



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
CURSO DE MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS
PATOLOGIA DAS DOENÇAS TROPICAIS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO VÍRUS
RESPIRATÓRIO SINICIAL ISOLADAS DE CASOS DE INFECÇÃO
RESPIRATÓRIA AGUDA NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ, BRASIL ENTRE
OS ANOS DE 2000 A 2006.**

MIRLEIDE CORDEIRO DOS SANTOS

Belém-Pará

Julho/2006



MIRLEIDE CORDEIRO DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL ISOLADAS DE CASOS DE INFECÇÃO RESPIRATÓRIA
AGUDA NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ, BRASIL ENTRE OS ANOS DE
2000 A 2006.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa

Co-orientador: Prof. Dr. Wyller Alencar de Mello

Belém-PA

Julho/2006

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)-
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical, Belém (PA)**

Santos, Mirleide Cordeiro dos

Caracterização molecular de cepas do vírus respiratório sincicial isoladas de casos de infecção respiratória aguda na cidade de Belém, Pará, Brasil entre os anos de 2000 a 2006 / Mirleide Cordeiro dos Santos; orientadora Rita Catarina Medeiros Sousa; co-orientador, Wyller Alencar de Mello. - Belém, 2006.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2006.

1. Infecções respiratórias em crianças. 2. Vírus sincicial nas crianças. I. Sousa, Rita Catarina Medeiros, orient. II. Mello, Wyller Alencar de, co-orient. II. Título.

CDD. 22. ed. 618.922

Ficha catalográfica elaborada por Valdenira de Jesus NMT/UFPA

MIRLEIDE CORDEIRO DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO VÍRUS
RESPIRATÓRIO SINCICIAL ISOLADAS DE CASOS DE INFECÇÃO
RESPIRATÓRIA AGUDA NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ, BRASIL
ENTRE OS ANOS DE 2000 A 2006.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, pela Comissão formada pelos professores:

Data da aprovação: 03/07/2006.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa - Orientador

Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite - Avaliador

Fundação Oswaldo cruz, FIOCRUZ

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado - Avaliador

Universidade do Federal do Pará, UFPA

Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes - Avaliador

Instituto Evandro Chagas, SVS, MS

EPIGRAFE

*“Uma coisa posso afirmar e provar
com palavras e atos: é que nos
tornamos melhores se cremos que é
nosso dever seguir em busca da
verdade desconhecida”*

(Sócrates)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pela boa criação, pela minha formação pessoal e pelo amor incondicional que sempre me deram.

Aos meus irmãos Malena, Marcleide, Marcos e Mateus pelo companheirismo e o incentivo que sempre me dedicaram.

Aos meus amados sobrinhos Jan e Mel dois anjos de luz em minha vida.

Aos meus avós, tios, tias, primos e primas, enfim todos meus familiares por todo carinho. Em especial a minha querida bisavó Joana a quem Deus requisitou sua presença junto dele durante o desenvolvimento deste trabalho, ela sempre será um exemplo de humildade e amor.

A vocês todo o meu carinho, respeito e amor eterno.

AGRADECIMENTOS

A Deus pai amoroso, meu senhor e guia, que me conduziu a mais esta vitória.

A Dr^a. Rita Medeiros pela imensa paciência e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Wyller Mello por todos os conhecimentos passados e pelo apoio incondicional durante a execução deste trabalho.

A Dr^a. Maria de Lourdes Contente Gomes, “minha mãe”, pelos ensinamentos compartilhados e por todo amor e carinho que sempre demonstrou.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior pela bolsa-auxílio concedida durante os últimos 12 meses de execução deste trabalho.

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa de sua Diretora Dr^a. Elisabeth Santos, por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Seção de Virologia do IEC, representada pelo seu chefe Dr. Alexandre Linhares, que chega a ser minha segunda casa.

Andréia minha grande amiga, pela sempre sincera amizade, por todas as alegrias que passamos juntas e por todo companheirismo nos momentos difíceis de nossa vida.

Ao Wander Luis pela amizade e carinho nesses anos de convivência e por todo incentivo durante esta jornada.

Ao amigo Jefferson Santos que mesmo estando longe, nunca deixou de me incentivar e por ter sempre se mostrado um amigo leal e companheiro.

A tia Isa que tem sido minha segunda mãe cuidando de mim.

A Luana Barbagelata e sua família por todo o apoio e o carinho durante a execução deste trabalho.

A Edna Filizzola pela amizade nesses anos de convívio.

A Luana Soares, Telma Ribeiro mais do que colegas de curso, companheiras para toda vida.

A Ceyla Castro grande incentivadora do meu trabalho e amiga.

A Darleise Oliveira por todos os conhecimentos e esforços dispensados neste trabalho

Aos amigos Rodrigo Henryque e Talita Barnabé, companheiros que quero ter por toda vida ao meu lado.

A Dr^a. Olinda Macedo que muito contribuiu para realização deste trabalho.

As amigas Socorro e Nereide que sempre me apoiaram nesta caminhada.

As meninas da SEVIR, Clarissa Lima, Silvia Guerra, Potira Fernandes, Helem Ribeiro e Luiza Costa.

Aos pesquisadores do Instituto Evandro Chagas Dr. Ronaldo Freitas, Dr^a Olinda Macedo, Dr^a Joana Mascarenhas, Dr^a Yvone Gabay, Dr^a Ana Wanzeller e Talita Monteiro.

A todos os demais amigos e amigas da SEVIR, por terem sido uma família para mim.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

As doenças do trato respiratório são as principais queixas nos serviços de atendimento médico, sendo as infecções respiratórias agudas (IRA) as manifestações mais comuns, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade. Em países em desenvolvimento as IRA constituem um sério problema de saúde pública. Em todo mundo estima-se que ocorram cerca de dois milhões de mortes devido as IRA a cada ano. Dentre os agentes causais das mesmas, destaca-se o Vírus Respiratório Sincicial (VRS), especialmente por causar doença grave em crianças menores de dois anos. Com o objetivo de gerar dados sobre a epidemiologia molecular deste vírus, foram analisadas amostras colhidas de pacientes com IRA no período de 2000 a 2006 na cidade de Belém, Pará. Foram utilizados testes de imunofluorescência indireta (IFI) para caracterização antigênica dos vírus isolados e RT-PCR para os genes codificadores das proteínas G e F, que foram em seguida parcialmente seqüenciados. Dentro do período estudado, 153 amostras positivas para VRS foram detectadas. A faixa etária de 0-4 anos foi a que concentrou maior número de casos (n=138; 90,19%). Em relação ao perfil sazonal, o pico de atividade do VRS ocorreu nos primeiros seis meses do ano, estando associado principalmente ao período de troca da estação chuvosa para um período de menor pluviosidade. Houve co-circulação dos subgrupos A e B nos anos de 2001 e 2003. Em 2000, 2005 e 2006 somente o subgrupo A circulou. Entretanto no ano de 2004 foi registrada a ocorrência somente do subgrupo B. Dentro do período estudado, genótipos distintos da proteína G do subgrupo A (GA2 e GA5) e do subgrupo B (SAB1 e SAB3) foram detectados, indicando o primeiro relato da circulação do genótipo SAB1 na América do Sul. Em 2004, um *cluster* diferenciado dos demais genótipos circulantes foi encontrado, sendo este denominado BRB1. A análise do gene codificador da proteína F permitiu a identificação de mutações na sequência nucleotídica resultando em trocas na cadeia aminoacídica da mesma. Este estudo representa o primeiro relato sobre dados da epidemiologia molecular do Vírus Respiratório Sincicial na região Norte do Brasil.

Palavras-chave: IRA, Respiratório Sincicial, epidemiologia molecular

ABSTRACT

The diseases of respiratory tract are the main complaints in the services of medical consultations, acute respiratory infections (ARI) are the most common manifestations, mainly in children under five years old. In developing countries ARI represent a serious problem of public health. Every year, ARI are responsible by about 2 million deaths all over the world. Among the infectious agents the Respiratory Syncytial virus (RSV) is the most important pathogen in infants and young children because of severe bronchiolitis and pneumonia that it may cause. With the objective to generate data on the molecular epidemiology of this virus, patients' clinical samples with ARI were analyzed during the period 2000 - 2006 in the city of Belém, Pará. Test of Indirect immunofluorescence (TIF) was used for antigenic characterization of isolated viruses and the RT-PCR for the genes encoders of the proteins G and F, that were partially sequenced. In the total period, 153 positive samples of RSV were analyzed. The age group 0-4 years showed the larger number of cases (90,19%). In relation to the seasonal profile, the pick of activity of RSV happened in the first six months of the year, being associated mainly to the period of change of the rainy season to a less rainy period. There was a co-circulation of the subgroups A and B in the years of 2001 and 2003. In 2000, 2005 and 2006 just the subgroup A was detected. However in the year of 2004 was only registered the occurrence of subgroup B. Inside the studied period, were detected different genotypes from the protein G of the subgroup A (GA2 and GA5) and of the subgroup B (SAB1 and SAB3) , indicating the first report about circulation of the genotype SAB1 in South America. In 2004, was found a differentiated cluster of the other circulating genotypes, being denominated BRB1. The analysis from gene encoder of the protein F allowed identification of mutations in the nucleotidic sequence that resulted in changes in the aminoacídica chain. This study represents the first report about the molecular epidemiology of the Respiratory Syncytial Virus in the North region of Brazil.

Keywords: ARI, Respiratory Syncytial Virus, Molecular Epidemiology.

SUMÁRIO

		Página
1	INTRODUÇÃO	12
1.1	GENERALIDADES	12
1.2	O VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL	13
1.2.1	Classificação e estrutura	13
1.2.2	Ciclo Replicativo	16
1.3	VARIABILIDADE ANTIGÊNICA E GENÉTICA DO VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL	17
1.3.1	Variabilidade da proteína G	18
1.3.2	Variabilidade da proteína F	23
1.4	IMUNOPATOLOGIA DA INFECÇÃO CAUSADA PELO VRS	24
1.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS INFECÇÕES PELO VRS	26
1.6	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA INFECÇÃO PELO VRS	28
1.7	DIAGNÓSTICO	32
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	AMOSTRAS	36
4.2	PROPAGAÇÃO DO VÍRUS EM CULTIVO CELULAR	36

4.2.1	Re-inoculação das amostras	36
	SUBGRUPAMENTO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA	
4.3	INDIRETA	37
4.4	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	38
4.4.1	Extração do RNA viral (RNAv)	38
	Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida	
4.4.2	de transcrição reversa (RT-PCR)	40
4.4.2.1	Amplificação do gene F	41
4.4.2.2	Amplificação do gene G	42
4.4.3	Eletroforese em gel de agarose	42
4.4.4	Purificação do produto da RT-PCR	43
4.4.5	Quantificação do DNA	43
4.4.6	Reação de sequenciamento	44
4.4.7	Precipitação do produto da reação de sequenciamento	45
4.4.8	Eletroforese em seqüenciador automático	46
4.4.9	Alinhamento, edição das sequências e construção da árvore filogenética.	46
5	RESULTADOS	48
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	ANEXOS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. GENERALIDADES

As doenças do trato respiratório são as principais queixas nos serviços de atendimento médico, sendo as infecções respiratórias agudas as manifestações mais comuns, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade. A infecção respiratória aguda (IRA) é caracterizada por infecções do trato respiratório de início repentino e de gravidade variável e constitui-se em um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo (Avendaño *et al.*, 2003; Noyola *et al.*, 2004; Calegari *et al.*, 2005; D'Élia *et al.*, 2005).

As IRA atuam como importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Avendaño *et al.*, 2003; Noyola *et al.*, 2004). Em países em desenvolvimento as IRA, juntamente com a diarreia e a desnutrição são as principais causas de morbimortalidade em crianças menores de cinco anos de idade (OMS & OPAS, 2005). Em todo mundo estima-se que ocorram cerca de dois milhões de mortes devido as IRA a cada ano em crianças menores de cinco anos de idade (OMS & OPAS, 2005).

Dentre os agentes causais de IRA, destacam-se os patógenos virais. Com efeito, são os agentes virais responsáveis por cerca de 90% dos casos de infecção respiratória do trato respiratório superior e considerável proporção dos casos de infecção do trato respiratório inferior. Sendo o vírus respiratório sincicial (VRS) reconhecido como um dos principais agentes causadores de doença grave do trato respiratório inferior em crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo

(Collins *et al.*, 2001; Black *et al.*, 2003; Calegari *et al.*, 2005; D'Élia *et al.*, 2005; Moura *et al.*, 2003; Viegas & Mistchenko, 2005).

O VRS foi primeiramente isolado no ano de 1956 por Robert M. Chanock, o qual iniciou sua caracterização, propondo o nome vírus respiratório sincicial, baseado na modificação da estrutura celular ocorrida dentro das vias aéreas e do parênquima pulmonar seguida da infecção (Chanock & Finberg, 1957 apud Black *et al.*, 2003). Na década de 1960, o VRS foi associado a numerosas epidemias na infância, ocorridas em todo o mundo, particularmente durante o inverno de regiões temperadas, e em estações chuvosas, nas áreas tropicais (Black *et al.*, 2003).

1.2. O VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL

1.2.1. Classificação e Estrutura

O VRS é membro da família *Paramyxoviridae* gênero *Pneumovirus*, sendo classificado quanto à diversidade antigênica de suas glicoproteínas de superfície em dois subgrupos, A e B (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985).

Trata-se de um vírus pleomórfico e, quando em forma esférica, mede cerca de 150-300 nm de diâmetro. São envelopados por uma bicamada lipídica, que é derivada da membrana plasmática da célula hospedeira. Inseridas no envelope viral encontram-se duas principais proteínas estruturais a glicoproteína G e a glicoproteína F as quais são alvo principal da resposta imune do hospedeiro. Na face interna do envelope encontra-se a proteína de matriz (M). No interior do vírion está localizado o complexo ribonucleoprotéico (Figura 1).

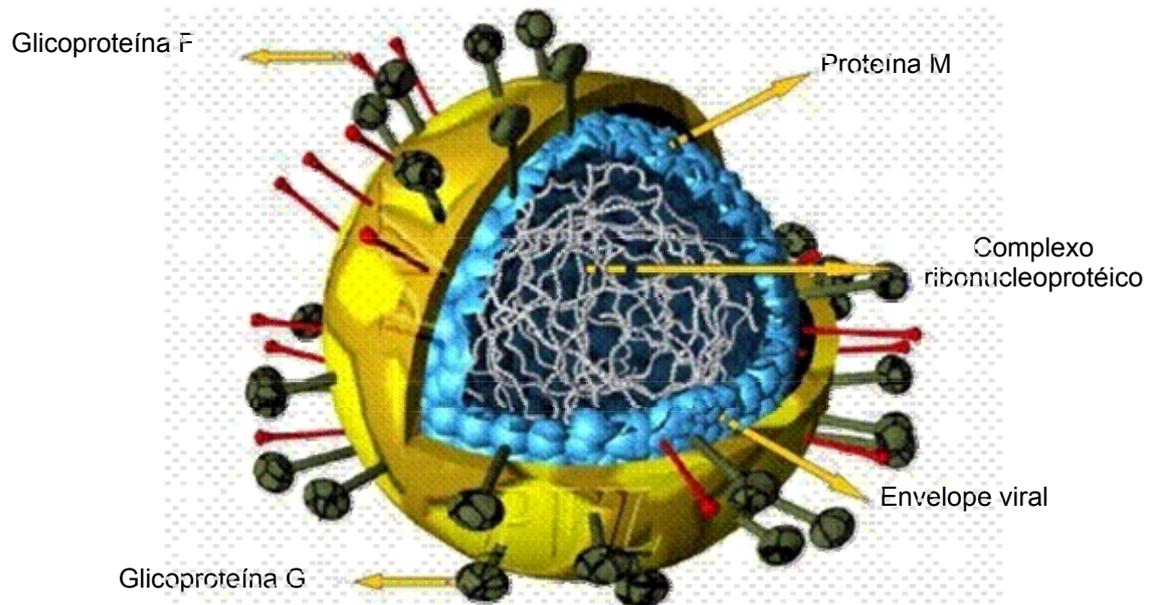


Figura 1: Representação esquemática da partícula viral do VRS mostrando as principais estruturas e proteínas virais. Fonte: Adaptado de Randhawa JS: A pneumovírus Cartoon. www.medscap.com/viewarticle/431615

O genoma viral é composto por ácido ribonucléico (RNA) de fita simples, não segmentado, de polaridade negativa, com tamanho de 15,2 Kb que, em associação com proteínas virais, forma o nucleocapsídeo. Durante a infecção, o RNA viral é transcrito em 10 moléculas de RNA mensageiro (RNAm), poliadenilados, com tamanhos que variam de 405 a 6500 nucleotídeos, que por meio de suas regiões de leitura aberta (ORF; *open reading frame*) cada um codifica uma ou mais proteínas virais.

Cada gene inicia com uma sequência de 10 nucleotídeos que atua como sinal de início para transcrição, esta sequência apresenta-se altamente conservada em todos os genes com exceção do gene L que tem o sinal de início um pouco divergente. Ao término do gene encontra-se uma região semiconservada, formada

por 12-13 nucleotídeos, que atua como sinal de parada (Figura 2) [Collins *et al.*, 2001].

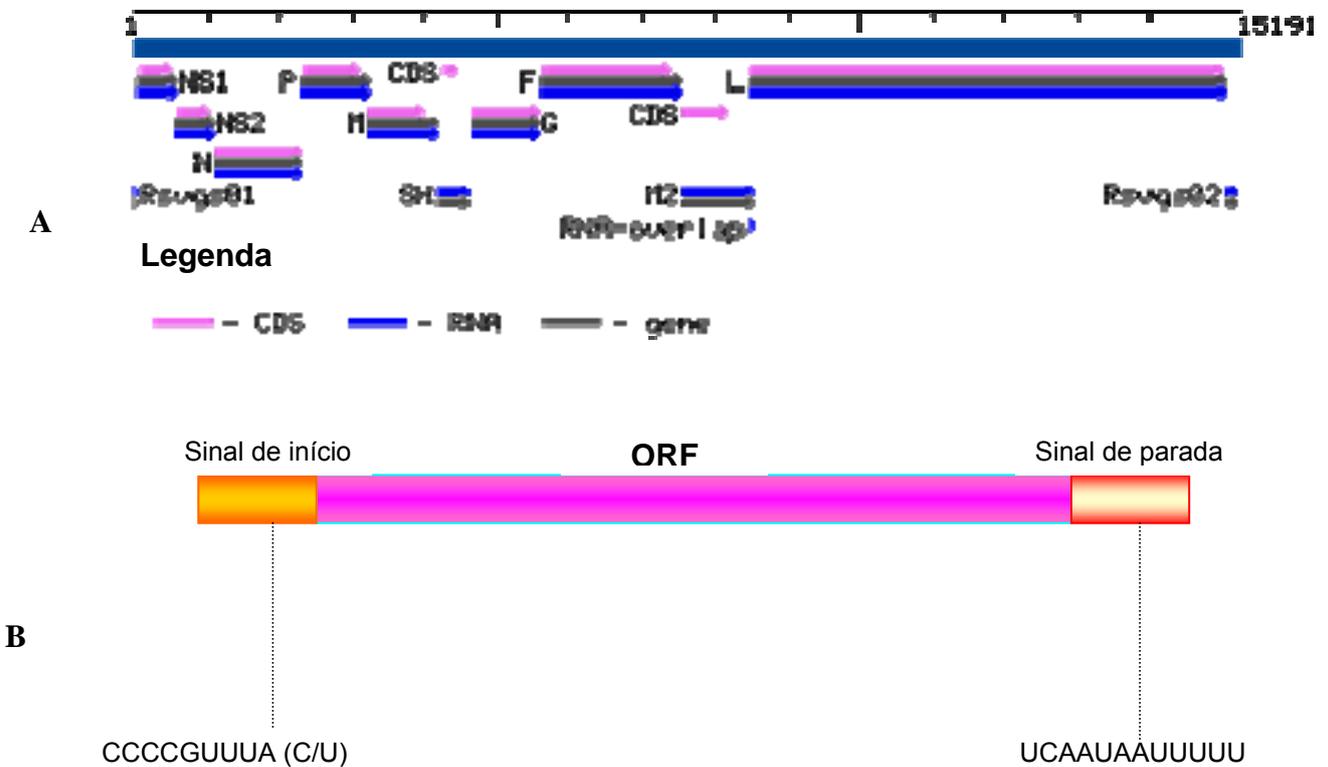


Figura 2: Representação esquemática do genoma viral. **A** Todos os seguimentos gênicos. CDS: Sequência codificante. Fonte <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>. **B** Estrutura gênica com as sequências do sinal de início e parada da transcrição e ORF. Adaptado de Collins *et al.*, 2001.

Das proteínas codificadas pelos RNAm, três são glicoproteínas transmembranares F, G e SH que estão inseridas no envelope viral. A proteína G tem função de ligação do vírus à célula, enquanto que a proteína F, em combinação com as proteínas G e SH, é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira e pela formação característica de sincício em cultura de células (Collins *et al.*, 2001). A formação de sincícios consiste em um

efeito citopático proeminente, atuando ainda, como um mecanismo de propagação viral.

A proteína M possui duas funções principais: restituir o nucleocapsídeo inativo após o empacotamento das nucleoproteínas e mediar associação do nucleocapsídeo com o envelope recém formado (Frabasille, 1994).

São codificadas ainda, quatro proteínas que participam da formação do nucleocapsídeo, a nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P), a subunidade da polimerase (L) e o fator de alongação de transcrição (M2-1), que anteriormente acreditava-se que seria uma segunda proteína de matriz. Existem duas proteínas não-estruturais, isto é, presentes apenas em células infectadas, NS1 e NS2, além da proteína RNA regulatória M2-2 (Collins *et al.*, 2001).

1.2.2. Ciclo Replicativo do VRS

A adsorção do vírus na superfície da célula ocorre a partir da fixação ou ligação da glicoproteína G aos receptores celulares, possivelmente certos GAGs (polissacarídeos formados pela repetição de uma única cadeia de dissacarídeos). A entrada do vírus se faz por meio da fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira, sendo esta etapa, mediada pela glicoproteína F. O nucleocapsídeo é, então, liberado no citoplasma da célula hospedeira, local onde ocorre a replicação viral. A partir do RNA viral são transcritos RNA mensageiros, que servirão de molde para a tradução das proteínas virais, e também um RNA complementar (RNAc) de onde será transcrito o RNA viral (Figura 3) [Ruuskanen & Ogra, 1993].

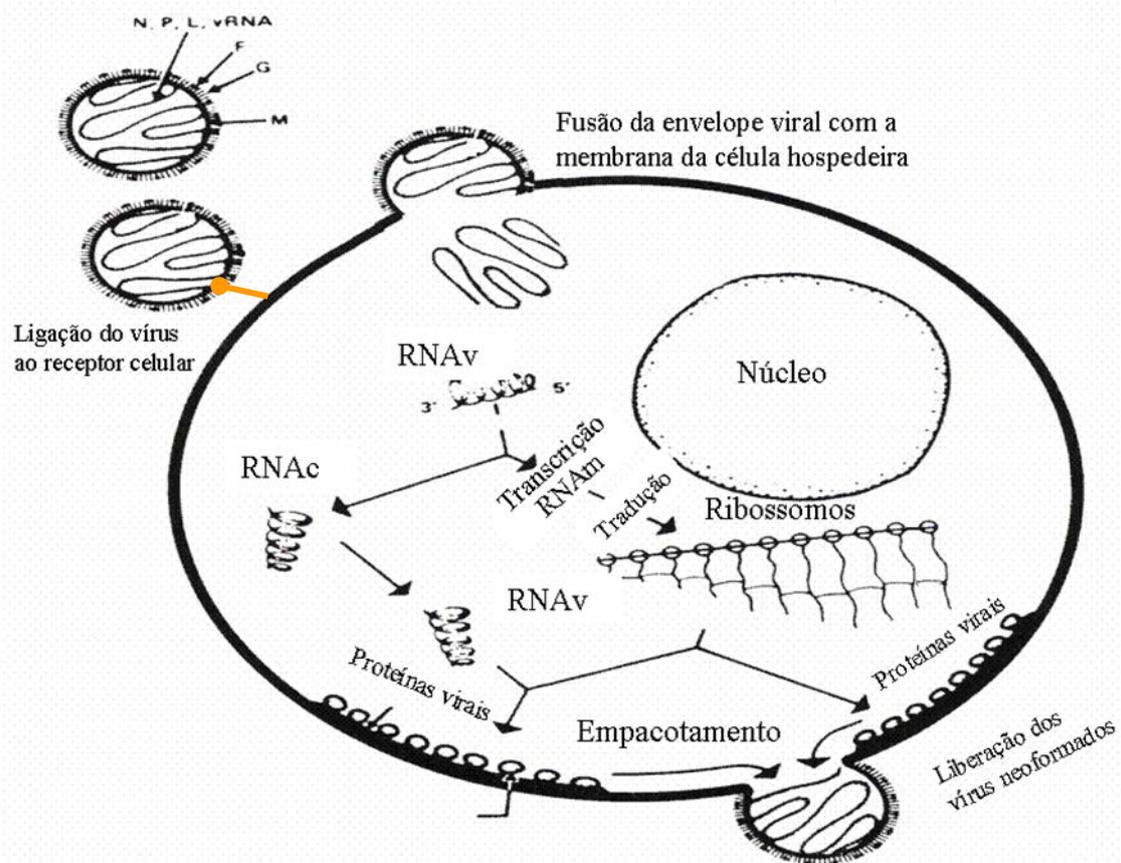


Figura 3. Representação esquemática mostrando as principais etapas do ciclo replicativo do vírus respiratório sincicial, Entrada do vírus na célula, replicação e transcrição viral (Adaptado de Ruuskanen & Ogra, 1993 in Currents Problems in Pediatrics).

1.3. VARIABILIDADE ANTIGÊNICA E GENÉTICA DO VRS

As diferenças antigênicas entre as cepas de VRS foram primeiramente relatadas por Coates *et al.* em 1963 em estudo utilizando o teste de neutralização cruzada com soro de furão (*Mustela putorius furo*) pós-infectados com as cepas *Long Strain* (isolada em 1956) e CH-18537 (isolada em 1962).

Estas diferenças foram melhor demonstradas em estudos posteriores, nos quais foram utilizados painéis de anticorpos monoclonais direcionados contra as proteínas F, G, M, N e P do VRS. A partir dessas análises, comprovou-se a

existência de dois subgrupos do vírus, que foram designados como A e B (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985; Akerlind & Norrby, 1986). Foi também a partir de estudos com anticorpos monoclonais que ficou demonstrada a existência de variabilidade antigênica entre cepas de um mesmo subgrupo (Garcia-Barreno *et al.*, 1989; Hendry *et al.*, 1989). Posteriormente, a variabilidade entre os subgrupos foi demonstrada a nível molecular, confirmando assim, a existência de dois subgrupos genéticos distintos de VRS, os subgrupos A e B (Baybutt & Pringle, 1987; Cristina *et al.*, 1990; Cane & Pringle, 1995).

A variação antigênica pode contribuir para a habilidade do VRS em escapar à resposta imune e estabelecer a infecção, bem com causar re-infecções durante toda vida. Relata-se que a infecção pelos vírus do subgrupo A promove uma maior proteção à infecção subsequente pelos vírus do subgrupo B, isto pode explicar a predominância do subgrupo A durante os períodos epidêmicos (Barreira *et al.*, 2001).

Acredita-se que a heterogeneidade na gravidade da doença por VRS se deva à combinação de fatores virais (variabilidade genética dos subgrupos) e fatores do hospedeiro (sistema imunológico) [McConnochie *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1990; Devincenzo, 1997; Walsh *et al.*, 1997; Martinello *et al.*, 2002].

1.3.1. Variabilidade da glicoproteína G

A glicoproteína G tem sido o principal alvo de estudos de variabilidade entre os subgrupos virais, devido a grandes diferenças antigênicas e genéticas mostradas por esta proteína e, ainda, por está envolvida na indução de resposta imune (Sullender *et al.*, 2000). De fato, a variabilidade antigênica e genética entre os

subgrupos, bem como entre cepas de um mesmo subgrupo é mais acentuada ao nível da proteína G. Isto foi demonstrado em diversos relatos na literatura (Johnson *et al.*, 1987; Garcia, 1994; Melero *et al.*, 1997).

Nesta proteína, a divergência na sequência aminoacídica pode ser de até 47% entre os subgrupos e, entre cepas de um mesmo subgrupo, pode chegar a 20% (Johnson *et al.*, 1987, Garcia *et al.*, 1994).

A proteína G consiste em uma glicoproteína de transmembrana tipo II, apresentando-se provavelmente como um homotrímero (Figura 4). A forma precursora da proteína G tem aproximadamente 32 KDa, que é modificada pela adição de oligossacarídeos, especialmente manose, levando a geração de uma forma intermediária de 45 a 50 KDa. A forma madura é sintetizada dentro do compartimento de Golgi e tem cerca 80 a 90 KDa (Melero *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2001). Foi comprovado que a remoção dos oligossarídeos afeta a infectividade viral, o que sugere que os carboidratos sejam necessários à função da proteína (Lambert, 1988 *apud* Melero *et al.*, 1997).

Seu RNAm tem aproximadamente 918 nt que codifica cerca 289 a 299 aminoácidos, dependendo da cepa (Johnson *et al.*, 1987; Martinez *et al.*, 1997; Sullender, 2000).

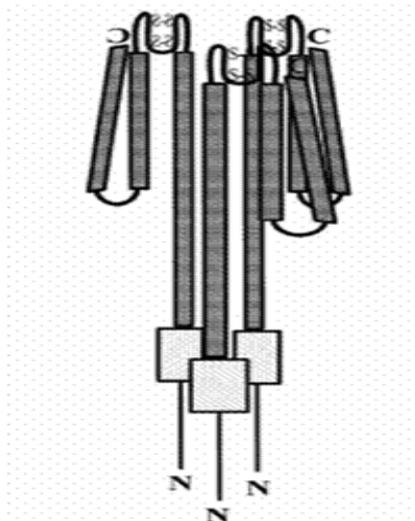


Figura 4: Representação esquemática da estrutura da proteína G Homotrímero com as pontes dissulfídicas (S-S) e as extremidades N e C-terminal. Os retângulos lisos representam o domínio transmembrana e os retângulos rachurados denotam as regiões variáveis *mucina-like*. Fonte: Melero *et al.*, 1997.

Esta proteína apresenta um domínio hidrofóbico localizado na extremidade N-terminal que vai do resíduo 38 ao 66, o qual funciona como âncora (Wertz *et al.*, 1985).

No ectodomínio da região C-terminal encontra-se um grupo de quatro cisteínas correspondentes aos resíduos 173, 176, 182 e 186, que se mostram conservados em todos os vírus isolados. Outra região conservada, corresponde a um pequeno segmento que vai do resíduo 164 ao 176, corresponde à região hidrofóbica do ectodomínio, o qual propõe-se que seja o provável sítio receptor da ligação do vírus à célula (Johnson *et al.*, 1987a). Flanqueando esta região encontram-se dois segmentos protéicos com grande variabilidade e ricos em treonina e serina, potenciais sítios de O-glicosilação. O ectodomínio apresenta ainda duas regiões hipervariáveis, a primeira localizada entre os aminoácidos 101 e 103, e

a outra na terça parte do C-terminal sendo formada por três pequenos domínios variáveis. São nestas regiões que se concentram a maior quantidade de trocas aminoacídicas, sendo por isso, as principais responsáveis pela variabilidade antigênica da glicoproteína G (Figura 5) [Melero *et al.*, 1997].

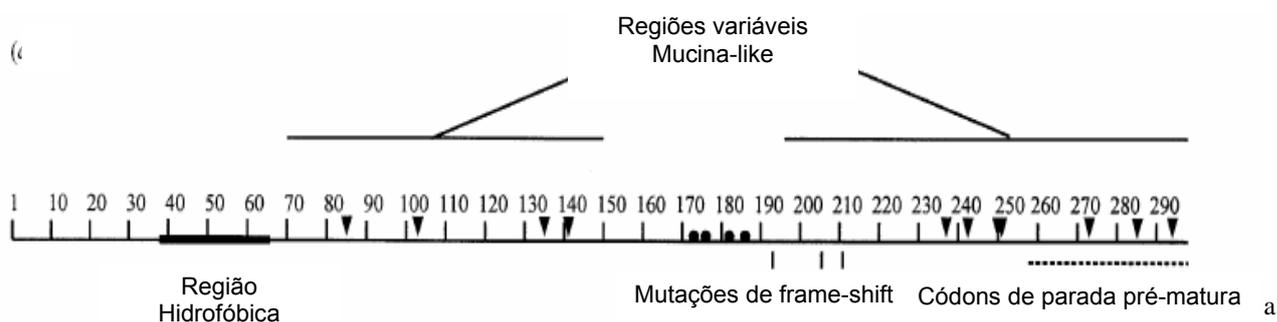


Figura 5: Representação linear da glicoproteína G, demonstrando a região hidrofóbica (sublinhada), os sítios com potencial N-glicosilação (▼), os resíduos de cisteína (•), as regiões com alto conteúdo de serina (sítios de O-glicosilação), que se assemelham a mucinas (mucina-like), os sítios onde ocorrem mutação *frame-shift* (|) e os códon de parada prematura (.....). Fonte: Melero *et al*, 1997.

Quanto aos tipos de epítomos capazes de induzir resistência à infecção, estudos com anticorpos monoclonais específicos para a proteína G demonstram a ocorrência de três categorias: a) epítomos conservados que são encontrados em todos os VRS isolados; b) epítomos grupo-específicos, distribuídos em cepas isoladas do mesmo grupo, e c) epítomos variáveis ou cepa-específico presentes em certos isolados de um mesmo grupo antigênico. Os epítomos cepa-específicos tendem a se localizar na porção variável da região C-terminal do polipeptídio G. Já

os epítomos grupo-específicos e os epítomos conservados geralmente estão localizados na região central da estrutura primária da proteína G (Martinez *et al.*, 1997).

A diversidade estrutural e antigênica da proteína G vista principalmente na região C-terminal, se deve a mutações ocorridas nas sequências de nucleotídeos do gene codificador da proteína. As mudanças mais drásticas na estrutura da proteína parecem ocorrer por três processos principais:

a) mutações de *frame-shift* que são ocasionadas pela inserção ou deleção de uma ou mais bases.

b) códons de terminação prematura, gerando o truncamento do tamanho da proteína, que pode perder de 1 a 42 aminoácidos.

c) com processo de hipermutação principalmente transições A--G (Garcia-Barreno *et al.*, 1990; Rueda *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 1997; Melero *et al.*, 1997).

A variabilidade observada entre cepas do mesmo subgrupo possibilita dividir os vírus isolados em genótipos, havendo divergência entre eles de até 20% na sequência nucleotídica (Cane & Pringle, 1995; Peret *et al.*, 1998). Neste contexto, vários genótipos foram identificados em todo o mundo, sendo que dentro do subgrupo A, nove foram descritos até o momento. São eles: GA1 a GA7, SAA1 e BEA1 (Peret *et al.*, 1998; Choi & Lee, 2000; Venter *et al.*, 2001 ; Moura *et al.*, 2004; Zlateva *et al.*, 2004; Viegas *et al.*, 2005). Em estudo recente Zlateva *et al.*, 2005 demonstraram a circulação de 13 distintos genótipos de VRS do subgrupo B (GB1 a GB13) na Bélgica. Contudo os mais referidos são os GB1, GB2, GB3 e GB4, bem como os isolados recentemente na África SAB1 a SAB3.

Estudos recentes têm sugerido que os genótipos da proteína G do VRS A determinam diferentes graus de gravidade da doença. Em um deles, o genótipo GA3 estaria associado com infecção significativamente mais grave do que os genótipos GA2 e GA4 e VRS B (Martinello *et al.*, 2002). Em outro estudo, o subgrupo A e genótipo GA2 foram associados com maior gravidade de doença por VRS do que cepas do subgrupo B (Gilca *et al.*, 2006). A associação entre subgrupos e genótipos de VRS e gravidade da doença, no entanto, não foi confirmada em outros estudos (Smyth *et al.*, 2002; Venter *et al.*, 2002; Struck *et al.*, 2004).

1.3.2. Variabilidade da proteína F

A proteína F mostra um alto grau de conservação entre os subgrupos, cerca de 91% de similaridade na sequência de aminoácidos, ao contrário da proteína G. O RNAm desta proteína possui cerca de 1.903 nucleotídeos, traduzido em 574 aminoácidos (Collins *et al.*, 2001).

Evidências sugerem que a proteína F é o principal alvo para resposta imune protetora, sendo, por isso, eleita como alvo de estudo para desenvolvimento de vacinas e medicamentos utilizados na profilaxia da infecção por VRS como no caso do Palivizumab. Este consiste em um anticorpo gerado por meio da tecnologia do DNA recombinante e é composto por uma combinação de cadeias de anticorpo humano (95%) e anticorpo murino (5%). Este medicamento é direcionado contra o aminoácido 275 da glicoproteína F do VRS. (Collins *et al.*, 2001; Pedraz *et al.*, 2003).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo (F_0), o qual é clivado por proteases extracelulares semelhantes à tripsina. Os heterodímeros formados após a clivagem (F_1 e F_2) apresentam aproximadamente 50 e 20 kDa,

respectivamente, e permanecem ligados por pontes dissulfídicas (Collins *et al.*, 2001).

A cadeia F2 é formada por 139 aminoácidos e consiste no segmento mais divergente da molécula F entre os subgrupos e os genótipos de VRS A e B. É neste segmento também, que se encontra a maioria dos potenciais sítios de N-glicosilação. Na extremidade C-terminal encontra-se o possível sítio de processamento proteolítico do precursor F₀, cuja sequência de aminoácidos é KKRKRR (Lopez *et al.*, 1998).

Dentro do segmento F1, na extremidade N-terminal, encontram-se 19 contíguos aminoácidos hidrofóbicos que formam o peptídeo de fusão. Neste segmento encontra-se ainda um grupo de cisteína. A região que vai da extremidade N-terminal ao grupo de cisteínas se assemelha estruturalmente à subunidade HA2 da hemaglutinina dos vírus Influenza, por apresentar alto conteúdo de estruturas do tipo α -hélice, a presença de peptídeo de fusão e resistência à digestão por tripsina.

Esta proteína apresenta múltiplos sítios antigênicos e, apesar da pouca divergência antigênica e genética existente entre os subgrupos, foi verificada a presença de epítomos neutralizantes subgrupo-específicos. (Lopez *et al.*, 1998; Agenbach *et al.*, 2005).

1.4. IMUNOPATOLOGIA DA INFECÇÃO CAUSADA PELO VRS

As glicoproteína G e F são as principais indutoras de resposta imune protetora no hospedeiro. Anticorpos direcionados contra estas proteínas podem neutralizar a infectividade viral. No entanto, a resposta imune gerada contra a proteína F protege contra infecção por vírus de ambos os subgrupos, ou seja, ela

induz uma reatividade cruzada ou resposta heteróloga. Já a resposta induzida pela proteína G protege somente contra infecções por vírus do mesmo subgrupo (Johnson *et al.*, 1987).

A proteção e a cura da infecção causada pelo VRS são mediadas pelo sistema imune do hospedeiro, por meio de anticorpos secretados em mucosas, anticorpos séricos, linfócitos T citotóxicos e, em bebês de 0 a 6 meses, anticorpos recebidos da mãe. Crianças que apresentam algum grau de imunossupressão têm maior dificuldade de eliminar a infecção pelo VRS, levando alguns meses para isso, diferente do intervalo típico que é de uma a três semanas (McIntosh *et al.*, 1978; Fishaut *et al.*, 1980; Collins *et al.*, 2001). Em adultos imunocomprometidos, tais como, pacientes transplantados de medula óssea ou leucêmicos a incidência de infecção por VRS se eleva, havendo maior risco do desenvolvimento de doença grave e evolução à morte (Collins *et al.*, 2001).

Em bebês muito jovens, os títulos de anticorpos são baixos, isto parece ocorrer por dois motivos principais: a) presença de anticorpos maternos passados através da placenta, os quais, em modelos animais teriam atividade imunossupressora (Prince *et al.*, 1985); b) imaturidade imunológica dos bebês. (Murphy *et al.*, 1988; Collins *et al.*, 2001).

Estudos realizados tanto em modelos animais quanto em humanos, evidenciam que a presença de anticorpos neutralizantes protege contra a infecção por VRS. (Hemming *et al.*, 1985; Prince *et al.*, 1985). Um estudo feito por McIntosh *et al.* (1978), demonstrou o possível papel de anticorpos secretórios IgA na cura da doença causada pelo VRS.

No caso de resposta imune celular, em estudo feito também com modelo animal, demonstrou-se que ambos os subgrupos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são importantes na resolução da infecção primária. Os linfócitos T CD8⁺, juntamente com as células *Natural Killer* (NK) podem modular a resposta imune, mediante a secreção de linfocinas antivirais, especialmente o Interferon- γ (Domaschowske & Rosenberg, 1999).

Atuam ainda no combate à infecção, grupos de citocinas tais como, IL-6, IL-8, Fator de Necrose Tumoral – α (TNF- α), que podem ter efeito antiviral direto. As citocinas são responsáveis também pela atração e ativação de subgrupos de leucócitos como os macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T e células NK. A participação destas células na resposta imune pode atuar como desencadeadora das lesões e sintomas observados em pacientes infectados por VRS, quer seja pela ação direta às células infectadas ou por liberação de citocinas pró-inflamatórias. Como exemplo, a degradação eosinofílica libera compostos vasoativos, histamina e leucotrieno 4, que podem atuar como mediadores potenciais de broncoespasmos. Assim como a ação dos linfócitos T CD8⁺, quando de forma exacerbada, pode danificar o tecido pulmonar (Collins *et al.*, 2001).

1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS INFECÇÕES PELO VRS

O espectro da doença varia desde infecções inaparentes até complicações broncopulmonares. A infecção geralmente cursa com febre, tosse, coriza, mialgia, artralgia, cefaléia, dor de garganta e mal estar geral. Sendo que, particularmente em bebês, em mais da metade das infecções, ocorre progressão ao

trato respiratório inferior culminando com bronquiolite e pneumonia, que são as manifestações graves mais observadas (Barreira *et al.*, 2001).

Em bebês, sinais da infecção como, taquipnéia e dificuldade para respirar, geralmente aparecem um a três dias após o início da rinorréia, como consequência da propagação viral nos brônquios e bronquíolos (Domachowske & Rosenberg, 1999).

A associação de infecção viral com a exacerbação aguda de asma tem sido relatada em vários estudos clínicos e epidemiológicos. Sendo o VRS um dos patógenos que mais contribui para o desencadeamento de crises asmáticas tanto em adultos como em crianças (O'Sullivan *et al.*, 2001).

O VRS é considerado um dos principais agentes de infecção nosocomial em bebês e crianças. A infecção nosocomial pode produzir significativa morbidade em bebês e casos de infecção mais grave em pacientes de alto risco, tais como crianças com comprometimento cardíaco ou pulmonar, bem como indivíduos adultos imunocomprometidos. As manifestações de infecção nosocomial por VRS podem ser atípicas, principalmente em neonatos e pacientes imunocomprometidos, promovendo assim, atraso ou erro no diagnóstico adicionando custos a hospitalização. A propagação de infecções por VRS em unidades de saúde é feita pelo contato próximo com secreções infecciosas, geradas por aerossóis ou perdigotos e subsequente autocontaminação, sendo a equipe médica o principal instrumento de transmissão. O controle da infecção nosocomial por VRS seria mais eficaz se medidas de esclarecimento para a equipe médica sobre os modos de transmissão, as manifestações e a importância das infecções nosocomiais por VRS fossem feitas. Contudo, de início a simples lavagem das mãos, seria um importante

procedimento a ser tomado frente ao controle da infecção (Englund *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 2000; Madhi *et al.*, 2004).

Alguns pesquisadores têm associado o subgrupo viral bem como aos diferentes genótipos dentro de cada subgrupo com a gravidade da doença. Alguns autores têm referido o subgrupo A como o mais freqüentemente envolvido no desencadeamento de doença grave (Taylor *et al.*, 1990; McConnochie *et al.*, 1990; Flether *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1997; Devincenzo, 2004).

1.6. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA INFECÇÃO PELO VRS

A transmissão do VRS é feita pelo contato com pessoas próximas que estejam infectadas, especialmente por meio de aerossóis produzidos durante o espirro. Outra via de veiculação da infecção é o contato direto com secreções infecciosas presentes em superfícies e objetos contaminados tais como, bancadas, estetoscópios e vestuário. (Collins *et al.*, 2001).

A entrada do vírus no organismo se dá através da mucosa nasal ou conjuntiva. O período de incubação da doença varia de 2 a 8 dias após o contato inicial (Collins *et al.*, 2001).

O VRS se replica primeiramente no trato respiratório superior e a propagação do mesmo para vias aéreas inferiores ocorre possivelmente por dois mecanismos principais: célula a célula através do epitélio e/ou por aspiração das secreções contaminadas (Domachowske & Rosenberg, 1999).

Anualmente o VRS infecta cerca de 64 milhões de indivíduos e é responsável por aproximadamente 160.000 mortes em todo o mundo (WHO, 2006).

O vírus contribui para aproximadamente 50% de todos os casos de pneumonia e mais de 90% dos casos relatados de bronquiolite na infância (Barreira *et al.*, 2001).

O risco de complicações e de hospitalizações devido à infecção por VRS é mais elevado em crianças menores de um ano de idade e indivíduos considerados de alto risco, crianças com doença cardíaca congênita ou com displasia broncopulmonar, além de pacientes imunodeprimidos, tais como, receptores de transplante de medula óssea (CDC, 2004).

Existe um perfil sazonal bem definido das infecções por VRS em países de clima temperado, onde o pico de atividade ocorre no inverno e tem duração aproximada de 2 a 5 meses (Chan *et al.*, 2002). Entretanto, em regiões de clima tropical a maior incidência dos casos esta associada a fatores diversos, tais como, maior pluviosidade, aumento de temperatura, baixa umidade relativa do ar e em regiões subtropicais a atividade do VRS é mais freqüente nos meses mais frios do ano (Siqueira *et al.*, 1991; Chew *et al.*, 1998; Strallio *et al.*, 2001; Checon *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2003).

Investigação conduzida em Singapura, com base em um levantamento retrospectivo de resultados laboratoriais de detecção viral em dois hospitais gerais, demonstrou o VRS como o principal patógeno associado às infecções respiratórias e o pico de atividade viral esteve relacionado à elevação da temperatura ambiente (Chew *et al.*, 1998).

Outras regiões de clima tropical como, Papua Nova Guiné, Malásia, Brasil, Colômbia e Havaí, revelam a associação de VRS a períodos chuvosos (Bedoya *et al.*, 1996; Moura *et al.*, 2003; Shek *et al.*, 2003).

O Brasil apresenta uma grande variabilidade climática nas cinco regiões geográficas que o compõem, o que gera implicações no comportamento sazonal do VRS nestas regiões. Neste contexto, maior atividade viral tem sido observada nos meses mais chuvosos ou frios bem como durante as trocas de estação (Siqueira *et al.*, 1991; Mello & Silva, 1992; Straliozzo *et al.*, 2001; Checon *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2003).

Na Região Sul, a atividade de VRS possui um padrão dependente das quedas de temperatura, assim como ocorre em alguns países do cone sul como Chile, Uruguai e Argentina (Straliozzo *et al.*, 2001). Em estados da Região Sudeste, análises realizadas em São Paulo e Rio de Janeiro não associaram maior atividade do vírus a períodos chuvosos ou nos meses frios. Relatando a ocorrência de VRS em 10 dos 12 meses do período investigado, com a maioria dos casos sendo registrados no final do verão (Siqueira *et al.*, 1991; Checon *et al.*, 2002).

Na Região Nordeste, o pico de atividade viral está associado ao período de maior pluviosidade (Moura *et al.*, 2003). Achados semelhantes também são descritos por Mello *et al.* (1992) na Região Norte do País.

A circulação dos subgrupos de VRS A e B pode ocorrer concomitantemente ou alternadamente durante as epidemias anuais. Geralmente as infecções pelo subgrupo A são mais prevalentes, entretanto os dois subgrupos podem apresentar padrões de frequências similares (Mufson *et al.*, 1988; Hendry *et al.*, 1989). A circulação de variantes distintas de um mesmo subgrupo também pode ser observada com a substituição dessas variantes a cada nova epidemia (Mufson *et al.*, 1988; Hendry *et al.*, 1989; Mufson *et al.*, 1996; Peret *et al.*, 1998; Choi & Lee, 2000; Seki *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001).

Estudo conduzido por Choi & Lee (2000) no Japão, analisando espécimes clínicos de crianças hospitalizadas evidenciou, através do diagnóstico empregando técnicas moleculares, a predominância do subgrupo A em nove epidemias consecutivas. Descreveu ainda a circulação de diferentes cepas dentro dos subgrupos A e B. Venter *et al* (2001) relata durante quatro epidemias consecutivas na África do Sul, a predominância do subgrupo A em duas epidemias e a co-circulação equivalente de A e B em surtos subsequentes. Foram identificadas ainda, quatro e cinco variantes do subgrupo A e B, respectivamente.

No Brasil, em estudo conduzido por Siqueira *et al.* (1991) no Rio de Janeiro utilizando técnicas de detecção viral através de imunofluorescência, com amostras clínicas de crianças menores de 5 anos de idade, registrou que a prevalência dos subgrupos A e B variaram durante os sete anos de avaliação. Esta pesquisa, também demonstra a existência de cepas antigenicamente variáveis dentro de cada subgrupo. Investigações realizadas em Moçambique, Índia e Tunísia, verificaram através de ensaios de imunofluorescência e técnicas de biologia molecular, a predominância do subgrupo B (Rocca *et al.*, 2001; Rajala *et al.*, 2003; Fodha *et al.*, 2004).

Relatos em países da América Central e Sul também demonstram a predominância de um ou outro subgrupo, A e B, ao longo dos anos (Avendaño *et al.*, 2003; Arbiza *et al.*, 2005; Galiano *et al.*, 2005).

No Brasil, algumas investigações foram conduzidas para averiguar a circulação dos subgrupos A e B. Na Região Sul, um estudo prospectivo realizado durante sete anos, utilizando anticorpos monoclonais, evidenciou padrões de circulação distintos dos subgrupos virais, na maioria dos anos do estudo houve

circulação similar de ambos os subgrupos e em um dos anos estudados o subgrupo A foi predominante (Stralioetto *et al.*, 2001).

Moura *et al.* em investigação conduzida na Região Nordeste, utilizando imunofluorescência para detecção de antígeno viral, em secreções respiratórias de crianças atendidas a nível ambulatorial, demonstrou a predominância do subgrupo A durante o ano de 1998 (Moura *et al.*, 2003).

Na Região Norte, em investigação realizada por Mello & Silva em amostras de crianças da cidade de Belém, de 1982 a 1988 e de 1990 a 1992, utilizando imunofluorescência indireta, foi demonstrada a predominância do subgrupo A em cinco dos 9 anos de estudo, observou-se também a co-circulação dos subgrupos em determinados anos e a predominância do subgrupo B foi evidenciada nos anos 1982 e 1983.

1.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da infecção pelo VRS é dificultado pela similaridade dos sintomas presentes em todas as infecções respiratórias, como as ocasionadas pelos vírus parainfluenza, influenza e metapneumovírus (Gottshalk, 1996; Alto, 2004), fazendo-se necessária a utilização do diagnóstico laboratorial. Para realização de um diagnóstico preciso e eficaz, as etapas de coleta, transporte e armazenamento dos espécimes clínicos são essenciais. No caso de infecção respiratória aguda, o espécime deve ser coletado até cinco dias após o início dos sintomas e ser encaminhado ao laboratório sob refrigeração (4°C) [OMS & OPAS, 2005].

As técnicas laboratoriais de diagnósticos disponíveis envolvem detecção de antígeno viral, através do teste de imunofluorescência indireta, isolamento do vírus em cultivo celular seguido de caracterização antigênica com anticorpos monoclonais (Freymuth *et al.*, 1995; Gottshalk, 1996; Hu *et al.*, 2003). O isolamento do vírus em cultivo celular consiste no procedimento padrão ouro para detecção de vírus infecciosos.

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, como Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento de nucleotídeos, novas ferramentas estão sendo utilizadas na detecção e caracterização dos patógenos associados aos casos de IRA. Estas técnicas propiciam também, o estudo da diversidade genética desses vírus (Gottshalk, 1996; Hu *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

A cada ano, milhares de pessoas são acometidas por infecções respiratórias causadas por VRS em todo o mundo. Embora a vulnerabilidade da população a esse patógeno possa estar relacionada ao hospedeiro, esta pode também ser favorecida pela diversidade antigênica e genética que o mesmo apresenta. Tal diversidade pode ainda ser relevante para o desenvolvimento de drogas antivirais e vacinas contra o VRS. Como no Brasil são restritos os trabalhos publicados sobre sua caracterização genética, torna-se necessária a realização de estudos que avaliem não somente a diversidade genética do VRS, mas também descrevam dados sobre a sazonalidade da doença em regiões tropicais, além da caracterização clínica da mesma durante epidemias ou mesmo em períodos interepidêmicos. Por meio desse estudo, pretende-se gerar informações sobre a epidemiologia molecular que contribuirão para melhorar o sistema de vigilância epidemiológica da infecção pelo VRS, bem como prover informações relevantes para o desenvolvimento de possíveis modelos candidatos a vacinas e novas estratégias de prevenção e controle das infecções por VRS.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar, através de técnicas de biologia molecular, as cepas de vírus respiratório sincicial (VRS) isoladas de casos de infecção respiratória aguda, na cidade de Belém-Pará, no período de janeiro de 2000 a maio de 2006.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar qual o subgrupo de VRS mais frequentemente envolvido em casos de IRA na cidade de Belém.
- Descrever a sazonalidade da infecção por VRS na cidade de Belém.
- Caracterizar a variabilidade genética dos VRS através da análise filogenética dos genes codificadores das glicoproteínas F e G.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

Durante o período de janeiro de 2000 a maio de 2006, o VRS foi detectado, por imunofluorescência indireta e/ou cultivo celular, em 153 amostras oriundas do Sistema de Vigilância Viroológica da Rede Influenza, do Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Evandro Chagas (LVR-IEC). As amostras obtidas dentro da Rede de Vigilância consistem em aspirado da nasofaringe ou swab combinado narina/garganta colhidos rotineiramente de pacientes que buscam atendimento e que apresentam sinais e sintomas de IRA com até cinco dias de evolução. Tais pacientes foram atendidos ambulatorialmente em três entidades de saúde na Cidade de Belém, Pará, Brasil: Posto de saúde da Universidade Estadual do Pará (UEPA), Unidade de Saúde Vila da Barca no bairro da Sacramento e Unidade de Saúde Eduardo Angelim em Icoaraci, além de pacientes atendidos no Serviço de Virologia Geral (SEVIR) do Instituto Evandro Chagas.

4.2. PROPAGAÇÃO DO VÍRUS EM CULTIVO CELULAR

4.2.1. Re-inoculação das amostras

Com a finalidade de ser feito o subgrupamento por teste de imunofluorescência indireta (IFI) dos vírus previamente isolados e estocados no LVR-IEC, foi feita uma nova passagem em células HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana). Para tal procedimento executou-se o seguinte protocolo: em

cada tubo contendo monocamada de células HEp-2 de um dia foi inoculada uma alíquota de 300 µL de fluido contendo o vírus, os tubos foram então incubados a 37°C durante 30 minutos, para que ocorresse a adsorção do vírus à célula. Em seguida foi acrescentado um mL de Meio mínimo essencial (MEM) de manutenção suplementado com soro bovino fetal 2%, L-Glutamina 1%, solução de estreptomicina e penicilina a 1% e bicarbonato de sódio 2%. Os tubos foram então incubados a 37°C durante 12 dias ou até que apresentassem 70 a 75% de efeito citopático (ECP). Após a constatação do ECP, as amostras de células ou sobrenadante foram colhidas e centrifugadas por 10 min a 1300 rpm, a partir do sedimento gerado foram montadas lâminas para realização dos testes de IFI e o sobrenadante foi estocado em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA viral.

4.3. SUBGRUPAMENTO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA

O subgrupamento de VRS foi feito a partir dos vírus isolados em cultivo celular, por meio de teste de IFI, utilizando os anticorpos monoclonais *Respiratory Syncytial Virus Strain Long Clone 92-11C* e *Respiratory Syncytial Virus Strain 18537 Clone 102-10B*, gentilmente cedidos pelo Dr. Larry Anderson do Center for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, EUA) específicos para glicoproteína F de cada subgrupo, A e B. Adicionalmente foram utilizados anticorpos monoclonais para os vírus Parainfluenza 1, 2 e 3, e para Adenovírus (LIGHT DIAGNOSTICS™ Respiratory Panel I Viral Screening and Identification IFA), uma vez que as células utilizadas para o isolamento são também sensíveis a propagação destes vírus.

Para realização do teste, em cada orifício da lâmina foram colocados 20µL de anticorpo monoclonal específico. As lâminas foram então incubadas em estufa a 37°C por 30 min. Após este período as lâminas foram submetidas a três lavagens com PBS pH 7.2 por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Adicionou-se o conjugado (IgG anti-IgG de origem murina e isotiocianato de fluoresceína - LIGHT DIAGNOSTICS™ Respiratory Panel I Viral Screening and Identification IFA) e seguiu-se nova incubação a 37°C 30 min. Posteriormente as lâminas foram lavadas em PBS pH 7.2 por 5 min. As lâminas foram então secas e cobertas com fluido de montagem (LIGHT DIAGNOSTICS™ Respiratory Panel I Viral Screening and Identification IFA) e recoberta com lamínula. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência, com luz de halogênio, no aumento de 400x (DMLB, Leica Microsystems GmbH).

4.4. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

A caracterização genética dos vírus foi desenvolvida utilizando-se três etapas principais: a) extração do RNA viral (RNAv); b) amplificação do RNAv pela técnica de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR); e c) sequenciamento parcial do genoma viral.

4.4.1. Extração do RNA viral (RNAv)

O RNAv foi extraído a partir do sobrenadante de cultura contendo vírus. Nas amostras em que não foi possível o isolamento viral, o espécime clínico serviu como fonte de RNAv. Para obtenção do RNAv utilizou-se o QIAamp® Viral RNA Mini

Kit (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. O método consiste em três principais etapas: extração, lavagem e eluição, e baseia-se na capacidade que a sílica tem de formar ligação com o RNAv em meios com alta concentração de sal combinada à centrifugação em alta velocidade (8.000 a 14.000 rpm). O procedimento consistiu em adicionar 140µL de amostra a 560 µL de tampão de lise (AVL) suplementado com RNA carreador. A solução foi agitada por 15 segundos e incubada a temperatura ambiente (TA) durante 10 minutos, para que ocorresse a completa lise das partículas virais e liberação do ácido nucléico. Em seguida foram adicionados 560 µL de etanol absoluto (96-100%), a solução foi homogeneizada por agitação durante 15 segundos. Cuidadosamente foram transferidos 630µL da solução contendo amostra, tampão AVL e etanol, para colunas com membrana contendo sílica, acopladas a tubos coletores. As amostras foram então centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto a TA, sendo os tubos coletores descartados e a coluna com membrana de sílica foi acoplada a um novo tubo coletor, processo este que foi repetido a cada nova centrifugação. Adicionou-se o restante da solução à coluna e centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto a TA. Posteriormente, 500 µL de tampão de precipitação (AW1) foram adicionados à coluna, seguindo-se de uma centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto a TA. Em seguida 500µL do tampão de lavagem (AW2), foram colocados na coluna e as amostras submetidas à centrifugação 14.000 rpm por 3 minutos a TA, após descarte do filtrado, as colunas foram submetidas à nova centrifugação 14.000 rpm durante 1 minuto, visando a eliminação de qualquer traço de etanol, haja vista que tal reagente pode interferir na amplificação do RNA. As colunas foram então transferidas para tubos de 1,5 mL estéreis devidamente rotulados, adicionou-se o volume de 60 µL de tampão de eluição (AVE) no centro da membrana, seguindo-se uma incubação durante 1 minuto, este processo visa a

quebra da ligação entre a sílica e o RNAv. Após a incubação procedeu-se centrifugação 8.000 rpm durante 1 minuto a TA. O RNA eluído foi estocado a -70°C para testes posteriores.

4.4.2. Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR)

A técnica de RT-PCR em um único tubo foi realizada utilizando-se o kit comercial SuperScript™ One-step RT-PCR with Platinum Taq®- (Invitrogen Life Technologies). As reações de RT-PCR foram feitas para um volume final de 25µL contendo, 5 µL de RNAv, 0,2µL de cada oligonucleotídeo iniciador (50 pmol/µL) [Quadro 1], 12,5µL de tampão de reação 2X (contendo 0,4mM de cada dNTP, 2,4mM de MgSO₄), 0,12 µL inibidor de ribonuclease 40U/µL (RNAsine Inhibitor, Promega) e 0,5µL de mix RT/Taq (SuperScript™ RT/Platinum Taq). Cada conjunto de amostras submetido à amplificação foi acompanhado de um controle negativo, o qual continha todos os reagentes da mistura e água livre de RNase.

Quadro 1- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos genes F e G do VRS.

Subgrupo	Gene	Iniciador	Sequência dos oligonucleotídeos	Tamanho dos amplicons
A	F	RSVFA3	5'TTATACACTCAATRCCAAAAWACC 3'	363 pb
		RSVFA4	5' AAATTCCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT 3'	
B	F	RSVFB3	5' ATCTTCCTAACTCTTGCTRTTAATGCATT 3'	611 pb
		RSVFB4	5' GATGCGACAGCTCTGTTGATTTACTAT 3'	
A	G	GA/+1	5'GCAAACATGTCCAAAAACAAG 3'	1131 pb
		FAB/-/1116	5'GTTATGACACTGGTATAACCAACC 3'	
B	G	GB/+1	5'GCAACCATGTCCAAACACAAG 3'	1116 pb
		FAB/-/1116	5'GTTATGACACTGGTATAACCAACC 3'	

→ R=A ou G; W=A ou T

4.4.2.1. Amplificação do gene F

A amplificação dos segmentos do gene F foi realizada inicialmente submetendo a mistura de reação a 42°C por 45 minutos, 55°C por 15 minutos e 94°C 5 minutos. Esta etapa foi seguida por 30 ciclos de PCR cada um composto por etapas de desnaturação 94° por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 30 segundos. A reação foi completada com 1 ciclo de extensão final a 72°C durante 10 minutos. Todas as etapas de RT-PCR foram realizadas em termociclador automático *Master Cycler* (Eppendorf, Birkmann Instrument)

4.4.2.2. Amplificação gene G

Para amplificação do segmento do gene G, a mistura de reação foi inicialmente incubada a 42°C por 45 minutos, 55°C por 15 minutos e 94°C 5 minutos. Seguido de 30 ciclos de PCR cada um composto por etapas de desnaturação 94° por 45 segundos, hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. A etapa de extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos. Sendo as etapas de RT-PCR realizadas em termociclador automático *Master Cycler* (Eppendorf, Birkmann Instrument)

4.4.3. Eletroforese em gel de agarose

Ao término da amplificação os produtos da RT-PCR foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% corado por brometo de etídio (BET), utilizando cuba para eletroforese convencional (Biorad). O gel de agarose foi preparado pesando-se 0,9 g de agarose em pó (Gibco-BRL) e acrescentando 60mL de TAE 1 X(Tris acetato EDTA). A agarose foi dissolvida por aquecimento durante 2 minutos em forno microondas, após o resfriamento, foram adicionados 3 µL de brometo de etídio (10mg/mL). Em seguida os produtos amplificados foram submetidos à migração no gel, junto com o marcador de peso molecular 200 lines SmartLadder (EUROGENTEC), inicialmente por 5 minutos 80 volts (V), seguido de 25 minutos a 110V. A visualização dos amplicons impregnados pelo BET foi feita em transiluminador com luz UV e fotografado com auxílio do sistema Gel Doc 1000 (BioRad).

4.4.4. Purificação do produto da RT-PCR

Nas amostras que apresentaram o amplicon específico, foi realizada a purificação do produto da RT-PCR, utilizando o kit comercial QIAquick PCR Purification (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, em um microtubo de 0,5mL foi colocado o produto de RT-PCR e acrescentado 5x do volume de tampão PB, seguiu-se agitação por 15 segundos. Em seguida a mistura foi passada para coluna com membrana contendo sílica acoplada ao tubo coletor, incubada a TA por 2 minutos e centrifugada 1 minuto a 14.000 rpm. O filtrado foi descartado e adicionaram-se 750 µL de tampão de lavagem (PE), incubou-se por 1 minuto e foi feita uma nova centrifugação a 14.000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente o filtrado foi desprezado e a coluna foi submetida à centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos. O tubo coletor foi descartado e a coluna foi encaixada em microtubo de 1,5 mL devidamente identificado, acrescentaram-se 30 µL de tampão de eluição (EB) em cada coluna. Após incubação por 1 minuto as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto. O produto eluído foi então quantificado e armazenado a -20° C.

4.4.5. Quantificação do DNA

A quantificação para a determinação da concentração de DNA no produto purificado foi realizada seguindo instruções do fabricante do marcador de peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen – Life Technologies). Resumidamente, o processo consistiu em uma eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% das amostras previamente purificadas. Posteriormente o gel foi visualizado em

transiluminador com luz UV e fotografado em aparelho de fotodocumentação (*Gel Doc 1000* - BioRad). A concentração de cada amostra foi determinada comparando-se a intensidade das bandas do marcador com a banda das amostras, sendo o resultado expresso em nanogramas (ng).

4.4.6. Reação de sequenciamento

Para reação de sequenciamento foi utilizado o Kit Big Dye® terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystem – Life Technologies). Foram preparadas misturas de reação com volume final de 10 μL , composta por 2 μL de Big Dye, 1 μL de tampão, entre 4 μL de DNA (50ng) e de 0,5 μM de oligonucleotídeos específicos (Quadro 2). Esta mistura foi processada em termociclador automático (*Master Cycler*, Eppendorf, Birkmann Instrument) onde foi executado um ciclo a 94°C por 2 min, seguido de 25 ciclos cada um composto por 94°C 45 segundos, 50°C 30 segundos e 60°C 4 minutos.

Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de sequenciamento dos genes F e G do VRS.

<i>Subgrupo</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligonucleotídeos</i>	<i>Sequência dos oligonucleotídeos</i>
A	F	RSVFA3	5'TTATACACTCAATRCCAAAAWACC 3'
A	F	RSVFA4	5" AAATTCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT 3'
B	F	RSVFB3	5'ATCTTCCTAACTCTTGCTRTTAATGCATT 3'
B	F	RSVFB4	5'GATGCGACAGCTCTGTTGATTTACTAT 3'
A	G	GA/+1	5'GCAAACATGTCCAAAAACAAG 3'
B	G	GB/+1	5'GCAACCATGTCCAAACACAAG 3'
AB	G	FAB/-1116	5'GTTATGACACTGGTATACCAACC 3'
A	G	GA/-258	5'CTTGATCTGGCTTGTTGCATC 3'
A	G	GA/+520	5'TACCCTGCAGCATATGCAGC 3'
A	G	GA/-834	5'GCTTGGATTGCCTTCGGAGG 3'
B	G	GB/+520	5'GTTCCCTGTAGTATATGTGGC 3'
B	G	GB/-870	5'ATGTGGAGGGCTCGGATGC 3'

4.4.7. Precipitação do produto da reação de sequenciamento

Após a reação de sequenciamento as amostras foram submetidas à precipitação com isopropanol e etanol, com finalidade de retirar o excesso de nucleotídeos marcados não incorporados na reação de seqüenciamento. Foram adicionados 80µL de isopropanol 80% ao produto da reação, incubou-se por 15 minutos a TA. Em seguida, foi realizada centrifugação a 14.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 200 µL de etanol 70%, seguiu-se centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi

desprezado e o sedimento novamente lavado com etanol 70%, sendo feita nova centrifugação como descrito anteriormente. Após o descarte do sobrenadante o sedimento foi seco em concentrador a vácuo (Concentrator 5031, Eppendorf, Germany) e ressuspensão em 15 µL de formamida.

4.4.8. Eletroforese em sequenciador automático

A eletroforese foi feita em sequenciador automático ABIPrism 3100 (Applied Biosystem), baseada no método de terminação de cadeia por dideoxirribonucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes, que ao contato com raios laser, emitem fluorescência de diferentes comprimentos de ondas correspondentes a cada um dos quatro nucleotídeos que compõem basicamente a molécula de DNA (A, C, T, G) localizados na extremidade 3' (Sanger *et al.*, 1977). Após ressuspensas em formamida, as amostras foram aplicadas em placas de 96 orifícios, submetidas à desnaturação por 95°C durante 5 minutos e em seguida colocadas em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foram colocadas no seqüenciador automático.

4.4.9. Alinhamento, edição das sequências e construção da árvore filogenética.

As sequências nucleotídicas obtidas a partir dos produtos de RT-PCR dos genes G e F referentes ao VRS foram analisadas e editadas utilizando-se o programa BioEdit v 7.0, e comparadas com sequências de outros vírus isolados e disponíveis no banco de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando os programas Clustal W v 1.7 (Thompson *et al.*, 1994) e Mega 3.1 (Kumar *et al.*,

2004). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos (NJ; *neighbor joining*), implementado no programa Mega v 3.1. A matriz de distância no método de NJ foi calculada a partir das sequências alinhadas usando a fórmula de dois parâmetros de Kimura (Kimura, 1980) A análise de bootstrap usando 2000 replicons foi utilizada para gerar maior confiança aos valores dos grupamentos (Felsenstein, 1985).

5. RESULTADOS

5.1. DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POR FAIXA ETÁRIA

No período de janeiro de 2000 a maio de 2006, o VRS foi detectado, quer seja por imunofluorescência e/ou cultivo celular, em 153 amostras de pacientes com infecção respiratória aguda, atendidos em postos ambulatoriais na cidade de Belém, Pará.

A distribuição por grupo etário demonstra que a faixa etária de 0 a 4 anos foi a que concentrou a maioria dos casos diagnosticados para VRS durante o período estudado (n=138, 90,19%) [Quadro 3].

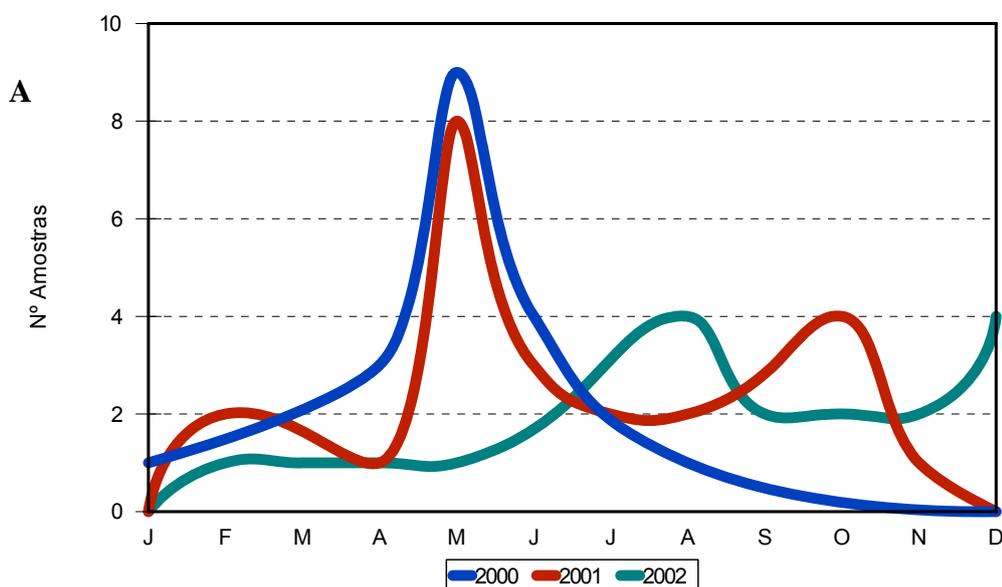
Quadro 3 - Distribuição por faixa etária de amostras positivas para VRS, detectados por imunofluorescência e/ou cultivo celular.

Faixa Etária (Anos)	Nº de espécimes positivos para VRS por ano*							Total
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	
0-4	16	20	15	38	26	2	21	138
5-14	1		1	2			1	5
15-24			2	1				3
25-59	1	3		1	1		1	7
>60								
Total	18(12)	23(15,33)	18(12)	42(28)	27(18)	2(2,25)	23(14,66)	153
(%)								(100)

* Imunofluorescência e/ou cultivo celular

5.2. DISTRIBUIÇÃO SAZONAL

Em relação à distribuição sazonal dos casos de infecção pelo VRS, foi observada maior atividade deste agente nos primeiros seis meses do ano. Nos anos de 2000, 2001, 2003 e 2004 a atividade do VRS foi mais marcante nos meses de abril e maio. Já em 2002 os casos de infecção por VRS ocorreram durante o ano todo com um ligeiro aumento em agosto. No ano de 2005 o vírus demonstrou pouca atividade não estando relacionado a surto. E em 2006 a elevação dos casos de infecção respiratória associada a este patógeno ocorreu nos meses de fevereiro e março (Figura 6).



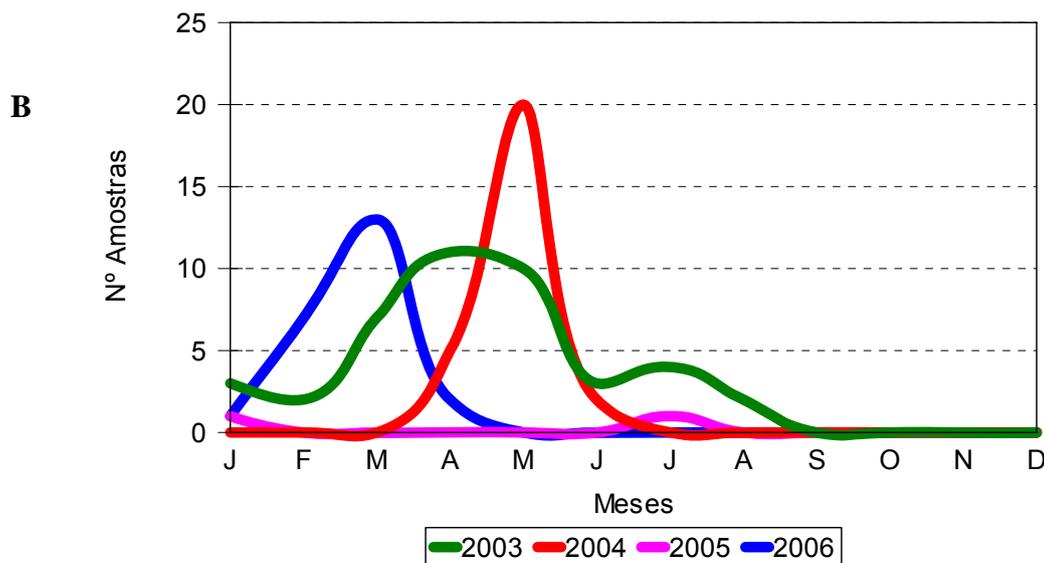
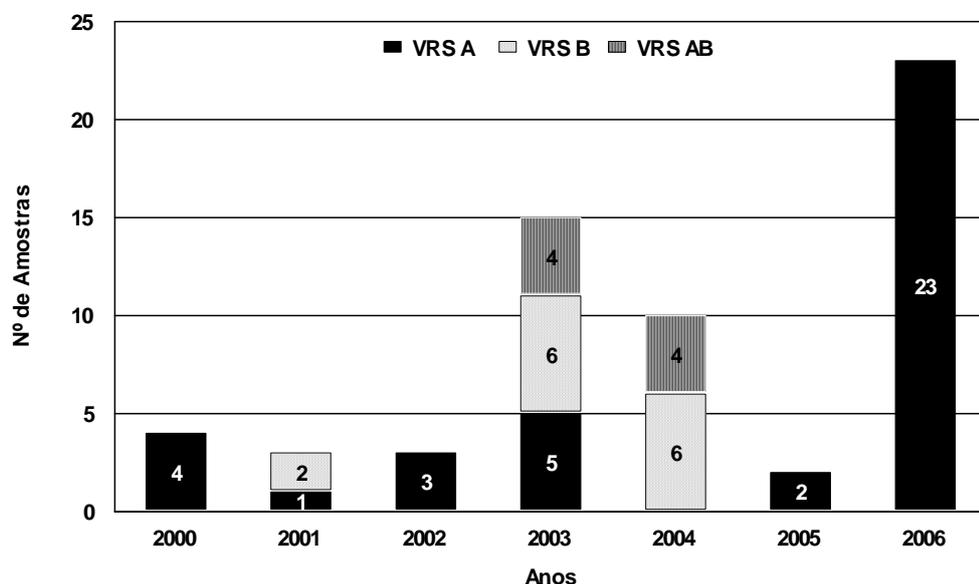


Figura 6: Distribuição sazonal dos casos de VRS nos anos de 2000 a 2006. **A.** casos de VRS de 2000-2002. **B.** Casos de VRS de 2003-2006

5.3. SUBGRUPAMENTO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

As 60 amostras em que foi possível a recuperação do vírus após a re-inoculação em células HEP-2 foram submetidas ao subgrupamento pela IFI utilizando os anticorpos monoclonais. Das 18 amostras de 2000, quatro amostras foram subgrupadas, sendo estas identificadas como VRS A. As três amostras de 2001 testadas por imunofluorescência, uma foi do subgrupo A e duas do subgrupo B. Em 2002 as três amostras testadas foram do subgrupo A. No ano de 2003 foram 15 amostras testadas por imunofluorescência, sendo que cinco (5/15; 33,33%) foram identificadas como VRS do subgrupo A, seis (6/15; 40%) do subgrupo B e quatro (4/15; 26,66%) reagiram com ambos os soros (A e B). Já em 2004, das 10 amostras subgrupadas, seis foram do subgrupo B e quatro reagiram com ambos os anticorpos monoclonais. Em 2005 as duas amostras isoladas foram caracterizadas como sendo

do subgrupo A e em 2006 todas as 23 amostras testadas também pertenciam ao subgrupo A (Figura 7).



Fonte: IEC/SVS/MS

Figura 7: Distribuição por ano das amostras subgrupadas através de IFI com anticorpos monoclonais específicos.

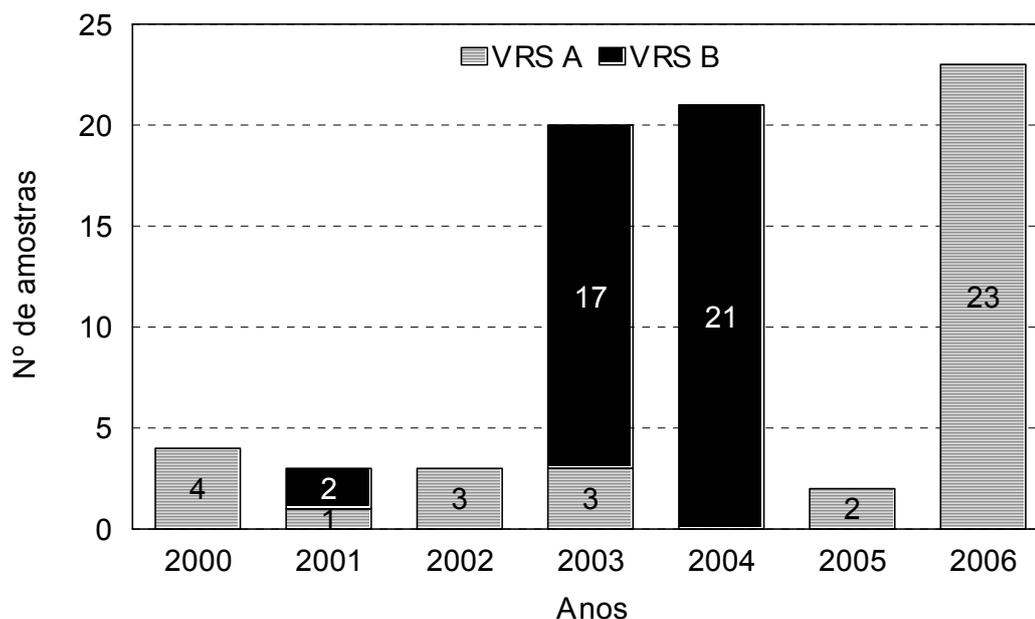
5.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As 60 amostras caracterizadas antígenicamente, bem como 16 amostras em que não foi possível o re-isolamento viral, sendo duas oriundas do espécime clínico original e 14 de passagem em células original, foram analisadas por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes codificadores das proteínas F e G (Quadro 4).

Quadro 4 - Consolidado das amostras testadas pela RT-PCR

Ano	Amostras Re-isoladas	Amostras originais (Espécime/Isolado original)	Amostras testadas e positivas por RT-PCR
2000	4	0	4
2001	3	0	3
2002	3	0	3
2003	15	5	20
2004	10	11	21
2005	2	0	2
2006	0	23	23
Total	37	39	76

Do ano de 2000 foram quatro amostras testadas, todas do subgrupo A. De 2001, das três amostras caracterizadas geneticamente, uma foi do subgrupo A e duas do subgrupo B. As três amostras de 2002 testadas foram do subgrupo A. De 2003, 20 amostras foram analisadas, sendo três do subgrupo A e 17 do subgrupo B, as 21 amostras analisadas de 2004 foram do subgrupo B. Em 2005 duas amostras foram caracterizadas geneticamente como subgrupo A e em 2006 todas as 23 amostras foram geneticamente caracterizadas como subgrupo A (Figura 8).



Fonte: IEC/SVS/MS

Figura 8: Distribuição por subgrupo viral das amostras testadas por RT-PCR.

5.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA

5.5.1. GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA G

O sequenciamento parcial do gene codificador da proteína G foi feito a partir de 22 cepas selecionadas aleatoriamente, sendo três de 2000, três de 2001, uma de 2002, seis de 2003, quatro de 2004, uma de 2005 e quatro de 2006.

A análise filogenética das mesmas evidenciou que as cepas circulantes do subgrupo A apresentavam dois genótipos distintos denominados GA2 e GA5. As amostras analisadas em 2000 formaram um grupamento a parte dentro do genótipo GA5. Em 2001 a amostra analisada relacionou-se geneticamente a amostras isoladas na Argentina nos anos de 97 e 99, agrupadas dentro do genótipo GA5. A amostra de 2002 caracterizada geneticamente relacionou-se a uma amostra isolada

na Argentina em 2003, agrupando-se no genótipo GA2. Em 2003 as amostras analisadas agruparam dentro do genótipo GA2, contudo os vírus isolados em Belém não se agrupam geneticamente com outras cepas isoladas no mesmo ano na Argentina. A amostra de 2005 formou juntamente com uma amostra de 2006, um *cluster* distinto dentro do genótipo GA5. As demais amostras de 2006 agruparam-se em um grupo separado dentro do genótipo GA2 (Figura 9).

Quanto às amostras do subgrupo B a análise das sequências evidenciou a circulação de dois genótipos distintos denominados SAB1 e SAB3. As amostras analisadas de 2001 agruparam separadamente dentro do genótipo SAB1. Em 2003 verificou-se a co-circulação dos genótipos SAB1 e SAB3, sendo o último predominante, e em ambos as amostras formaram *cluster* distintos. Curiosamente, no ano de 2004, apenas uma amostra se assemelhou às cepas do genótipo SAB3 as três amostras restantes formaram um *cluster* completamente distinto dos demais genótipos caracterizados anteriormente em outras regiões. Este *cluster* foi inicialmente denominado como BRB1 (Figura 10).

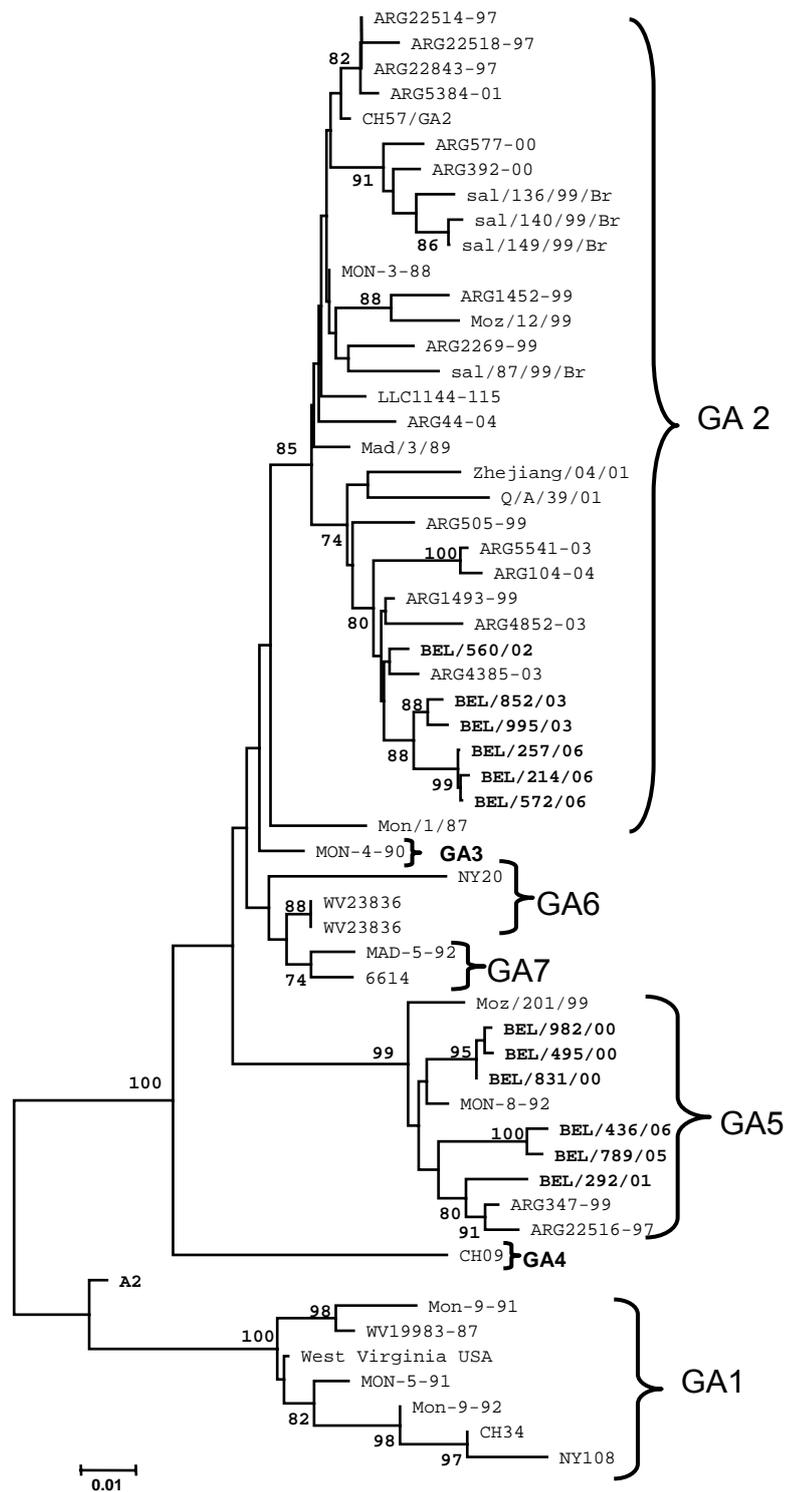


Figura 9: Árvore Filogenética da sequência parcial do gene codificador da proteína G dos VRS subgrupo. Os nucleotídeos 89 a 808 do gene G foram usados para a análise filogenética. Valores de Bootstrap (X2000) foram dados para os nós selecionados.

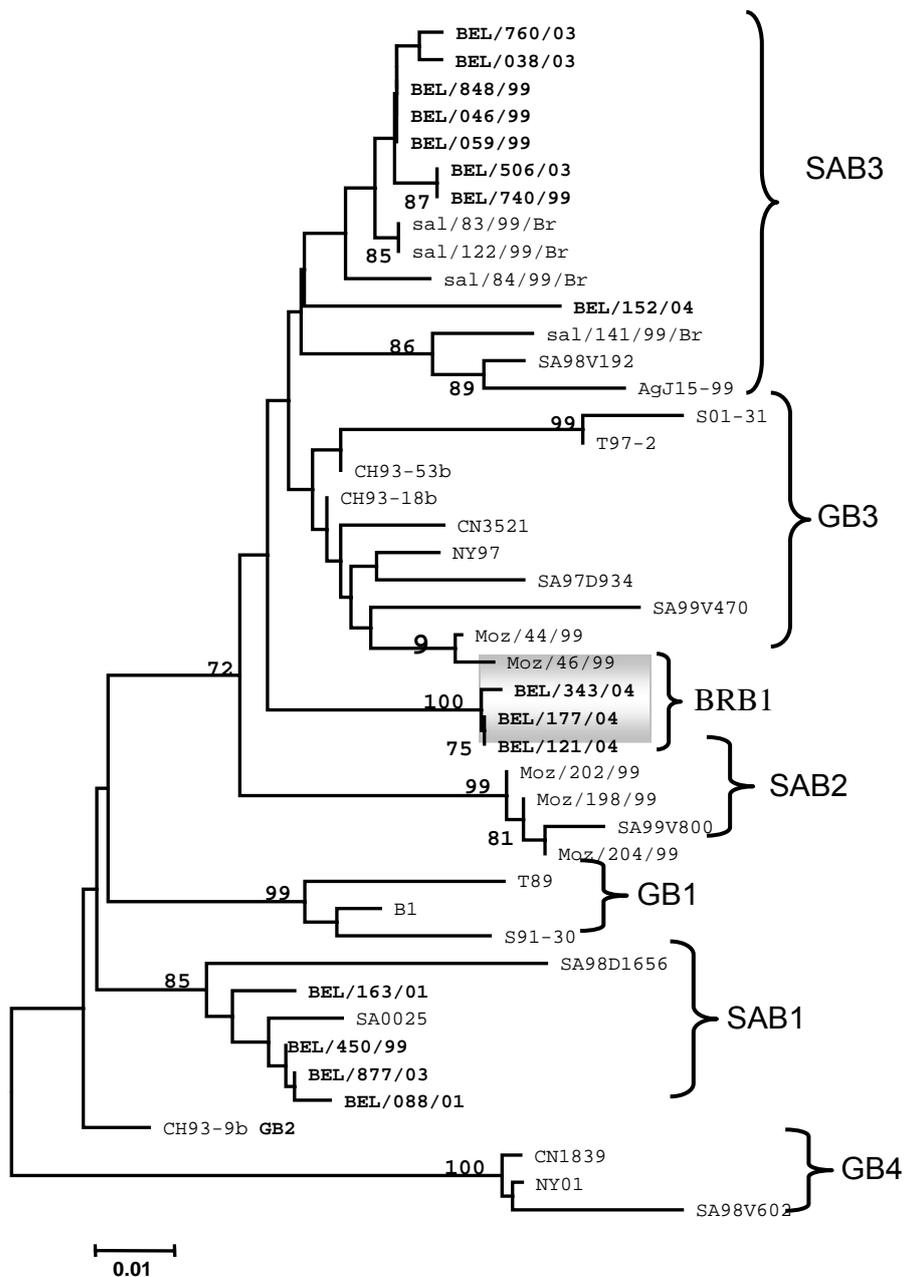


Figura 10: Árvore Filogenética da sequência parcial do gene codificador da proteína G dos VRS do subgrupo B. Os nucleotídeos de 550 a 921 do gene G foram usados para a análise filogenética. Valores de Bootstrap (X2000) foram dados para os nós selecionados.

5.5.2. GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA F

Para a análise do gene codificador da proteína F, foi construída uma tabela de similaridade, a partir de sequências parciais do gene codificador desta proteína utilizando cepas protótipos A2 e B1, para os subgrupos A e B, respectivamente (Quadros 5 e 6).

Foram inseridas na análise 21 amostras isoladas, sendo quatro de 2000 todas do subgrupo A, duas de 2001 ambas do subgrupo B, três de 2002 todas pertencentes ao subgrupo A, cinco de 2003 sendo duas do subgrupo A e três do B, cinco de 2004 do subgrupo B e duas de 2006 do subgrupo A.

Os fragmentos analisados foram de 346 nt (nucleotídeos de 355-701) e 587 nt (nucleotídeos 43-630) para as amostras dos subgrupos A e B, respectivamente.

A comparação das amostras do subgrupo A com a cepa protótipo A2 revelou similaridade variando de 81,2%-97,4%. Dentre as cepas do subgrupo B o índice de similaridade, comparado com a cepa protótipo B1, variou de 88,7%-98,9% ao nível de sequência nucleotídica.

As transições foram mais freqüentes que transversões em ambos os subgrupos, sendo as transições T↔C as mutações pontuais mais freqüentes (Quadros 5 e 6).

Um maior número de trocas de aminoácido foi observado em amostras do subgrupo B, tendo estas sido ocasionadas principalmente por transições T↔C.

No que concerne às trocas aminoacídicas no subgrupo A, diferente do que foi observado para o subgrupo B, estas trocas estiveram mais associadas às transições $G \leftrightarrow A$ (Quadro 5)

Quadro 5 - Similaridade para o gene F das amostras do subgrupo A em relação à cepa protótipo A2. Posições de nucleotídeos com mutações

Similaridade (%)		Posições de nucleotídeos e mutações																				
Amostras	Cepa	364	385	454	459	465	468	498	513	546	549	555	582	600	606	607	615	617	648	651	666	
	A2	G	T	G	T	T	G	G	A	A	T	T	C	T	A	T	T	T	T	A	G	
BEL/495/00	97,4	A	T	A	T	C	A	A	A	A	T	T	C	T	G	T	T	T	C	T	A	
BEL/659/00	96,8	A	G	A	T	C	G	A	G	A	T	T	C	T	G	T	C	T	C	T	G	
BEL/831/00	97,4	A	T	A	T	C	A	A	A	A	T	T	C	T	G	T	T	T	C	T	A	
BEL/982/00	97,4	A	T	A	T	C	A	A	A	A	T	T	C	T	G	T	T	T	C	T	A	
BEL/292/01	82,9	A	T	A	C	T	A	A	A	A	T	T	C	T	G	T	T	T	C	T	G	
BEL/560/02	96,5	A	T	A	C	C	A	A	A	A	T	T	C	T	T	G	T	T	T	C	T	G
BEL/603/02	96,2	A	T	A	C	C	A	A	A	A	C	C	T	T	G	T	T	T	C	T	G	
BEL/604/02	96,2	A	T	A	C	C	A	A	A	A	C	C	T	T	G	T	T	T	C	T	G	
BEL/995/03	90,4	A	T	A	C	C	A	A	A	A	C	C	T	T	G	T	T	T	C	T	G	
BEL/852/30	96,2	A	T	A	C	C	A	A	A	A	C	C	T	T	G	T	T	T	C	T	G	
BEL/257/06	93,9	A	T	A	T	C	A	A	A	A	C	C	T	C	G	C	C	C	C	T	G	
BEL/572/06	81,2	A	T	A	C	C	A	A	A	T	C	C	T	C	G	C	C	C	C	T	G	

Quadro 6 - Similaridade do gene F das amostras do subgrupo B em relação à cepa protótipo B1. Posições de nucleotídeos com mutações.

Similaridade (%)		Posições de nucleotídeos com mutações																			
Amostras	Cepa	49	63	132	193	219	227	258	261	270	283	308	316	349	351	414	510	511	567	600	609
	B1	A	C	T	A	C	T	T	G	G	C	C	C	T	T	G	T	T	C	T	A
BEL/088/01	95,2	-	-	T	A	C	T	T	G	A	C	C	C	T	C	A	C	T	C	T	A
BEL/163/01	98,8	G	T	T	A	C	T	T	G	A	C	C	C	T	C	A	C	T	C	T	A
BEL/506/03	88,7	-	C	T	A	C	T		A	A	C	C	A	T	C	G	T	T	C	T	-
BEL/760/03	98,9	A	C	T	A	C	T	T	A	A	C	C	A	T	C	G	T	T	C	T	A
BEL/877/03*	97,9	A	C	T	C	T	T	C	G	A	C	T	C	C	C	G	T	C	A	T	A
BEL/121/04	97,7	G	C	T	C	T	T	C	G	A	C	T	C	C	C	G	T	C	A	T	A
BEL/152/04	98,4	A	C	C	A	C	T	T	G	A	T	C	C	T	C	G	T	T	C	C	A
BEL/177/04*	98,6	A	T	T	A	C	T	T	G	A	C	C	C	T	C	A	C	T	C	-	A
BEL/343/04*	94,3	-	-	T	C	T	C	C	G	A	C	T	C	C	C	G	T	C	A	-	T

* Amostras com \geq três substituições aminoacídicas

Quadro 7- Mutações no gene F e substituições aminoacídicas

Subgrupo	Posição da mutação nucleotídica	Substituição aminoacídica
A	364 G→A	A122T
A	385 T→G	L129V
A	454 G→A	V152I
A	617 T→C	I206T
B	49 A→G	I17V
B	193 A→C	K65Q
B	227 T→C	V76A
B	308 C→T	A103V
B	349 T→C	Y117H
B	609 A→T	L203F

6. DISCUSSÃO

Entre janeiro de 2000 a maio de 2006, foram diagnosticados 153 casos de infecção respiratória aguda associados a Vírus Respiratório Sincicial, na cidade de Belém, Pará. As infecções respiratórias agudas continuam sendo um sério problema de saúde pública em países em desenvolvimento, afetando principalmente crianças menores de cinco anos de idade. Nesta população, o VRS é o patógeno mais comumente associado a esta infecção.

Corroborando dados de estudos anteriores, em nosso estudo a faixa etária de 0 a 4 anos de idade foi a que concentrou a maioria dos casos (90,19%) [Moura *et al.*, 2003]. Esta concentração do número de casos em menores de quatro anos pode ser explicada pela imaturidade imunológica desses indivíduos (Collins *et al.*, 2001; Moura *et al.*, 2003). Contudo, vale ressaltar que a população envolvida neste estudo é basicamente constituída por crianças, fato este, que pode ter contribuído para os resultados obtidos, constituindo assim um viés do estudo no que concerne à faixa etária de indivíduos acometidos. De fato, estudos recentes têm demonstrado que a doença causada pelo VRS acomete igualmente adultos, embora com menor gravidade (Falsey & Walsh 2000).

O perfil sazonal das infecções por VRS nas diferentes regiões do planeta tem se mostrado diversificado, estando associado a diversos fatores como, clima, pluviosidade, umidade relativa do ar e variação da temperatura (Weber *et al.*, 1998; Shek *et al.*, 2003). Em Belém, a maior ocorrência de infecção pelo VRS parece se concentrar nos seis primeiros meses do ano, com predominância nos meses de abril e maio, período de transição da estação chuvosa para outra de menor pluviosidade, como observado nos anos de 2000, 2001, 2003 e 2004.

Em 2001 observamos um segundo pico de atividade, nos meses de setembro e outubro. Este fato poderia explicar o pico tardio de VRS no ano de 2002 que ocorreu somente entre julho e agosto, diferenciando-se dos demais anos. No ano de 2005, o VRS não esteve associado a surto em nossa cidade. Já em 2006, o período epidêmico por VRS adiantou-se, tendo ocorrido entre os meses de fevereiro e março, período este chuvoso, diferente do que vinha acontecendo nos últimos seis anos. A ocorrência de surto no início do ano pode ser explicada pelo fato da pouca atividade do VRS no ano anterior.

Quanto à distribuição dos subgrupos dentro de cada período epidêmico, esta questão foi investigada através das técnicas IFI e da RT-PCR. Estas revelaram a co-circulação dos vírus A e B nos anos de 2001 e 2003, com predominância do subgrupo B em ambos os anos. Contudo, poucas amostras foram investigadas em 2001, e neste mesmo ano, em países vizinhos como no Uruguai e Argentina, houve co-circulação dos subgrupos do VRS com predominância do subgrupo A (Arbiza *et al.*, 2005; Galiano *et al.*, 2005; Viegas & Mistchenko, 2005).

Nos anos de 2000, 2002, 2005 e 2006, somente vírus do subgrupo A foram detectados e em 2004, somente os vírus do subgrupo B. Diversos estudos relatam a co-circulação dos subgrupos A e B com predominância de um, sendo, contudo, o subgrupo A reconhecido como predominante na maioria dos casos. A circulação alternada dos subgrupos também tem sido citada em outras investigações conduzidas na África do Sul, em Moçambique, no Uruguai, na Argentina e no Japão (Venter *et al.*, 2001, Rocca *et al.*, 2003; Arbiza *et al.*, 2005; Galiano *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Viegas & Mistchenko, 2005).

Ainda nos anos de 2003 e 2004 por meio da IFI, foram observadas amostras com reatividade para ambos os soros monoclonais dos subgrupos A e B,

fato este não evidenciado na RT-PCR, onde tais amostras foram caracterizadas como pertencente ao subgrupo B. Uma vez que a IFI avalia apenas a proteína F, acredita-se a divergência observada entre os testes poderia ser devido à ocorrência de uma recombinação onde certa parte do genoma seria de um vírus A e outra parte, incluindo F, seria de um vírus B. Contudo para verificar tal possibilidade, uma análise mais aprofundada da sequência do gene codificador da proteína F deveria ser realizada.

No ano de 2000, nossos achados assemelham-se aos de estudos realizados na Argentina (Galiano *et al.*, 2005; Viegas & Mistchenko, 2005). Todavia, em 2002, neste mesmo país houve co-circulação dos subgrupos A e B, o que não ocorreu em nossa cidade (Viegas & Misthenko, 2005). Quanto ao padrão de circulação do VRS nos anos de 2005 e 2006, nenhum dado disponível foi encontrado na literatura.

Em 2004, foram detectados apenas os vírus do subgrupo B, mostrando-se diferente do que ocorreu na Argentina e no Japão, onde os subgrupos A e B co-circularam sendo as cepas do subgrupo A predominantes (Sato *et al.*, 2005; Viegas & Misthenko, 2005). A maioria dos estudos relata a co-circulação dos subgrupos com predominância de um de um deles, citando o subgrupo A como sendo predominante, diferente do resultado obtido nessa investigação em que o subgrupo B mostrou-se predominante nos anos em que houve co-circulação (Rocca *et al.*, 2003; Arbiza *et al.*, 2005; Galiano *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Viegas & Mistchenko, 2005).

Estudos com base na variabilidade antigênica e genética do VRS têm demonstrado a existência de genótipos distintos dentro de cada subgrupo A e B. Tais genótipos podem co-circular em uma mesma epidemia, sendo observada em

muitas a predominância de um genótipo, sendo estes suplantados por novos genótipos em epidemias consecutivas (Peret *et al.*, 1998, Venter *et al.*, 2001, Rocca *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004; Zlateva *et al.*, 2004; Arbiza *et al.*, 2005; Galiano *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Zlateva *et al.*, 2005).

No Brasil poucos estudos sobre a variabilidade genética do VRS foram descritos Moura *et al.* (2004) verificaram a variabilidade do VRS em apenas um período epidêmico na cidade de Salvador, contudo constataram a circulação de três genótipos do subgrupo A (GA2, GA5 e GA7) e dois genótipos do subgrupo B (GB3 e SAB3). Vale ressaltar que em nossa análise filogenética as amostras de Salvador outrora identificadas como GB3 agora agruparam-se juntamente com amostras SAB3.

Apesar de poucas amostras terem sido analisadas no presente estudo, foi possível a detecção de genótipos distintos dentro dos subgrupos A (GA2 e GA5) e B (SAB1 e SAB3) como descrito em outros estudos realizados em outros países (Cane & Pringle, 1995; Peret *et al.*, 1998, Venter *et al.*, 2001; Rocca *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2004; Zlateva *et al.*, 2004; Arbiza *et al.*, 2005; Galiano *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Zlateva *et al.*, 2005).

Os vírus isolados na cidade de Belém mostraram-se formando *clusters* distintos dos demais vírus de outras partes do mundo, com exceção de duas amostras, uma de 2001 e uma de 2002, que estão geneticamente relacionadas às cepas da Argentina.

A co-circulação de genótipos diferentes dentro de um mesmo período epidêmico tem sido relatada em estudos realizados em países da África, América do Sul, Ásia e Europa (Peret *et al.*, 1998, Venter *et al.*, 2001, Rocca *et al.*, 2003; Moura

et al., 2004; Scott *et al.*, 2004; Zlateva *et al.*, 2004; Arbiza *et al.*, 2005; Galiano *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Zlateva *et al.*, 2005).

Em 2000, assim como na Argentina, verificamos a predominância do genótipo GA5. Achados semelhantes foram relatados no Japão e na Suécia (Rafiefard *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005; Viegas & Mistchenko, 2005).

Nos anos de 2001 a 2003 detectamos a circulação apenas do genótipo GA2, considerando o reduzido número de amostras analisadas não podemos inferir se tal genótipo realmente foi o predominante, uma vez que no mesmo período investigações conduzidas na Argentina evidenciaram co-circulação com predominância do genótipo GA5 (Viegas & Mistchenko, 2005).

Em 2006 registramos a co-circulação dos genótipos GA2 e GA5, com predominância do GA2. Padrão similar de ocorrência foi encontrado na Argentina no ano de 2003 (Galiano *et al.*, 2004; Viegas & Mistchenko, 2005).

No ano de 2001 somente o genótipo SAB1 mostrou-se circulante em nossa cidade, consistindo no primeiro relato deste genótipo na América do Sul. Estudos conduzidos na Argentina e no Uruguai no mesmo ano descrevem circulação de genótipos distintos GB3 e SAB3 (Arbiza *et al.*, 2005; Viegas e Mistchenko, 2005).

Em 2003 houve co-circulação dos genótipos SAB3 e SAB1 em nossa cidade.

No ano de 2004 observou-se a circulação do genótipo SAB3, contudo a maioria dos isolados neste ano formou um grupo distinto dos demais genótipos disponíveis no Banco de Genes até o momento. Este genótipo foi denominado BRB1, entretanto análises complementares devem ser feitas para inferir a confiabilidade do mesmo.

Na literatura existem poucos dados disponíveis sobre o gene que codifica a proteína F, entretanto estudos envolvendo tal proteína têm sua importância uma vez que o medicamento de escolha no tratamento de pacientes com infecções graves por VRS, o Palivizumab[®], tem seu sítio de ação nesta proteína. Além disso, vários estudos envolvendo vacinas de subunidade vêm sendo focalizados nesta proteína (Sullender, 2000).

Apesar do pequeno fragmento do gene codificador da proteína F analisado em nosso estudo, foi possível identificar algumas mutações, dentre as amostras do subgrupo A e B.

Assim como em outros relatos, as mutações pontuais ocorridas estiveram mais associadas a transições, principalmente T↔C (Agenbach *et al.*, 2005).

Dentro do subgrupo A, a principal mutação ocorrida envolveu a substituição de nucleotídeo G → A na posição 364, com consequente troca de aminoácido no resíduo A122T, o qual envolve um epítipo subgrupo-específico, tal mutação foi observada em estudo conduzido na África envolvendo genótipos de VRS isolados recentemente (Agenbach *et al.*, 2005). Segundo Agenbach *et al.* (2005), mutações envolvendo tal resíduo podem afetar a estrutura secundária da proteína, haja vista que tais mutações resultam em aminoácidos com propriedades bioquímicas alteradas.

As demais trocas aminoacídicas encontradas consistiram em mutações silenciosas, não estando envolvida em nenhuma epítipo dentro dos sítios antigênicos da proteína F. Contudo vale ressaltar que o fragmento analisado em nosso estudo concentrou poucos epítopos neutralizantes da proteína F, assim sendo estudos posteriores envolvendo a análise completa do gene codificador desta proteína precisam ser realizados.

7. CONCLUSÕES

A faixa etária de 0 a 4 anos de idade foi a que concentrou a maioria de casos de infecção respiratória aguda associada ao VRS (n=138, 90,19%).

O pico de atividade do VRS na cidade de Belém, Pará ocorreu principalmente nos primeiros seis meses do ano e esteve associado na maioria dos anos estudados ao período de troca de estação chuvosa para mais seca.

As amostras que reagiram com ambos os soros monoclonais no subgrupamento por IFI, mostram-se positivas somente para o subgrupo B na RT-PCR.

Houve co-circulação dos subgrupos A e B nos anos de 2001 e 2003, com predominância do subgrupo B em ambos. Nos anos de 2000, 2005 e 2006 somente cepas do subgrupo A foram identificadas. Exclusivamente cepas do subgrupo B foram detectadas em 2004.

Dentro do subgrupo A, foi verificada a circulação dos genótipos GA2 e GA5 no período estudado.

No subgrupo B a circulação dos genótipos SAB1 e SAB3, foi detectada em Belém.

O isolamento do genótipo SAB1 no ano de 2001 consistiu no primeiro relato da circulação deste na América do Sul.

Foi detectada dentro do subgrupo B, no ano de 2004, a formação de um grupo distinto das demais sequências disponíveis no *GenBank*, sendo assim momentaneamente denominado de BRB1.

A similaridade de sequência nucleotídica do gene codificador da proteína F variou de 81,2-97,4% entre as amostras do subgrupo A quando comparadas com a cepa protótipo A2.

Dentro do subgrupo B a similaridade desta proteína variou de 88,7-98,9%, contudo as substituições de nucleotídeos geraram um número maior de trocas aminoacídicas neste subgrupo, sendo que estas refletiram em mutações silenciosas.

Dentro do subgrupo A, a principal mutação ocorrida envolveu a substituição de nucleotídeo G→ A na posição 364, com conseqüente troca de aminoácido no resíduo A122T, o qual envolve um epítipo subgrupo-específico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, L. J. *et al.* Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 151:626– 633, 1985.

AGENBACH, E., TIEMESSEN, C.T.; VENTER, M.,J. Amino Acid Variation within the Fusion Protein of Respiratory Syncytial Virus Subtype A and B Strains during Annual Epidemics in South Africa. *Virus Genes* 30:2, 267–278, 2005.

AKERLIND, B. & NORRBY, E. Occurrence of respiratory syncytial virus subtype A and B strains in Sweden. *J. Med. Virol.* 19:241-247, 1986.

ARBIZA, J.; DELFRARO, A.; FRABASILE, S. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001 - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 100(3): 221-230, May 2005.

AVENDANO, L.F.; PALOMINO, M.A.; LARRANAGA, C. Surveillance for respiratory syncytial virus in infants hospitalized for acute lower respiratory infection in Chile (1989 to 2000). *J Clin Microbiol.* 41:4879-82, 2003.

BARREIRA, J.L.N.; FONSECA, C.; CARDOSO, M.J.; AZEVEDO, A.; VÍTOR, A.B. Relación entre el subtipo del virus respiratorio sincitial y la gravedad clínica en la bronquiolitis. *Anales Españoles de Pediatría*, 54:559-566, 2001.

BAYBUTT, H.N.; PRINGLE, C.R. Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol.* 68 : 2789-96, 1987.

BLACK, C.P. Byology and Medical Management of RSV infection. *Respiratory Care*, 48:209-231, 2003.

BEDOYA, V.I.; ABAD, V.; TRUJILLO, H. Frequency of respiratory syncytial virus in hospitalized infants with lower acute respiratory tract infection in Colombia. *Pediatric Infection Disease Journal*, 15: 1123–1124, 1996.

CALEGARI, T. *et al.* Clinical-Epidemiological Evaluation of Respiratory Syncytial Virus Infection in Children Attend in a Public Hospital in Midwestern Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 9(2): 156-161, 2005.

CANE, P.A. & PRINGLE, C.R. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: a review of the use of reverse transcription–polymerase chain reaction in the analysis of genetic variability. *Electrophoresis*; 16:329–33, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Brief Report: Respiratory Syncytial Virus Activity United States, 2003-2004. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5349a4.htm>, acessado em 14 de junho de 2005.

CHAN, P.W.K.; CHEW, F.T.; TAN, T. N.; CHUA, K.B.; HOI, P. S. Sazonal Variation in Respiratory Syncytial Virus chest infections in the Tropics. *Pediatric Pulmonology*. 34: 47-51, 2002.

CHECON, R.E.; SIQUEIRA, M.M.; LUGON, A.K.; PORTES, S.; DIETZE, R. Short report: seasonal pattern of respiratory syncytial virus in a region with a tropical climate in southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 67:490-1, 2002.

CHEW, F.T.; DORAISINGHAM, S.; LING, A.E.; KUMARASIOGHE, G.; LEE, B.W. Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. *Epidemiol Infect* 121: 121-128, 1998.

CHOI, E.H. & LEE, H. J. Genetic diversity and molecular epidemiology of the G protein of subgroups A and B of respiratory syncytial viruses isolated over 9 consecutive epidemics in Korea. *J Infect Dis*. 181:1547-56, 2000.

COATES, H. V.; KENDRICK, L.; CHANOCK, R. M. Antigenic differences between two strains of respiratory syncytial virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 112:958-964, 1963.

COLLINS, P.L; CHANOCK, R.M.; MURPHY, B.R. Respiratory Sincytial Virus. In *Fields Virology*, 4rd end, 1443-1477,2001.

CRISTINA, J.; LOPEZ, J. A.; ALBO, C.; GARCIA-BARRENO, B.; GARCIA, J.; MELERO, J. A.; PORTELA, A. Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology* 174:126–134, 1990.

D'ELIA, C. *et al*. Infecções do trato respiratório inferior pelo vírus sincicial respiratório em crianças hospitalizadas menores de um ano de idade. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38:7-10. 2005.

DEVINCENZO, J.P. Natural Infection of Infants with Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B: A Study of Frequency, Disease Severity, and Viral Load. *Pediatric Research*. 56:914-917, 2004.

DOMACHOWSKE, J.B & ROSENBERG, H.F. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. *Clin Microbiol Rev*. 12:298-309. Review, 1999.

ENGLUND, J. A.; ANDERSON, L. J.; RHAME, F. S. Nosocomial Transmission of Respiratory Syncytial Virus in Immunocompromised Adults. *Journal Of Clinical Microbiology*. 115-119. 1991.

FALSEY, A. R. & WALSH, E. E. Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. *Clinical Microbiology Reviews*. 13: 371–384 . 2000.

FISHAUT, M.; TUBERGEN, D.; MCINTOSH, K. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity. *J. Pediatr*. 96:179–186, 1980.

FODHA, I.; VABRET, A.; TRABELSI, A.; FREYMUTH, F. Epidemiological and antigenic analysis of respiratory syncytial virus in hospitalised Tunisian children, from 2000 to 2002.. *J Med Virol*. 72:683-7, 2004.

FRABASILE, S. Análisis genético de cepas de virus respiratorio Sincicial aisladas en 1992; correlación con la variación antigénica. *Dissertação de Mestrado*. Montevideo, 83 pag, 1994.

FREYMUTH, F.; EUGENE, G.; VABRET, A.; PETITJEAN, J.; GENNETAY, E.; ROUARD, J.; DUHAMEL, J.F.; GUILLOIS. B. Detection of Respiratory Syncytial Virus by Reverse Transcription-PCR and Hybridization with a DNA Enzyme Immunoassay. *J. OF Clin Microbiol*, 33: 3352–3355, 1995.

GALIANO, M. C. *et al*. Intragroup Antigenic Diversity of Human Respiratory Syncytial Virus (Group A) Isolated in Argentina and Chile. *Journal of Medical Virology* 77:311–316, 2005.

GARCIA, O. *et al*. Evolutionary Pattern of Human Respiratory Syncytial Virus (Subgroup A): Cocirculating Lineages and Correlation of Genetic and Antigenic Changes in the G Glycoprotein. *Journal Of Virology*,. 68: 5448-5459, 1994.

GARCIA-BARRENO, B.; PALOMO, B.; PENAS, C.; DELGADO, T.; PEREZ-BRENA, P.; MELERO, J.A. Marked differences in antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J. Virol.* 63: 925-932, 1989.

GARCIA-BARRENO, B.; PORTELA, A.; DELGADO, T.; LOPEZ, J.A.; MELERO, J.A. Frame shift mutations of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus. *EMBO J*; 9:4181-7, 1990.

GILCA, R.; DE SERRES, G.; TREMBLAY, M.; VACHON, M.L.; LEBLANC, E.; BERGERON, M.G.; DERY, P.; BOIVIN, G. Distribution and clinical impact of human respiratory syncytial virus genotypes in hospitalized children over 2 winter seasons. *The Journal of Infectious Diseases*, 193:54-8, 2006.

GOTTSCHALK, J.; ZBINDEN, R.; KAEMPF, L.; HEINZER, I. Discrimination of respiratory syncytial virus subgroups A and B by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34:41-43, 1996.

HALL, C. B. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the 'Cold War' has not ended. *Clinical Infectious Diseases*. 31:590-596, 2000.

HEMMING, V.G.; PRINCE, G.A.; HORSWOOD, R.L.; LONDON, W.J.; MURPHY, B.R.; WALSH, E.E.; FISCHER, G.W.; WEISMAN, L.E.; BARON, P.A.; CHANOCK, R.M. Studies of passive immunotherapy for infections of respiratory syncytial virus in the respiratory tract of a primate model. *J Infect Dis.* 152:1083-7, 1985.

HENDRY, R. M.; PIERIK, L. T.; McINTOSH, K. Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. *J. Infect. Dis.* 160:185-190, 1989.

HU, A.; COLELLA, M.; TAM, J.S.; RAPPAPORT, R.; CHENG, S.M. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 41:149-54, 2003.

JOHNSON, P. R.; SPRIGGS, M. K.; OLMSTED, R. A.; COLLINS, P. L. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5625-5629, 1987.

KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics 5:150-163, 2004.

MADHI, S. A. *et al.* Importance of nosocomial respiratory syncytial virus infections in an African setting *Tropical Medicine and International Health*. 9: 491-498, 2004.

MARTINELLO, R.A.; CHEN, M.D.; WEIBEL, C.; KAHN, J.S. Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis* 186:839–842, 2002.

MARTINEZ, I.; VALDES, O.; DELFRARO, A.; ARBIZA, J.; RUSSI, J.; MELERO, J.A. Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification. *J Gen Virol*; 80:125–30, 1999.

McCONNOCHIE, K. M.; HALL, C. B.; WALSH, E. E.; ROGHMANN, K. T. Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtype. *J. Pediatr.* 117:52–62, 1990.

McINTOSH, K.; MASTERS, H.B.; ORR, I.; CHAO, R.K.; BARKIN, R.M. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J Infect Dis.* 138:24-32, 1978.

MELERO, J. A.; GARCIA-BARRENO, B.; MARTINEZ, I.; PRINGLE, C. R.; CANE, P. A. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J. Gen. Virol.* 78:2411– 2418, 1997.

MELLO, W.A. & SILVA, C. Epidemiological aspects of RSV subgroups in Belém, Brazil. *Boletim Latino-Americano* 1: 8 1992.

MOURA, F.E.A.; BORGES, L.C.; SOUZA, L.S.F.; RIBEIRO, D.H.; SIQUEIRA, M.N.; RAMOS, E.A.G. Estudo de infecções Respiratórias Agudas Virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39:275-282, 2003.

MOURA, F. E. A. *et al.* Genetic Diversity of Respiratory Syncytial Virus Isolated During an Epidemic Period From Children of Northeastern Brazil *Journal of Medical Virology* 74:156–160, 2004.

MUFSON, M. A.; ORVELL, C.; RAFNAR, B.; NORRBY, E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 66:2111-2124, 1985.

MUFSON, M. A., BELSHE, R. B.; ORVELL, C.; NORRBY, E.. Respiratory syncytial virus epidemics: variable dominance of subgroups A and B strains among children, 1981–1986. *J. Infect. Dis.* 157:143–148, 1988.

MUFSON, M. A. & STANEK, R. J. Identification of a variant subgroup A strain of respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.* 34:2493–2496, 1996.

MURPHY, B.R.; OLMSTED, R.A.; COLLINS, P.L.; CHANOCK, R.M. PRINCE, G.A. Passive transfer of respiratory syncytial virus (RSV) antiserum suppresses the immune response to the RSV fusion (F) and large (G) glycoproteins expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol.* 62 :3907-10, 1988.

NOYOLA, D.E.; RODRIGUEZ-MORENO, G.; SANCHEZ-ALVARADO, J.; MARTINEZ-WAGNER, R.; OCHOA-ZAVALA, J.R. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in Mexico. *Pediatr Infect Dis J.* 23:118-23, 2004.

O'SULLIVAN, S.; CORMICAN, L.; FAUL, J.L.; ICHINOHE, S.; JOHNSTON, S.L.; BURKE, C.M.; POULTER, L.W. Activated, cytotoxic CD8(+) T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med.* 164:560-4, 2001.

PEDRAZ, C.; CARBONELL-ESTRANY, X.; FIGUERAS-ALOY, J.; QUERO, J. Efeito da profilaxia com Palivizumab na diminuição das internações hospitalares causadas pelo vírus respiratório sincicial. *Pediatr Infect Dis J.* 22: 283-7, 2003.

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 human respiratory syncytial virus in a community. *J. Gen. Virol.* 79:2221– 2229, 1998.

PRINCE, G. A.; R. L. HORSWOOD.; CHANOCK, R.M. Quantitative aspects of passive immunity to respiratory syncytial virus infection in infant cotton rats. *Journal of Virology*, 55:517-520, 1985.

RAFIEFARD, F. *et al.* Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) of group A in Stockholm, Sweden, between 1965 and 2003 *Virus Research* 105: 137–145, 2004.

RAJALA, M. S.; SULLENDER, W. M.; PRASAD, A. K.; DAR, L.; BROON, S. Genetic Variability among Group A and B Respiratory Syncytial Virus Isolates from a Large Referral Hospital in New Delhi, India. *Journal of Clinical Microbiology.* 41: 2311–2316, 2003.

RANDHAWA, J. S. A pneumovírus Cartoon. Disponível em <http://www.Medscape.com/viewarticle/431615>. Acesso em 20 de junho de 2005

ROCA, A.; LOSCERTALES, M. P.; QUINTO, L.; PEREZ-BRENA, P.; VAZ, N. Genetic variability among group A and B respiratory syncytial viruses in Mozambique: identification of a new cluster of group B isolates. *J. Gen. Virol.* 82:103–111, 2001.

RUEDA, P.; GARCIA-BARRENO, B.; MELERO, J. A. Loss of conserved cysteine residues in the attachment (G) glycoprotein of two human respiratory syncytial virus escape mutants that contain multiple A_G substitutions (hypermutations). *Viriology.* 198: 653-662, 1994.

RUUSKANEN, O. & OGRA, P. L. 1993. Respiratory Syncytial Virus. in *Currents Problems in Pediatrics.* 51-79, 1993.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 74: 5463-5467, 1977.

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* 43: 36–40, 2005.

SCOTT, P. D. *et al.* Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus in Kilifi District, Kenya *Journal of Medical Virology* .74: 344–354. 2004.

SEKI, K.; TSUTSUNI, H.; OHSAKI, M.; KAMASAKI, H.; CHIBA, S. Genetic variability of respiratory syncytial virus subgroup a strain in 15 successive epidemics in one city. *J Med Virol.* 64: 374-80, 2001.

SHEK, L.P-C.; LEE, B.W. Epidemiology and Seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. *Paediatric Respiratory reviews.* 4: 105-111. 2003.

SIQUEIRA, M. M.; NASCIMENTO, J. P.; ANDERSON, L. J. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 29: 557–559, 1991.

SMYTH, R.L.; MOBBS, K.J.; O'HEA, U.; ASHBY, D.; HART, C.A. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: disease severity, interleukin-8, and virus genotype. *Pediatric Pulmonology.*..33: 339-46, 2002.

STRALIOTTO, S.M.; NESTOR, S.M.; SIQUEIRA, M.M. Respiratory syncytial virus groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 96: 155-8, 2001.

STRUCK, A.; FORSTER, J.; IHORST, G.; WERCHAU, H.; KONIG, W.; KONIG, B. Respiratory Syncytial Virus: G Gene Genotype and Disease Severity. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 23: 1000-2, 2004.

SULLENDER, W. M. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:1–15, 2000.

TAYLOR, C. E.; CRAFT, A. W.; KERNAHAN, J. Local antibody production and respiratory syncytial virus infection in children with leukemia. *J. Med. Virol.* 30:277–281, 1990.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. AND GIBSON, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994.

VENTER, M. ; MADHI, S.A. ; TIEMESSEN, C.T. ; SCHOUB, B.D. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol.* 82:2117-24, 2001.

VENTER, M.; COLLINSON, M.; SCHOUB, B.D. Molecular epidemiological analysis of community circulating respiratory syncytial virus in rural South Africa: Comparison of viruses and genotypes responsible for different disease manifestations. *Journal of Medical Virology*. 68:452-61, 2002.

VIEGAS, M. & MISTCHENKO, A. S. Molecular Epidemiology of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A Over a Six-Year Period (1999–2004) in Argentina *Journal of Medical Virology* 77: 302–310, 2005.

WALSH, E. E.; MCCONNOCHIE, K. M.; LONG, C. E.; HALL, C. B. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. *J. Infect. Dis.* 175: 814–820, 1997.

WERTZ, G.W.; COLLINS, P. T.; HUANG, Y.; GRUBER, C.; LEVINE, S.; BALL, L.A. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4075-4079, 1985.

WHO & PAHO. The world health report 2005 - make every mother and child count. Disponível em http://www.who.int/whr/2005/annex/annexes3-4_en.pdf. Acessado em 15 de maio de 2006.

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 JOURNAL OF VIROLOGY. 78: 4675–4683, 2004.

ZLATEVA, K. T. *et al.* Genetic Variability and Molecular Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup B Attachment G Protein. Journal Of Virology. 79: 9157–9167, 2005.

ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Núcleo de Medicina Tropical – CEP/CONEP-NMT



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** N°007 /2006-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL ISOLADOS DE CASOS DE INFECÇÃO RESPIRATÓRIA AGUDA NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ, BRASIL, NOS ANOS DE 2000 A 2005.
3. **Pesquisador Responsável:** Rita Catarina Medeiros de Souza.
4. **Instituição / Unidade:** Instituto Evandro Chagas.
5. **Data de Entrada:** 10/03/2006.
6. **Data do Parecer:** 11/04/2006.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

Belém, 22 de junho de 2006.

Profº Teiji Okawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.