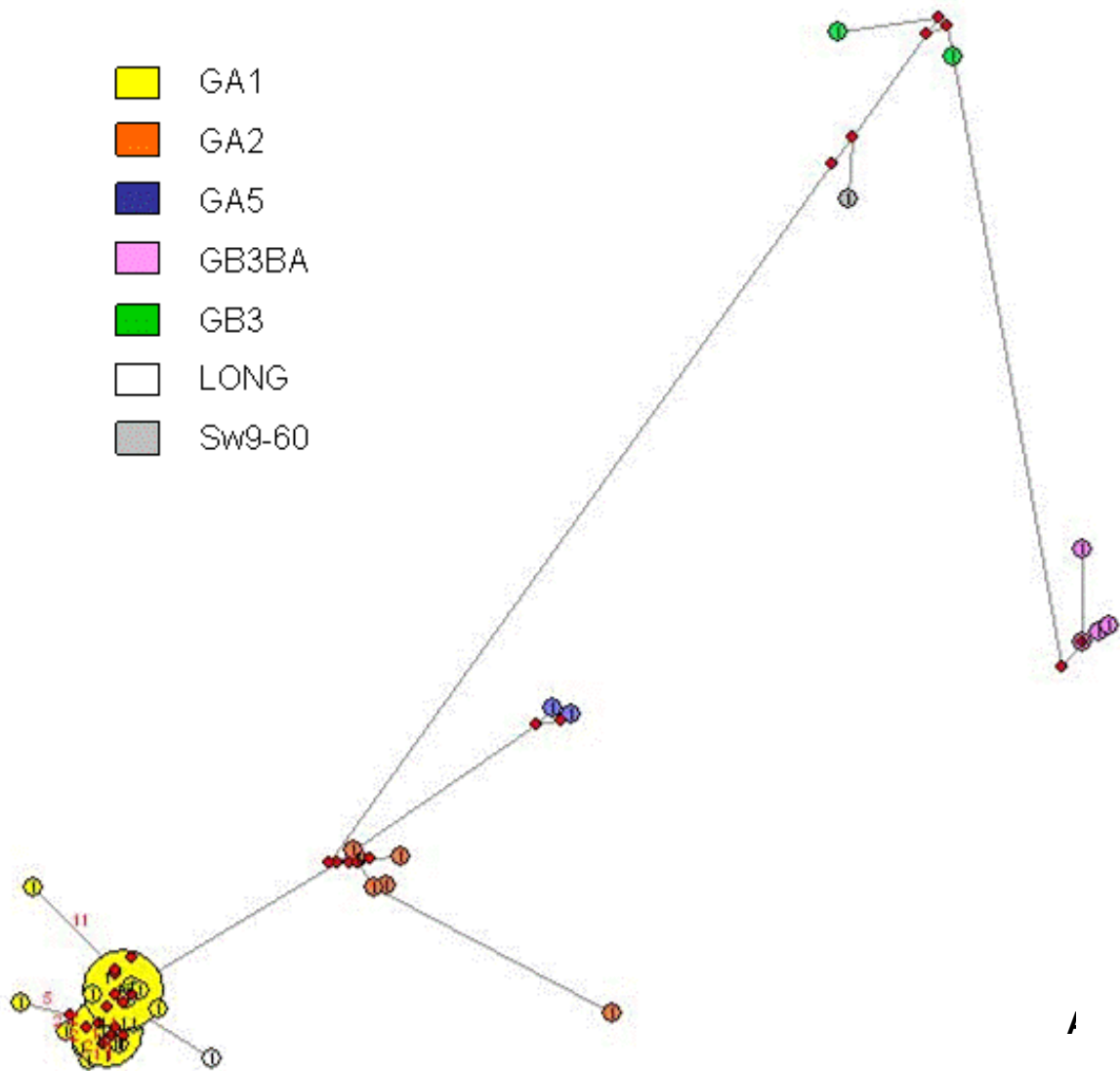
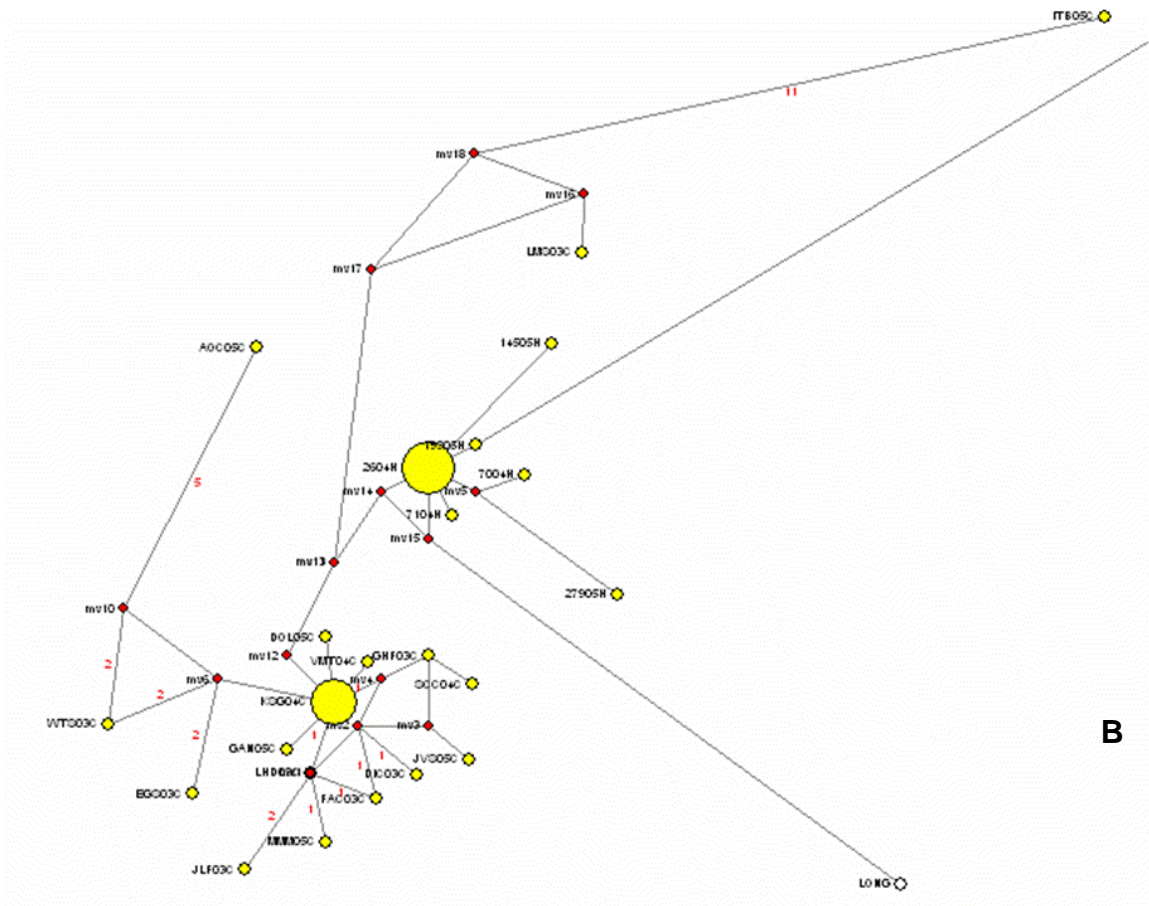
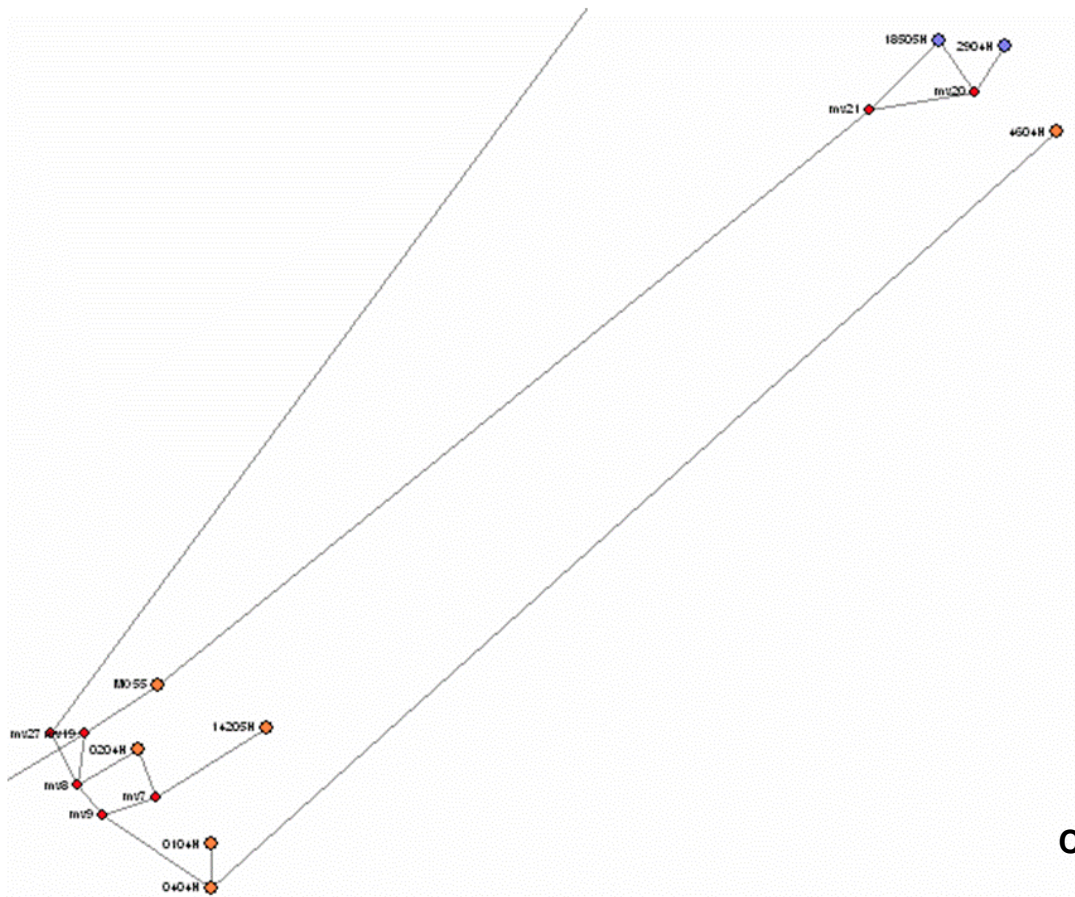


Figura 10: A – Rede filogenética de hRSV isolados de crianças de São José do Rio Preto. As diferentes cores representam os diferentes genótipos de hRSV identificados, conforme legenda. Cada círculo representa um haplótipo diferente, ou seja, uma seqüência específica da estirpe identificada. O número (em preto) no interior dos círculos representa a quantidade de indivíduos que possuem aquela determinada seqüência. Os nós em vermelho representam as possíveis seqüências ancestrais não amostradas que deram origem às seqüências isoladas. Os traços que formam a rede determinam a relação evolutiva entre os táxons e os números em vermelho sobre os mesmos representam a quantidade de mutações ocorridas entre um táxon e outro.



B



C

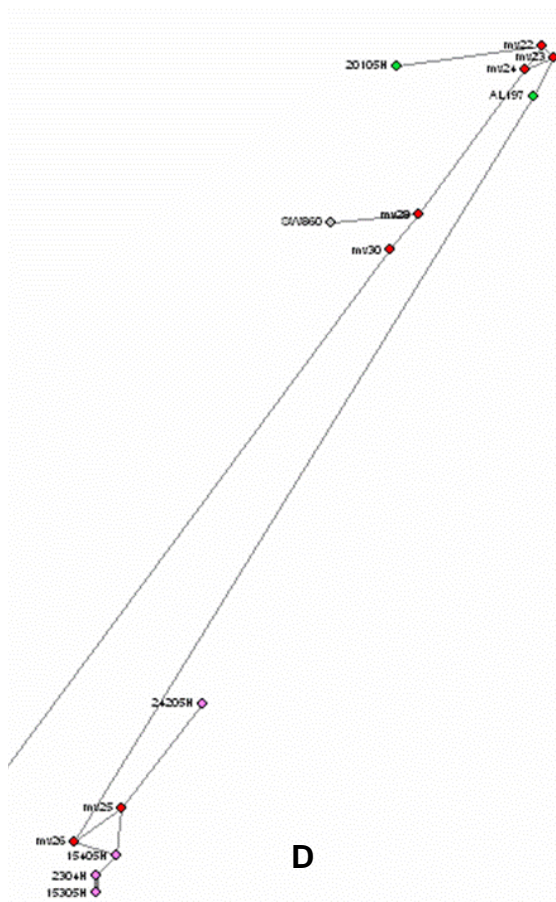


Figura 10: continuação –Rede filogenética de estirpes de hRSV GA1 (B); GA2 e GA5 (C); GB3 e GB3BA (D) identificadas em São José do Rio Preto, em maior aumento a partir da rede apresentada na figura 10 A.

Quando se analisa as distâncias genéticas e a diversidade nucleotídica entre os isolados de hRSV em São José do Rio Preto, pode-se evidenciar a estreita relação existente entre os isolados, uma vez que mesmo entre ou dentre as estirpes identificadas, os valores encontrados para as referidas características foram muito baixas, conforme apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Diversidade nucleotídica (π), Teste D de Tajima (D), distâncias genéticas (d) e significância estatística para o teste de Tajima (p) das estirpes de hRSV identificadas em São José do Rio Preto.

hRSV	π	D	d	p
A	0,03465	-2,14299	0,048	p<0,05
B	0,03878	-0,85185	0,040	p>0,10
GA1	0,00793	-2,51576	0,010	p<0,001
GA2 e GA5	0,08510	-0,49952	0,086	p>0,10

A análise do teste D de Tajima sugeriu a existência de uma seleção negativa fraca atuando sobre os isolados de hRSVA. Outra característica evidente entre os isolados foi a diversidade nucleotídica e a distância genética baixas (tabela 5).

Quanto à distribuição sazonal das linhagens de hRSV identificadas, pode-se observar que o genótipo GA1 foi prevalente nas epidemias dos anos de 2003, 2004 e 2005. No entanto, em 2004, houve co-circulação de GA1 com os genótipos hRSV GA2 (identificados em maio e setembro), GA5 e GB3 (detectados no mês de julho). Em 2005, a co-circulação das linhagens de hRSV identificadas foi mantida, porém houve um pequeno aumento na detecção do genótipo GB3 (meses de março, abril e junho), conforme ilustrado na figura 11.

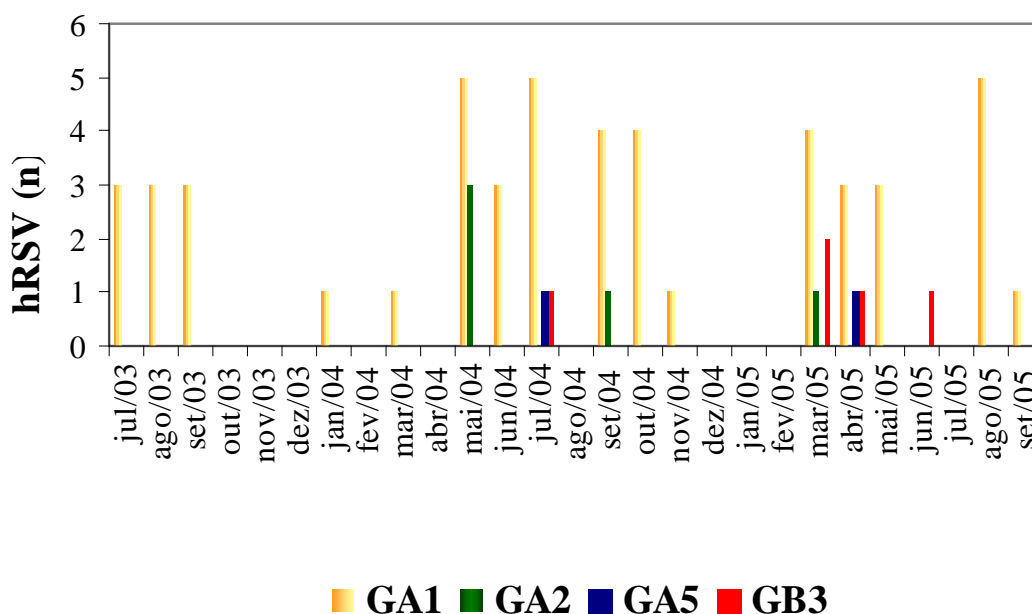


Figura 11: Distribuição sazonal dos genótipos de hRSV identificados em 61 amostras de secreção nasofaríngea obtidas de crianças com infecções respiratórias agudas de São José do Rio Preto.

Em relação aos sintomas clínicos apresentados pelas crianças, não houve agrupamento específico de sintomas com os genótipos de hRSV identificados. No entanto, quando se analisa a presença de linhagens filogeneticamente mais recentes, as infecções são mais comuns em crianças com idade inferior a 2 anos (100% das infecções pelas linhagens

GA2, GA5 e GB3). Chiado esteve presente em todas as infecções por GA5 e GB3, conforme evidenciado na tabela 6.

Quando se compara os dois grupos envolvidos neste estudo, pode-se associar aos pacientes hospitalizados sintomas relacionados a quadro clínicos mais severos, como chiado, falta de ar, febre, retrações e sibilos ($p < 0.001$). Observou-se ainda uma associação com relação à idade das crianças ($p < 0.001$), detectando-se infecções por hRSV em crianças mais velhas (média 34.45 e desvio padrão 19.19) na creche em relação ao hospital (média 12.56 e desvio padrão 12.66).

Tabela 6: Relação dos genótipos de hRSV identificados em amostras de secreção nasofaringe com o sexo, idade, motivo diagnóstico para internação (descrição disponibilizada apenas para as crianças hospitalizadas) e sintomas apresentados por crianças que freqüentavam a creche municipal “Maria Inês Arnal” no período de julho de 2003 a setembro de 2005 e que tiveram internadas no Hospital de Base no período de maio de 2004 a setembro de 2005 em São José do Rio Preto-SP.

Variáveis		Genótipos de hRSV				
		Creche		Hospital		
		GA1 % (n=29)	GA1 % (n=20)	GA2 % (n=5)	GA5 % (n=2)	GB3 % (n=5)
Sexo	Masculino	65,5 (19)	45 (9)	80 (4)	50 (1)	40 (2)
	Feminino	34,5 (10)	55 (11)	20 (1)	50 (1)	60 (3)
Idade (meses)	0 a 24	31 (9)	75 (15)	100 (5)	100 (2)	100 (5)
	25 a 48	48,3 (14)	25 (5)	-	-	-
	Acima de 49	20,7 (6)	-	-	-	-
Motivo Diagnóstico para internação	Pneumonia (PNM)	-	60 (12)	60 (3)	-	40 (2)
	Broncoespasmo (BCE)	-	-	20 (1)	50 (1)	20 (1)
	Bronquiolite (BLT)	-	40 (8)	40 (2)	50 (1)	80 (4)
	Derrame Pleural (DPL)	-	10 (2)	-	-	-
	PNM + BLT	-	-	-	-	20 (1)
	PNM + BCE	-	-	20 (1)	-	20 (1)
	PNM + DPL	-	10 (2)	-	-	-
Sintomas	Tosse	51,7 (15)	95 (19)	100 (5)	100 (2)	80 (4)
	Febre	7 (2)	95 (19)	80 (4)	50 (1)	100 (5)
	Falta de Ar	-	60 (12)	80 (4)	100 (2)	60 (3)
	Chiado	7 (2)	55 (11)	80 (4)	100 (2)	100 (5)
	Coriza	96,6 (28)	45 (9)	60 (3)	-	60 (3)
	Sibilos	-	55 (11)	60 (3)	50 (1)	60 (3)
	Obstrução Nasal	38 (11)	30 (6)	40 (2)	50 (1)	60 (3)

5. Discussão

As infecções respiratórias agudas (IRA) ainda representam o principal problema de saúde pública no mundo. São responsáveis por 75% de todas as morbidades agudas nos países desenvolvidos e aproximadamente 80% destas infecções são causadas por agentes virais. Infecções do trato respiratório superior (ITRS) estão entre as causas mais comuns das infecções em crianças, com ocorrência variando de 3 a 8 vezes ao ano, sendo que o grau de incidência varia inversamente com a idade. No entanto, as ITRSs podem levar a manifestações asmáticas, otite média aguda e infecções do trato respiratório inferior (ITRI), causando bronquite, bronquiolite e pneumonia (MAHONY, 2008).

Embora as infecções respiratórias virais sejam muito estudadas nos países desenvolvidos e seu impacto sobre a assistência médica seja bem entendido, há uma lacuna sobre o impacto destas infecções nos países em desenvolvimento. Do ponto de vista do problema de saúde pública, seria muito importante conhecer quais vírus são os agentes causadores mais comuns nas infecções, quais as manifestações clínicas por eles provocadas, qual a frequência do vírus causador de infecções respiratórias severas, qual a relação entre infecções bacterianas e virais e como as infecções severas do trato respiratório inferior poderiam ser prevenidas (PELTOLA e RUUSKANEN, 2008).

As ITRIs tem sido relacionada como a principal causa de hospitalização e morte de crianças nos países desenvolvidos. Na prática clínica, muitas vezes não há identificação do vírus específico causador das infecções devido escassez de testes sensíveis e/ou a presença de patógenos ainda não conhecidos. No entanto, testes moleculares têm aumentado expressivamente a habilidade dos laboratórios no diagnóstico das infecções virais do trato respiratório (MAHONY, 2008). Nos países em desenvolvimento, os testes laboratoriais para identificação dos vírus causadores destas infecções não são disponíveis na prática clínica.

Quanto às infecções respiratórias causadas por agentes virais, são identificados mais de 200 vírus diferentes, distribuídos em seis famílias, envolvidos na patologia das infecções

do trato respiratório (EIROS et al., 2009). No entanto, o vírus sincicial respiratório humano (hRSV) tem sido identificado como o principal agente viral causador de IRAs na infância (WHO, 2009) e apresenta surtos anuais em crianças com idade pré-escolar (CALEGARI et. al., 2005).

Com o objetivo de identificar a presença de hRSV em crianças de São José do Rio Preto-SP e tentar estabelecer a relação epidemiológica viral com o quadro clínico, este estudo foi realizado com dois grupos clinicamente distintos, um composto por crianças de creche e outro composto de crianças hospitalizadas.

Nos estudos utilizando-se populações de creche têm-se evidenciado que tais crianças apresentam risco mais elevado de infecções respiratórias em relação àquelas crianças domiciliadas (LU et. al., 2004). A exposição a repetidas infecções respiratórias na infância, período em que os pulmões são imaturos, tem sido relacionada a uma maior suscetibilidade a problemas respiratórios tardios, como asma e bronquite. Coletivamente, estas informações sugerem que há uma interação intensiva entre o desenvolvimento inicial dos pulmões e do sistema imunológico e infecções respiratórias virais (GERN et al., 2005).

Embora se conheça a importância da vigilância epidemiológica em crianças de creche, os dados relativos a incidência de infecções virais neste tipo de população ainda são escassos mesmo nos países desenvolvidos. No Brasil, tais estudos já foram realizados anteriormente por Arruda e colaboradores numa creche em Salvador-BA em 2003. No entanto, não há novas informações desde então sobre o impacto destas infecções sobre populações de creche, sendo a maioria dos dados epidemiológicos provenientes principalmente de estudos realizados nos hospitais universitários brasileiros.

Neste estudo, das 231 crianças que freqüentaram a creche durante o período de julho de 2003 a setembro de 2005, 179 tiveram registros de infecções respiratórias das quais 817 amostras foram colhidas. Destas, 7,7% (63) foram positivas para hRSV, sendo identificado outros 7 agentes virais causadores destas infecções (dados não mostrados). Estes resultados

mostraram que as infecções respiratórias de etiologia viral representaram um importante problema de saúde nesta população.

Embora o hRSV esteja associado a doença mais severa, também tem sido identificado como um agente viral comum nas ITRSs, com prevalência de sintomas leves, geralmente caracterizadas por coriza, tosse, febre e obstrução nasal (CALEGARI et. al., 2005).

No grupo composto por crianças hospitalizadas, das 272 amostras colhidas, hRSV foi o principal agente viral detectado, sendo responsável por 29% (79) das infecções. Thomazelli e colaboradores (2007), realizando estudos em crianças internadas no Hospital Universitário da USP de São Paulo indicaram o hRSV e hMPV como os mais importantes agentes causadores de IRAs na infância. Estes dados demonstram a importância da vigilância epidemiológica do hRSV nas IRAs.

Os principais motivos diagnósticos identificados no momento da internação foram pneumonia e bronquiolite, manifestações clínicas severas típicas de doenças respiratórias do trato inferior causadas por hRSV. Dessa forma, observou-se uma maior frequência de sintomas relacionados a um quadro clínico mais severo, como falta de ar, chiado e sibilos. O hRSV é a causa mais comum de pneumonia viral em crianças com idade inferior a 5 anos (FALSEY et. al., 2006) e o principal agente causador da bronquiolite em infecções severas do trato respiratório inferior (WHO, 2009).

Quando se compara o percentual de positividade entre os grupos deste estudo, observa-se uma positividade mais elevada nas crianças hospitalizadas. Isso mostra que existe uma maior prevalência das IRTIs por hRSV em crianças, proporcionando um quadro clínico de maior gravidade como bronquiolite (PARANHOS-BACCALÀ et al., 2008) e pneumonia.

A relação da presença de hRSV com a idade das crianças mostrou que a maioria das infecções ocorreu em crianças menores que 4 anos (48 meses) de idade (82.5% - 52/63 na creche; e 82.2% - 65/79 no hospital). Isso demonstra que o hRSV tem importância na

epidemiologia das IRAs em São José do Rio Preto, condizentes aos relatos deste vírus como principal agente causador de tais infecções em crianças com idade inferior a 5 anos (WHO, 2009).

Quanto ao padrão de circulação do vírus sincicial respiratório, sabe-se que a sazonalidade é sua principal característica, verificando a ocorrência de surtos epidêmicos anuais em intervalos regulares (PECCHINI et al., 2008). No período de julho de 2003 a abril de 2004, com registros de infecções respiratórias apenas nas crianças da creche, a detecção de hRSV ocorreu nos meses de julho, agosto, setembro, outubro e em apenas uma amostra no mês de março.

A partir de maio de 2004, embora a ocorrência de hRSV tenha sido baixa nas crianças da creche, o vírus foi identificado em maior número nos meses de maio, junho, julho e outubro. Em 2005, um maior número de ocorrências de infecções foi identificado, com picos em maio, agosto e setembro. Essa variação na taxa de identificação do vírus em anos consecutivos pode estar relacionada a características das linhagens de hRSV circulantes e às características imunológicas da população.

Nas amostras provenientes de crianças do hospital, embora tenha ocorrido detecção de hRSV em todos os meses amostrados em 2004, foram registrados picos de infecção de julho a novembro. Em 2005, um menor número de infecções por hRSV foi registrado, com picos de incidência nos meses de março e abril.

Neste estudo, a circulação de hRSV mostrou um padrão alternado de incidência dentro dos grupos durante os anos de estudo, padrão este que também foi observado em estudos realizados por Calegari et. al. (2005). Nas crianças da creche, um maior número de infecções foi registrado nos anos de 2003 e 2005 em comparação com o ano de 2004. Nas crianças hospitalizadas, houve maior número de detecções em 2004 quando comparado com o ano de 2005.

A ocorrência do hRSV tem-se demonstrado não uniforme entre as diferentes regiões geográficas brasileiras. Isso sugere que as infecções por hRSV apresentam características regionais, certamente influenciadas por variáveis específicas de cada comunidade.

Quanto à variabilidade genética do hRSV, as análises filogenéticas mostraram a circulação de linhagens GA1 (81%, 49/61), GA2 (8%, 5/61), GA5 (3%, 2/61), pertencentes ao grupo de hRSVA e de isolados GB3 (1,4%, 1/61) e GB3BA (6,6%,4/61), do grupo de hRSVB. Nas amostras obtidas de crianças de creche foram identificadas apenas linhagens de hRSV GA1. Nas amostras obtidas de crianças hospitalizadas, houve prevalência de infecções pelo genótipo GA1 e também se observou agrupamentos com linhagens circulantes de GA2, GA5, GB3 e GB3BA.

Os isolados identificados como GA1 foram próximos filogeneticamente a linhagem A2 isolada em Melbourne (M11468) – Austrália, no ano de 1962. Estudos prévios têm reportado o desaparecimento de linhagens em Birmingham e no Vietnã, depois de ter sido o genótipo predominante nos surtos epidêmicos de 1988-89. Isolados desta linhagem viral também foram identificados na Bélgica nas estações de 1989-90, implicando numa rápida disseminação e circulação predominante na Europa durante o período de 1989-90. Um recente estudo na Argentina também identificou isolados de GA1 em 1996 (ZLATEVA et al., 2004). Desde então, não se detectou a circulação desta linhagem nas diferentes comunidades estudadas.

Sabe-se que surtos de infecções severas contribuem para a geração da diversidade viral. Por outro lado, a estabilidade genética do vírus pode ser influenciada por fatores sociais, como por exemplo, limitações de deslocamento. Um estudo de Valdes e colaboradores (1998) mostrou uma estabilidade de linhagens circulantes na ilha de Cuba, identificando-se isolados muito similares a linhagem protótipo *Long* (isolado em 1956 – USA).

Uma vez que a população de creche envolvida neste estudo é de baixa renda, e assim apresenta as restrições sociais apontadas por Valdes e colaboradores (1998), esta seria uma

possível explicação para a atuação da seleção purificadora forte sobre a linhagem identificada neste grupo do estudo. No entanto, é difícil prever as razões para as propriedades singulares destes isolados.

Os isolados GA1 também prevaleceram em crianças hospitalizadas, evidenciando a circulação efetiva desta linhagem na população de São José do Rio Preto. Estes resultados indicam que a epidemiologia do hRSVA é comumente determinada por fatores locais, bem como resistência imunológica na comunidade a certos genótipos circulantes (ZLATEVA et al., 2004).

Pacientes com imunidade alterada podem disseminar hRSV por semanas e meses depois da infecção inicial. No entanto, é desconhecido se o genoma do hRSV evolui em indivíduos com infecções prolongadas (LAZAR et al., 2006).

Sato e colaboradores (2005) evidenciaram em seu estudo com crianças de uma mesma comunidade no Japão em três estações epidêmicas consecutivas que os pacientes infectados previamente pelos 2 grupos antigênicos de hRSV foram re-infectados com o mesmo grupo e ainda com o mesmo genótipo durante a primeira e segunda infecções. A relativa contribuição da diversidade antigênica e/ou resposta imunológica inadequada permitindo o estabelecimento de re-infecções ainda precisam ser elucidadas (PARVEEN et al., 2006).

Em relação a filogenia obtida para os isolados de hRSVA, pode-se notar que as amostras identificadas como GA1 apresentaram-se formando uma politomia, sem definição de ramos (figura 7). No entanto, a rede filogenética (*Network*) (figuras 10) construída permitiu um estabelecimento mais detalhado das relações entre os isolados de hRSV deste estudo.

Para os isolados de maior incidência e de menor diversidade genética (hRSVA GA1), a rede (figura 10B) mostra que há um relacionamento estreito entre as estirpes virais isoladas (politomias na árvore filogenética – figura 7), também relacionadas por intermédio de

um ancestral hipotético não amostrado (em vermelho – mv15 – figura 10B) com o primeiro isolado de hRSV, a estirpe Long/USA/56.

Os isolados do grupo GA5 não se apresentaram intimamente relacionados, uma vez que se evidencia a presença de nós ancestrais hipotéticos (mv20 e mv21, em vermelho), caracterizando dados não amostrados (figura 10 C). Nas estirpes de hRSVA GA2 observa-se que os isolados 0104H, 0404H e 4604H são mais intimamente relacionados entre si, evidenciando-se uma possível rota de transmissão ou introdução recente desta estirpe na cidade de São José do Rio Preto; para os outros 2 isolados deste grupo, notam-se características semelhantes às evidenciadas entre os isolados do grupo GA5.

As estirpes GB3BA mostraram-se fortemente relacionadas, podendo-se inferir sua introdução recente na cidade de São José do Rio Preto; os isolados 2304H, 15305H e 15405H mostraram-se mais intimamente relacionadas entre si e menos relacionada ao isolado 24205H devido a existência de um nó ancestral (mv25, em vermelho) não amostrado (figura 10 D). O isolado GB3 20105H não apresentou a duplicação e de acordo com a rede filogenética amostrada pode-se notar que esta estirpe não se encontra intimamente relacionada aos demais isolados do grupo B (aqueles que contem a duplicação de 60nt – GB3BA).

A análise do teste D de Tajima sugeriu a existência de uma seleção negativa fraca atuando sobre os isolados de hRSVA (-2,14299; $p < 0,05$). Contudo, quando o teste foi realizado apenas com as estirpes de hRSVA GA1, a evidência de ocorrência de seleção negativa tornou-se mais forte (-2,51576; $p < 0,001$), sugerindo a existência de algum fator, seja ele viral ou do hospedeiro, responsável pela conservação desta estirpe na população de crianças de São José do Rio Preto. Outra característica evidente entre os isolados de GA1 foi a baixa diversidade nucleotídica (0,000793) e a distância genética foi 4 vezes inferior a dos isolados de hRSVB e cerca de 8 vezes inferior a dos demais isolados de hRSVA (GA2 e GA5). O mesmo não foi observado para os isolados de hRSV B, uma vez que os testes

estatísticos realizados não foram significativos para evidência da atuação de algum tipo de seleção.

Estas diferenças evidenciam que a região hipervariável G2 da proteína G apresentam taxas evolutivas distintas entre os grupos antigênicos de hRSV, confirmando a distância filogenética existente entre os grupos A e B.

Quanto à distribuição sazonal do genótipo GA1, este circulou durante as epidemias de 2003, 2004 e 2005. No entanto, em 2004, pode-se observar a co-circulação de isolados GA1 com GA2, GA5 e BA – GB3.

A observação de Scott e colaboradores (2004), estudando a epidemiologia molecular do hRSV no distrito de Kilifi, Kenia, em crianças menores de 6 anos de idade com IRAs no trato inferior entre 1999 e 2001, mostrou a rápida disseminação viral ou possível convergência evolutiva dos diferentes genótipos de hRSV. Os resultados de Scott apontaram que variantes similares de um mesmo agrupamento na árvore tendem a recorrência ao longo dos anos e se correlacionam a um baixo nível de clusterização geográfica.

Os isolados GA2 e GA5 obtidos por este estudo foram mais distante filogeneticamente dos isolados dos Estados Unidos e mais proximamente relacionados aos isolados de Ribeirão Preto, São Paulo e outras regiões brasileiras durante as epidemias de 2005. Isso contrapõe, em parte, os resultados observados por Scott e colaboradores (2004). Em ambos os *clusters* podem-se evidenciar que as linhagens de hRSV isoladas em São José do Rio Preto apresentaram um padrão de agrupamento temporal e geográfico enquanto participantes da evolução genética do vírus num contexto global.

Para os isolados de hRSV GA2, foi evidenciado que 1 amostra (0204H) foi proximamente relacionada aos isolados em Ribeirão Preto, outra amostra (14205H) mais relacionada a linhagens circulantes em São Paulo e em outras regiões brasileiras, e outras 3 amostras (0104H, 0404H e 4604H) formaram um agrupamento específico. Estas pequenas

variações quanto a distâncias dos genótipos identificados se deve principalmente a pressões de seleção distintas exercidas pelas diferentes comunidades analisadas.

Os genótipos GA2 e GA5 foram isolados em diferentes comunidades do mundo todo desde o início da década de 90. Estes genótipos foram predominantes na Suécia e co-circularam em 10 das 19 epidemias entre 1983-84 e 2000-01 (RAFIEFARD et al., 2004). Estudos no Japão (SATO et al., 2005) e na Índia (PARVEEN et al., 2006) reportaram o genótipo GA5 como predominante em três surtos epidêmicos consecutivos, sendo ainda o mais representativo na Nova Zelândia (ZLATEVA et al., 2007) nos últimos anos. Uma ocorrência similar foi descrita em isolados da Argentina (FRABASILE et al., 2003) e Uruguai (GALIANO et al., 2005).

Silva e colaboradores (2008), realizando estudos na Região Metropolitana de Campinas-SP, também encontraram prevalência dos genótipos GA2 e GA5 em crianças hospitalizadas menores que 1 ano de idade. Tal estudo aponta uma alta similaridade das linhagens isoladas em Campinas com linhagens isoladas em Salvador-BA em 1999, no Kenia e na Argentina em 2003 e a recente introdução desta linhagem naquela região, dado que provocou infecções severas em crianças.

A identificação por diferentes estudos dos genótipos GA2 e GA5 como prevalentes e co-circulantes nas epidemias de diferentes comunidades mundiais evidencia a rápida disseminação do hRSV.

Com relação aos isolados GB3BA, tem-se notado desde 1999 um evento genético raro na evolução de hRSVB. Tem se postulado que há uma estabilidade relativa da estrutura secundária do RNA viral, formada transitoriamente durante o processo de replicação, evento este que favoreceria a geração de segmentos duplicados do gene da proteína G do hRSV. Embora isso pudesse ocorrer mais que uma vez durante a evolução do hRSV (TRENTO et al., 2006), seria um evento raro.

O estudo de Trento e colaboradores (2006) mostrou que todas das seqüências isoladas entre 1999 e 2006 em Buenos Aires apresentaram uma duplicação de 60 nucleotídeos, proporcionando uma forte evidência da presença de um ancestral comum para estes isolados BA. Dessa forma, estes resultados ainda oferecem inestimáveis informações para que se re-avaliem os fatores epidemiológicos do hRSV. Desde que o padrão de evolução das seqüências de hRSV com segmento duplicado não foi diferente dos padrões observados para a evolução dos demais genótipos dos grupos de hRSVA e B, este evento de duplicação fornece um exemplo excepcional da história natural da evolução do hRSVB na Argentina.

No entanto, há fortes evidências de que este evento de duplicação é recente, uma vez que as filogenias moleculares do gene da proteína G do hRSV ainda os agrupam com o genótipo GB3. Dessa forma, não houve tempo necessário para que esta linhagem acumulasse diferenças suficientes para agrupá-la separadamente e assim chamar estes isolados de um novo subgrupo de hRSVB.

Os isolados GB3BA foram identificados em diferentes localidades geográficas no mesmo surto epidêmico ou ainda em epidemias consecutivas. Houve a circulação de BA nas epidemias de 1999-2004 na Argentina (TRENTO et al., 2006), em 2004 nas cidades de Campinas (SILVA et al., 2008) e São Paulo (dados não publicados), em 2001-03 no Quebec (CAN), na Bélgica (1999-2003), em Nigata (JAP – 2000-03), na Índia e no Kênia (2003). A vantagem seletiva dos isolados BA sobre os demais genótipos de hRSV ainda é desconhecida, mas a condição *naive* (sem contato prévio com o antígeno) da população humana com respeito a estes novos vírus pode ter contribuído para sua rápida disseminação mundial (TRENTO et al., 2006).

No entanto, a rota seguida pelos isolados BA para os diferentes lugares do mundo é desconhecida, mas pode ser explicada por efeitos *bottlenecks*, com um grande impacto na evolução do hRSV. Isso possivelmente contribuiu para a disseminação exclusiva de determinados ramos em áreas localmente restritas (TRENTO et al., 2006).

Os isolados GB3 obtidos em São José do Rio Preto formaram um agrupamento único e distante filogeneticamente dos demais membros do *cluster*. Dentre estes isolados, 4 deles apresentaram esta duplicação de 60 nucleotídeos. Isso evidencia que esta linhagem viral primeiramente isolada em Buenos Aires também circula na cidade e estão sujeitos a pressões seletivas específicas desta comunidade.

A alta taxa de mutação observada para vírus de RNA em geral provavelmente contribuiu para a variação genética observada dentro das seqüências dos isolados BA. Entretanto, há fortes evidências que o acúmulo rápido de mudanças ao longo do tempo pode ser um indicativo de forças seletivas agindo para acelerar a deriva genética (TRENTO et al., 2006). Tem-se mencionado que seleção imunológica positiva em determinados sítios do ectodomínio da proteína G do hRSV tem direcionado a evolução do vírus (MELERO et al., 1997), o que não foi evidenciado neste estudo.

Quando se correlaciona os diferentes genótipos identificados com as características clínicas e sociais da população de estudo, tem-se observado que 100% das infecções por linhagens de GA2, GA5 e BA – GB3 ocorreram em crianças menores de 2 anos de idade. Isso se deve possivelmente a ausência ou ineficiência da memória imunológica do hospedeiro em relação a estes genótipos de hRSV e a possível introdução recente destas linhagens em São José do Rio Preto. No entanto, em crianças maiores que 2 anos de idade, a prevalência do genótipo GA1 pode ser explicada pelo fato das mesmas já terem sido expostas a infecções prévias pelos genótipos GA2, GA5, GB3 e GB3BA em anos anteriores, uma vez que tais linhagens tem sido relatadas circular nas últimas duas décadas no mundo todo.

A relação dos sintomas clínicos com os genótipos de hRSV tem apresentado resultados contraditórios em estudos prévios. Em alguns casos, infecções por hRSVA tem sido associado a quadro clínico mais severo, enquanto em outros, infecções do tipo B provocam doença mais grave (MENTEL et al., 2005). Não houve agrupamento específico de

sintomas clínicos com os genótipos identificados. No entanto, alguns sintomas mais graves estiveram presentes em todas as infecções por GA5 e GB3.

Esta é mais uma evidência de que as características clínicas e epidemiológicas das infecções por hRSV são basicamente determinadas por fatores locais, da comunidade, que atuam com diferentes pressões seletivas sobre a evolução do vírus.

6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. As duas variantes antigênicas de hRSV (A e B) foram identificadas.
2. Houve prevalência de infecções por hRSVA GA1, tanto no grupo composto por crianças de creche quanto naquele composto por crianças hospitalizadas.
3. Detectou-se co-circulação de estirpes virais de hRSV GA1 com GA2, GA5, GB3 e GB3BA.
4. Análises evolutivas das estirpes virais identificadas mostraram uma seleção negativa fraca atuando sobre os isolados de hRSVA; no entanto, nas análises apenas para os isolados de hRSVA GA1, houve detecção de seleção negativa forte.
5. Não foi observado nenhum agrupamento específico dos sintomas nem de diagnóstico clínico com as estirpes identificadas.
6. As análises dos diagnósticos com a presença de hRSV mostraram prevalência de sintomas mais severos e de linhagens mais recentes nas infecções respiratórias agudas em crianças hospitalizadas menores que 2 anos de idade.

7. Referências Bibliográficas

ANDERSON, L. J., HEIRHOLZER, J. C., TSOU, C., HENDRY, R. M., FERNIE, B. N., STONE, Y. & MCINTOSH, K. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 626-33. 1985.

BANDELT, H. J. Median-joining networks for inferring intraespecific phylogenies. **Mol Biol Evol**, v.16, p. 37-48. 1999.

BOSSO, P.A.R. et al. Human respiratory syncytial virus detection in children admitted at a community hospital in botucatu, SP. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 348-351, 2004.

BOUKHVALOVA, M.S.; PRINCE, G.A.; BLANCO, J.C.G. Respiratory Syncytial Virus infects and abortively replicates in the lungs in spite of preexisting immunity. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 9443-9450, 2007.

BUENO, S.M. et al. Host Immunity During RSV Pathogenesis. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1320-29. 2008.

CALEGARI, T.; QUEROZ, D. A. O.; YOKOSAWA, J.; SILVEIRA, H. L.; COSTA, L. F.; OLIVEIRA, T. F. M.; LYSA, L. N.; OLIVEIRA, R. C.; DINIZ, F. C.; ROSSI, L. M. G.; CARVALHO, C. J.; LIMA, A. C.; MANTESE, O. Clinical-epidemiological evaluation of RSV infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. **Braz. J. Infect Dis**, [SI]. v. 9, n.2. 2005.

CAMPANINI, G. et al. Human respiratory syncytial virus (hRSV) RNA quantification in nasopharyngeal secretions identifies the hRSV etiologic role in acute respiratory tract infections of hospitalized infants. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 2, p. 119-124, 2007.

CAMPOS, A.C.A. et al. Comparison between ectodomain and G2 region of G glycoprotein for genotyping of HRSV. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 413-416, 2007.

CANE, P. A., MATRNEWS, D. A.; PRINGLE, C. R. Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2091-96. 1991.

CARDENAS, S.; AUAIS, A.; PIEDIMONTE, G. Palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus infection. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 3, p. 719-26. 2005.

CASTILOW EM, OLSON MR, MEYERHOLZ DK, VARGA SM. Differential role of gamma interferon in inhibiting pulmonary eosinophilia and exacerbating systemic disease in fusion protein-immunized mice undergoing challenge infection with respiratory syncytial virus. **J Virol**, v. 82, p. 2196-207. 2008.

CHANOCK, R. M., B. ROIZMAN, R. MYERS. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. I. Isolation, Properties and characterization. **Am. J. Hyg**, v. 66, pp.281-90. 1957.

CHIN, J.; MAGOFFIN, R.L.; SHEARER, L.A.; SCHIEBLE, J.H.; LENNETTE, E.H. Field evaluation of a respiratory syncytial virus vaccine and a trivalent parainfluenza virus vaccine in a pediatric population. **Am J Epidemiol**, v. 89, p. 449-63. 1969.

CINTRA, O. A. L.; OWA, M. A.; MACHADO, A. A.; CERVI, M. C.; FIGUEIREDO, L. T. M.; ROCHA, G. M.; SIQUEIRA, M. M.; ARRUDA, E. Occurrence and Severity of Infections Caused by Subgroup A and B Respiratory Syncytial Virus in Children in Southeast Brazil. **Journal of Medical Virology**, [SI], v. 65, p. 408-412. 2001.

COLLINS, C. L.; POLLARD, A. J. Respiratory Syncytial Virus In Children And Adults. **J Infect**, [SI], v. 45, n. 1, p. 10-17. 2002.

COLLINS, P. L.; CROWE, J.E.J. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, p. 1601–1646. 2007. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), **Fields virology**, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

COLLINS, P.L.; GRAHAM, B.S. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 82, n. 5, p. 2040-55. 2008.

COLLINS, P.L.; MURPHY, B.R. Respiratory syncytial virus: reverse genetics and vaccine strategies. **Virology**, v. 296, p. 204-11. 2002.

COWTON, V. M.; MCGIVERN, D.R.; FEARN, R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. **J. Gen. Virol.**, v. 87, p. 1805–21.

DE-VINCENZO, J.P. A new direction in understanding the pathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis: How real infants suffer. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 8, p. 1084-1086, 2007.

EDGAR, ROBERT C. (2004), MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* **32**(5), 1792-97.

EIROS, J.M. et al. Diagnóstico Microbiológico de las infecciones virales respiratorias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 3, p. 198-77. 2009.

Electropherogram Quality Analysis. Software disponível online para análise de produtos de sequenciamento. Disponível em <http://asparagin.cinargen.embrapa.br/phph/>.

ENNACIRI, J., AHMAD, R., MENEZES, J. Interaction of monocytic cells with respiratory syncytial virus results in activation of NF-kappaB and PKC-alpha/beta leading to up-regulation of IL-15 gene expression. **J Leukoc Biol.**, v. 81, n. 3, p. 625-31. 2007.

FAÇANHA, M.C.; PINHEIRO, A.C. Doenças respiratórias agudas em serviços de saúde entre 1996 e 2001, Fortaleza, CE. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 346-350, 2004.

FALSEY A.R, WALSH E.E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clin Microbiol Rev**, v.13, p. 371-84. 2000.

FALSEY, A.R., WALSH, E.E. Viral pneumonia in older adults. **Clin. Infect. Dis.** [SI], v. 15, p. 518-524. 2006.

FÉ, M.M.M. Perfil clínico-epidemiológico das infecções respiratórias agudas causadas por vírus Parainfluenza em crianças atendidas em um hospital de referência da cidade de Fortaleza. 2007. 125 f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2007.

FEARNS, R.; COLLINS, P.L. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. **J. Virol.** v. 73, p. 5852–64. 1999.

FISHER, R. A. (1922). "On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P". *Journal of the Royal Statistical Society* **85** (1): 87-94.

FRABASILE, S. et al. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. **J Med Virol.**, v. 71, n. 2, p. 305-12. 2003.

GALIANO, M.C. et al. Intragroup antigenic diversity of human respiratory syncytial virus (group A) isolated in Argentina and Chile. **J Med Virol.**, v. 77, n. 2, p. 311-6. 2005.

GARCÍA-SASTRE A, PALESE P. Genetic manipulation of negative-strand RNA virus genomes. **Annu Rev Microbiol.** v. 47, p. 765–90. 1993.

GERN, J. E.; ROSENTHAL, L.A.; SORKNESS, R.L.; LEMANSKE, F. Jr. Effects of viral respiratory infections on lung development and childhood asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 115, p. 668–74. 2005.

GONZALEZ-REYES, L.; RUIZ-ARGUELLO, M. B.; GARCIA-BARRENO, B.; CALDER, L.; LOPEZ, J.A.; ALBAR, J.P.; SKEHEL, J.J.; WILEY, D.C.; MELERO, J.A. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 9859–64. 2001.

GORMAN, J.J.; McKIMM-BRESCHKIN, J.L.; NORTON, R.S.; BARNHAM, K.J. Antiviral activity and structural characteristics of the nonglycosylated central subdomain of human respiratory syncytial virus attachment (G) glycoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n.42, p. 38988-94.

GOULD, P. S.; EASTON, A.J. Coupled translation of the second ORF of the M2 mRNA is sequence dependent and differs significantly in the subfamily *Pneumovirinae*. **J. Virol.** v. 81, p. 8488–96.

HARCOURT, J.; ALVAREZ, R.; JONES, L. P.; HENDERSON, C.; ANDERSON, L. J.; TRIPP, R. A. Respiratory syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1_ T cell responses. **J. Immunol.**, v. 176, p. 1600–08. 2006.

HENDERSON, J.; HILLIARD, T. N.; SHERRIFF, A.; STALKER, D.; SHAMMARI, N.A.; THOMAS, H. M. Study Team. Hospitalization for RSV bronchiolitis

before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: A longitudinal birth cohort study. **Pediatr. Allergy Immunol**, [SI], v. 16, p. 386-392. 2005.

ISON, M.G.; MILLS, J.; OPENSHAW, P.; ZAMBON, M.; OSTERHAUS, A.; HAYDEN, F. Current research on respiratory viral infections: Fourth International Symposium. **Antiviral Res**, v. 55, p. 227-78. 2002.

JOHNSON, P. R., SPRIGGS, M.K., OLMSTED, R.A. & COLLINS, P. L. The G glycoprotein of human respiratory syncytial virus of subgroup A and B: extensive sequence divergence between anti-genically related proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A. v. 84, p. 5625-29. 1987.

KARRON RA. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. **Vaccines 5th ed: Saunders- Elsevier**, p. 1283-93. 2008.

KESSON, A.M. Respiratory Virus Infections. **Pediatric Respiratory Reviews**. 2007.

KIM, Y.K.; CHOI, E. H.; LEE, H. J. Genetic Variability of the Fusion Protein and Circulation Patterns of Genotypes of the Respiratory Syncytial Virus. **Journal of Medical Virology**, [SI], v. 79, p. 820-8. 2007.

LANATA, C.F. et al. Methodological and quality issues in epidemiological studies of acute lower respiratory infections in children in developing countries. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 1362-1372, 2004.

LAZAR, I. et al. Novel Mutations in the Respiratory Syncytial Virus G Gene Identified in Viral Isolates from a Girl with Severe Combined Immune Deficiency Treated with Intravenous Immune Globulin. **Journal Clinical of Virology**, v.37, p.198-73. 2006.

LEE, J. T.; CHANG, L. Y.; WANG, L. C.; KAO, C. L.; SHAO, P. L.; LU, C. Y.; LEE, P. I.; CHEN, J. M.; LEE, C. Y.; HUANG, L. M. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in northern Taiwan, 2001-2005 — seasonality, clinical characteristics, and disease burden. **J Microbiol Immunol Infect.** [SI], v. 40, p. 293-301. 2007.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-52 | doi: 10.1093/bioinformatics/btp187. 2009.

LOURENÇÃO, L. G et al. Infecções pelo Vírus Sincicial Respiratório em crianças. **Pulmão RJ**, v. 14, n. 1, p. 59-68, 2005.

LU, N.; SAMUELS, M. E.; SHI, L.; BAKER, S. L.; GLOVER, S. H.; SANDERS, J. M. Child day care risks of common infectious diseases revisited. **Child Care Health Dev.** [SI], v. 30, p. 361-368. 2004.

MACLELLAN, K. et al. The 24-Angstrom Structure of Respiratory Syncytial Virus Nucleocapsid Protein-RNA Decameric. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 9519-24, 2007.

MAHONY, J.B. Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 716-47. 2008.

MANOHA, C.; BOUR, J.B.; PITOISET, C.; DARNIOT, M.; AHO, S.; POTHIER, P. Rapid and Sensitive detection of metapneumovirus in clinical specimens by indirect fluorescence assay using a monoclonal antibody. **J. Med. Virol.**, v.80, p. 154-158. 2008.

MANOHA, C.; ESPINOSA, S.; AHO, S.; HUET, F.; POTHIER, P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. **J. Clin. Virol.**, v. 38, p. 221-26. 2007.

MATSUSE, H.; HIROSE, H., TSUCHIDA, T.; FUKAHORI, S.; FUKUSHIMA, C.; MIZUTA, Y. et al. Effects of respiratory syncytial virus infection on dendritic cells and cysteinyl leukotrienes in lung tissues of a murine model of asthma. **Allergol Int.**, v. 56, p. 165-9. 2007.

MELERO, J.A. et al. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. **J Gen Virol.**, v. 78, pt. 10, p. 2411-8. 1997.

MENTEL, R. et al. Molecular and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections in hospitalized children. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 194, n. 1-2, p. 67-71, 2005.

MEYER G, DEPLANCHE M, SCHELCHER F. Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v.31, p. 191-225. 2008.

MOURA, F. E. A.; NUNES, I. F. S.; SILVA, G. B.; SIQUEIRA, M. M. Short report: respiratory syncytial virus infections in northeastern Brazil: seasonal trends and general aspects. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, [SI], v. 74, n. 1, p. 165-167. 2006.

MOURA, F. E.; BLANC, A.; FRABASILE, S.; DELFRARO, A.; DE SIERRA, M. J.; TOME, L.; RAMOS, E. A.; SIQUEIRA, M. M.; ARBIZA, J. Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil. **J Med Virol**, [SI]. v. 74, P. 156-160. 2004.

PAGE, R.D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Comput Appl Biosci.**, v. 12, n. 4, p. 357-8. 1996.

PARANHOS-BACALÀ, G. et al. Mixed Respiratory Virus Infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, p. 407-10. 2008.

PARVEEN, S. et al. Genetic diversity among respiratory syncytial viruses that have caused repeated infections in children from rural India. **J Med Virol.**, v. 78, n. 5, p. 659-65. 2006.

PECCHINI, R. et al. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. **Braz J Infect Dis.**, v.12, n. 6, p.476-9. 2008.

PELTOLA, V.; RUUSKANEN, O. Respiratory Viral Infections in Developing Countries: Common, Severe and Unrecognized. **Clinical Infections Diseases**, v. 46, Editorial Commentary. 2008.

PERET, T. C. T.; HALL, C. B.; SCHNABEL, K. C.; GOLUB, J. A.; ANDERSON, L. J. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of Humana respiratory syncytial virus in a community. **Journal of General Virology**, [SI], v. 79, p. 2221-2229. 1998.

PERET, T. C. et al. Circulation patterns group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. **Journal of Infectious Diseases.**, v. 181, p. 1891-1896, 2000.

PLACKETT, R.L. "Karl Pearson and the Chi-Squared Test". *International Statistical Review* **51** (1): 59–72. 1983.

POUSADA, D.; CRANDALL, K, A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Oxford Journals: **Bioinformatics**. London, v. 14, p. 817–818. 1998.

PUDDU, M.; FANOS, V. Respiratory syncytial virus infection and recurrent wheezing: what next? **J Chemother**, v. 19, suppl 2, p. 8-11. 2007.

PUHAN MA, STEURER J, BACHMANN LM, TER RIET G (2005). "A randomized trial of ways to describe test accuracy: the effect on physicians' post-test probability estimates". *Ann. Intern. Med.* **143** (3): 184–9.

RABONI, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; TSUCHIYA, L. R. R. V.; TAKAHASHI, G. R. A.; PEREIRA, L. A.; PASQUINI, R.; SIQUEIRA, M. M. Respiratory tract viral infections in bone marrow transplant patients. **Transplantation**. [SI], v. 76, p. 142-146. 2003.

RAFIEFARD, D. et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) of group A in Stockholm, Sweden, between 1965 and 2003. **Virus Res.**, v. 105, n. 2, p. 137-45. 2004.

RICETTO, A. G. L; RIBEIRO, J. D.; SILVA, M. T. N.; ALMEIDA, R. S.; ARNS, C. W.; BARACA, E. C. Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Infants Hospitalized for Acute Lower Respiratory Tract Disease: Incidence and Associated Risks. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. [SI], v. 10, n. 5, p. 357-361. 2006.

RIXON, H.W.M. et al. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 5, p. 1153-1165, 2004.

RODRIGUES, O.G. et al. Infecções virais em crianças portadoras de doença respiratória aguda, atendidas em um Centro de Saúde Escola, em Belém, Pará, Brasil. **Pediatria**, v. 24, n. 1, p. 13-20, 2004.

SASTRE, P.; OOMENS, A.G.; WERTZ, G.W. The stability of human respiratory syncytial virus is enhanced by incorporation of the baculovirus GP64 protein. **Vaccine**, v. 25, p. 5025–33. 2007.

SATO, M. et al. Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus Infections among Children with Acute Respiratory Symptoms in a Community over Three Seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 36-40, 2005.

SAÚDE BRASIL – MINISTERIO DA SAÚDE. 2004. Disponível em <http://www.saude.gov.br>. Acesso em 09 de agosto de 2009.

SCOTT, P.D. et al. Molecular analysis of respiratory syncytial virus reinfections in infants from Coastal Kenya. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 1, p. 59-67, 2006.

SCOTT, P.D. et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. **J Med Virol.**, v. 74, n. 2, p. 344-54. 2004.

SILVA, L.H.A. et al. Genetic variability in the G protein gene of Human Respiratory Syncytial Virus isolated from the Campinas Metropolitan Region, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 9, p. 1653-1660, 2008.

SOUZA, L.S.F. et al. Viral Respiratory Infections in Young Children Attending Day Care in Urban Northeast Brazil. **Pediatric Pulmonology**, v.35, p. 184-91. 2003.

SUBCOMITTEE ON DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF BRONCHIOLITIS. Diagnosis and Management of Bronchiolitis. **Pediatrics**, v. 118, p. 1774-1793, 2006.

SULLENDER, W. M. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. **Clin. Microbiol Rev**, [SI], v. 13, n. 1, p. 1-15. 2000.

THOMAZELLI, L. M.; VIEIRA, S.; LEAL, A. L.; SOUSA, T. S.; OLIVEIRA, D. B. L.; GOLONO, M. A.; GILLIO, A. E.; STWIEN, K. E.; ERDMAN, D. D.; DURIGON, E. L. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Southeast Brazil. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 5, p. 422-428. 2007.

TRENTO, A.; VIEGAS, M.; GALIANO, M.; VIDELA, C.; CARBALLAL, G.; MISTCHENKO, A. S.; 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.** [SI], v. 80, n. 2, p. 975-984. 2006.

TRIPP, R. A.; JONES, L. P.; HAYNES, L. M.; ZHENG, H.; MURPHY, P. M.; ANDERSON, L. J. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. **Nat. Immunol.** v. 2, p. 732-38. 2001.

VALDES, O. et al. Unusual Antigenic and Genetic Characteristics of Human Respiratory Syncytial Viruses Isolated in Cuba. **Journal of Virology**, v.72, n.9, p.7589-92.1998.

VIEIRA, S.E.; STEWIEN, K.E.; QUEIROZ, D.A.; DURIGON, E.L.; TOROK, T.J.; ANDERSON, L.J. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo, v. 43, n. 3, p. 124-131. 2001.

WALSH, E.E.; FALSEY, A.R. Hennessey PA. Respiratory syncytial and other virus infections in persons with chronic cardiopulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, p. 791-5. 1999.

WARIS, M. Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: two-year cycles with alternating prevalence of groups A and B. **J Infect Dis.**, v. 163, n. 3, p. 464-9. 1991.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2009. Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em 09 de agosto de 2009.

YANNEY, M; VYAS, H. The treatment of bronchiolitis. **Arch Dis Child.**, v. 93, n. 9, p. 793-8. 2008.

YUSUF, S. et al. The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 7, p. 1077-1090, 2007.

ZHAN, X. et al. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein expressed by recombinant Sendai virus elicits B-cell and T-cell responses in cotton rats and confers protection against RSV subtypes A and B. **Vaccine**, v. 25, n. 52, p. 8782-8793, 2007.

ZHAO J, TAKAMURA M, YAMAOKA A, ODAJIMA Y, IIKURA Y. Altered eosinophil levels as a result of viral infection in asthma exacerbation in childhood. **Pediatr Allergy Immunol.**, v. 13, p. 47-50. 2002.

ZHENG, H.; PERET, T. C.; RANDOLPH, V. B.; CROWLEY, J. C.; ANDERSON, L. J. Strain-specific reverse transcriptase PCR assay: means to distinguish candidate vaccine from wild-type strains of respiratory syncytial virus. **J Clin Microbiol**, [SI], v. 34, n. 2, p. 334-337. 1996.

ZLATEVA, K.T. et al. Genetic Variability and Molecular Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup B Attachment G Protein. **Journal of Virology**, v. 79, n. 14, p. 9157-67. 2005.

ZLATEVA, K.T. et al. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment g glycoprotein. **J Virol.**, v. 78, n. 9, p. 4675-83. 2004.

ZLATEVA, K.T. et al. Subgroup Prevalence and Genotype Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus in Belgium during Ten Successive Epidemic Seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3022-3030, 2007.

ZLATEVA, K.T., 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 Microb.**, v. 45, p. 3022-30.

8. Anexos

ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO COMO CAUSA DE INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS EM CRECHE E HOSPITAL DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
responsável pelo menor _____,
estou sendo informado(a) e esclarecido(a) sobre a importância dos micróbios que causam resfriados, gripes, infecção pulmonar e dificuldade respiratória nas crianças. Esses micróbios podem ser bactérias ou vírus, que causam uma doença muito parecida, só que o tratamento é diferente. Para diferenciar estes 2 micróbios, alguns exames ajudam, como o RX de tórax e o exame de sangue.

Um dos vírus mais frequentes em crianças pequenas chama-se vírus sincicial respiratório.

Neste estudo, queremos saber se o vírus respiratório sincicial é frequente e grave nas crianças menores de 6 anos de idade problemas respiratórios.

Para pesquisar se a criança tem o vírus, colheremos secreção do nariz, procedimento realizado pelo médico responsável ou enfermeira capacitada, sem risco para a criança. Estou ciente de que se meu filho(a) não participar deste estudo ele (a) receberá toda a assistência que for necessária para seu tratamento e, caso eu consinta com a participação no estudo, posso solicitar e obter informações sobre a natureza do estudo, posso retirar o consentimento a qualquer momento e isto não irá interferir no tratamento oferecido ao meu filho.

Concordo que as informações obtidas neste estudo sejam divulgadas, desde que a identidade da criança não seja revelada.

Após ter sido suficientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto de livre e espontânea vontade em participar deste estudo.

São José do Rio Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável legal

Assinatura do pesquisador

ANEXO III – HISTÓRICO DO PACIENTE: DADOS GERAIS

PROTOCOLO RSV – QUADRO GERAL

Nº da Ficha Epidemiológica / Estudo: ____/____

Nº do Prontuário / Creche / Hospital: _____

1- Identificação			
Nome: _____			
Data de Nascimento: _____	____/____/____	Sexo: Fem ()	Masc ()
2- História de Infecções Respiratórias			
Tem gripe / resfriado todo mês?	Sim ()	Não ()	
Já fez uso de inalação?	Sim ()	Não ()	
Caso (SIM), Local:	Pronto Socorro ()	Farmácia ()	Casa ()
3- Presença de Chiado			
Quantos episódios no último ano ?	< 3 ()	> 3 ()	
Idade de Início:	____ anos		
Desencadeantes:	<input type="checkbox"/> IVAS <input type="checkbox"/> Fumaça de Cigarro <input type="checkbox"/> Poeira <input type="checkbox"/> Mudança de Tempo Outros () :		
4- Internações Anteriores (por infecção respiratória)			
Internações anteriores :	Sim ()	Não ()	
Quantas vezes ? :	< 1 ano:	> 1 ano:	
Quantas vezes na UTI ?:			
5- Antecedentes Pessoais e Familiares			
Renda familiar:	< 1 salário () 1 a 3 salários () 3 a 10 salários () mais de 10 ()		
Tipo de Parto:	<input type="checkbox"/> normal	<input type="checkbox"/> cesárea	Peso ao nascer: _____
Prematuro:	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim : _____ semanas	
Leite materno – sim ():	____ meses	não ()	<input type="checkbox"/> Exclusivo: _____ meses
Freqüente Creche?	Sim () qual: _____	Não ()	
Freqüente UBS?	Sim () qual: _____	Não ()	
Nº de pessoas em casa: _____	Nº de irmãos: _____		
Quantos dormem no mesmo quarto? _____	Nº de fumantes na casa: _____ fuma dentro de casa? Sim () Não ()		
Antecedentes familiares:	<input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Rinite <input type="checkbox"/> Eczema <input type="checkbox"/> Outras alergias		
Antecedentes pessoais:	<input type="checkbox"/> Cardiopatia <input type="checkbox"/> Displasia Broncopulmonar <input type="checkbox"/> F. Cística <input type="checkbox"/> Imunodeficiências <input type="checkbox"/> O ₂ neonatal <input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Rinite <input type="checkbox"/> Eczema <input type="checkbox"/> DRGE		

Data da Coleta das Informações: ____/____/____

Data da Entrevista na Creche: ____/____/____

Data da Saída da Creche: ____/____/____

Nome: _____

ANEXO IV – HISTÓRICO DO PACIENTE: DADOS REFERENTES A
INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA ATUAL

PROTOCOLO RSV – FICHA COLETA – QUADRO ATUAL

Data da colheita: ____/____/____

Local da colheita: Creche/ Hospital

Nº do Protocolo: ____/____

1) Identificação

Nome: _____

Data da Admissão: ____/____/____ Data da Alta: ____/____/____ (Hospital)

2) Diagnóstico Internação/Atendimento UBS:

Local de Internação: () Enfermaria () UTI () Berçário

Diagnóstico Alta: _____ (Hospital)

3) História Atual: Data do início dos sintomas da doença atual: ____/____/____

Sintomas - Dados de evolução clínica durante a internação			Tempo de Evolução (horas/dias)
Febre	Sim ()	Não ()	
Tosse	Sim ()	Não ()	
Coriza	Sim ()	Não ()	
Obstrução nasal	Sim ()	Não ()	
Espirros	Sim ()	Não ()	
Chiado no Peito	Sim ()	Não ()	
Falta de Ar	Sim ()	Não ()	
Estridor	Sim ()	Não ()	
Apnéia	Sim ()	Não ()	
Prurido Nasal	Sim ()	Não ()	
Olhos Vermelhos	Sim ()	Não ()	

Data do início dos sintomas na creche: ____/____/____

Data do final dos sintomas na creche: ____/____/____

4) Medicação (para o quadro atual) em uso antes desta Internação/ no momento da coleta na Creche: () Sim () Não

Caso “Sim”, quais ?

Anti-térmicos	Sim ()	Não ()
Antibióticos	Sim ()	Não ()
Xaropes para tosse	Sim ()	Não ()
Anti-inflamatório	Sim ()	Não ()
Broncodilatador	Sim ()	Não ()
Uso de O ₂	Sim ()	Não ()

5) Medicação prescrita durante esta Internação:

B ₂ inalatório	Sim ()	Não ()
Brometo ipatropium	Sim ()	Não ()
Corticóides	Sim ()	Não ()
Antibióticos	Sim ()	Não ()
Aminofilina	Sim ()	Não ()
Drogas anti DRGE	Sim ()	Não ()

6) Dados da consulta – Exame Físico: Do momento da coleta

Estado Geral	Bom ()	Regular ()	Ruim ()
Peso:	Estatura:	FR:	Temperatura:
FC:	Nutrição: Normal () DPC I () DPC II ()		
Retrações: Sim () Não ()	Local:		
Sibilos: Sim () Não ()	Local:		
Estertores: Sim () Não ()	Local:		
Cianose: Sim () Não ()	Local:		

Anotar resultados de exames laboratoriais colhidos no momento da internação:

Hemograma: _____

Proteína C reativa: _____

Hemocultura: _____

Rx de Tórax: _____