

LUCIANA HELENA ANTONIASSI DA SILVA

**VARIABILIDADE DO GENE G DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL HUMANO (hRSV) E DO GENE F DO
METAPNEUMOVÍRUS HUMANO (hMPV)**

CAMPINAS

Unicamp

2007

LUCIANA HELENA ANTONIASSI DA SILVA

**VARIABILIDADE DO GENE G DO VÍRUS RESPIRATÓRIO
SINCICIAL HUMANO (hRSV) E DO GENE F DO
METAPNEUMOVÍRUS HUMANO (hMPV)**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de concentração em Ciências Básicas

ORIENTADORA: PROF^a DR^a CLARICE WEIS ARNS

CAMPINAS

Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

Si38v Silva, Luciana Helena Antoniassi da
Variabilidade do gene G do vírus respiratório sincicial humano (*hRSV*) e do gene F do metapneumovírus humano (*hMPV*). / Luciana Helena Antoniassi da Silva. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Clarice Weis Arns
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Variabilidade genética. I. Arns, Clarice Weis. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Genetic variability in the G gene of human respiratory syncytial virus (*hRSV*) and in the F gene of human metapneumovirus (*hMPV*)

Keywords: • Genetic variability

Área de Concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Banca examinadora: Prof^ª. Dr^ª. Clarice Weis Arns

Prof^ª. Dr^ª. Viviane Fongaro Botosso

Prof^ª. Dr^ª. Liana Maria Cardoso Verinaud

Data da defesa: 03 - 08 - 2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Profa Dra. Clarice Weis Arns*

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) .Viviane Fongaro Botosso _____
2. Prof(a). Dr(a). Liana Maria Cardoso Verinaud _____
3. Prof(a). Dr(a). Clarice Weis Arns _____

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 03/08/2007

DEDICATÓRIA

Para minha querida mãe

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãe, sem você não chegaria até aqui, você me fez acreditar que mesmo com as dificuldades conseguimos concretizar nossos sonhos.

Ao meu querido pai (*in memorium*), por me mostrar que a vida é feita de conquistas e a mais importante delas são os amigos.

A minha tia Marta, meu exemplo, a dar um novo rumo a minha vida, como tenho orgulho de ser sua sobrinha.

Ao querido vô José Casado por acreditar em mim e por ter me ajudado nessa jornada.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Clarice, pela confiança, incentivo, pelo carinho e as muitas oportunidades geradas e principalmente a sua dedicação e preocupação com seus alunos. Você Clarice, sempre a disposição para uma conversa ou a discussão dos problemas gerados durante a execução dos trabalhos e pela maneira alegre com que fui recebida em seu laboratório e pelos preciosos ensinamentos.

Ao querido amigo e Dr. Fernando Spilki pela sua colaboração nos trabalhos, na realização das análises filogenéticas e sugestões, foram fundamentais. As respostas rápidas dos muitos e-mails tantas dúvidas e questionamentos. A Valesca também que participou indiretamente da conclusão deste trabalho.

A minha mãe postiça e a grande amiga de laboratório Maria Ângela Orsi, as longas conversas, gargalhadas, minha companheira, me mostrou caminhos para a resolução dos problemas.

A Dra. Adriana pela disposição das amostras clínicas, pelas valiosas informações e sugestões clínicas, gentilmente dadas para a execução e conclusão deste trabalho, pela sua disposição em ajudar, pela amizade e pelo carinho.

Aos amigos do laboratório Márcia, Paula (pelas caronas ao Hemocentro e as conversas), Geneci (pelo cuidado com as células e dicas de como cuidar bem delas), Helena, Judite, Mateus (pelos tantos géis de agarose) e Luciana, pelo apoio e pelos bons momentos de convivência.

A amiga Dani sua ajuda foi muito importante para a realização deste trabalho (com a sua maneira e com a alegria que foi recebida no Laboratório do Prof^o. Edison Durigon a sua disponibilidade e a disposição de querer sempre me ajudar, seja com os *primers* ou qualquer dúvida nas trocas de e-mail). A querida Vivi, pela ajuda no momento em que estava para desistir de tudo e a amiga Paty (amiga e companheira de conversas nas minhas visitas a USP).

Aos amigos Andréia (obrigada pelos tantos géis), Welbe, Silvia pelo auxílio gentilmente prestado, principalmente com execução do seqüenciamento.

As queridas Ângela e Helô pelas tentativas, execução e o manuseio do seqüenciador e as sugestões pela difícil tarefa de sequenciar as minhas amostras.

A querida prima Samanta e Fabiano que me acolheram na vinda à Campinas, pelos bons momentos de convivência.

As meninas de casa Dé, Lari, Mari, Cris e Bia pelos bons momentos de convivência, principalmente a companheira de quarto Bia (presente em todos os momentos).

Ao Léo e Edu pelos momentos que deixei de estar presentes, milhões de desculpas da tia.

Ao meu irmão José Luiz pelos cuidados com a mãe na minha ausência, meu muito obrigada.

Zé e Andressa espero que um dia vocês mostrem para os meninos como é importante sonhar e acreditar que podemos realizar nossos sonhos.

À vó Augusta, pelas suas preocupações, tias, tios, primas, primos e amigos.

As pessoas que me ajudaram diretamente e indiretamente na realização deste trabalho.

Às crianças e aos pais ou responsáveis, pela colaboração para a realização deste trabalho.

Ao meu querido Deus por colocar esperanças nos momentos de aflição ou de desânimo e de colocar pessoas maravilhosas na minha vida, que puderam me ajudar.

*“Morre lentamente,
quem abandona um projeto antes de iniciá-lo,
não pergunta sobre um assunto que desconhece
ou não responde quando lhe indagam sobre algo que sabe.*

*Evitemos a morte em doses suaves,
recordando sempre que estar vivo exige um esforço muito maior
que o simples fato de respirar.*

Somente a perseverança fará com que conquistemos um estágio esplêndido de felicidade.”

PABLO NERUDA

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1- O vírus Respiratório sincial humano	18
1.2- O metapneumovírus humano	18
1.3- Classificação	19
1.4- Vírion	20
1.5- Genoma	21
1.6- Proteínas virais	22
1.7- Replicação viral	26
1.8- Variabilidade Genética do hRSV	27
1.9- Epidemiologia da infecção pelo hRSV	28
1.10- Manifestações Clínicas da infecção pelo hRSV	29
1.11- Epidemiologia da infecção pelo hMPV	29
1.12- Manifestações Clínicas da infecção pelo hMPV	30
2- OBJETIVOS	31
2.1- Objetivos gerais	32
2.2- Objetivos específicos	32
3- CAPÍTULOS	33
CAPITULO 1	34
CAPITULO 2	57

4- DISCUSÃO GERAL.....	63
5- CONCLUSÕES GERAIS.....	66
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA ABREVIATURAS

hRSV	(<i>human respiratory syncytial virus</i>): Vírus Respiratório Sincicial Humano
hMPV	(<i>human metapneumovirus</i>): Metapneumovírus Humano
bRSV	(<i>bovine respiratory syncytial virus</i>): RSV bovino
AMPV	(<i>avian metapneumovirus</i>): Metapneumovírus aviário
NS1	(<i>nonstructural</i>): Proteínas não estruturais
NS2	(<i>nonstructural</i>): Proteínas não estruturais
F	(<i>fusion</i>): Proteína de Fusão
nm	nanômetro
µm	micrômetro
G	(<i>attachment</i>): Proteína de Ligação
SH	(<i>small hydrophobic</i>) Proteína hidrofóbica pequena
N	(<i>nucleoprotein</i>): Nucleoproteína
P	(<i>phosphoprotein</i>): Fosfoproteína
L	(<i>large polimerase</i>): Polimerase
M	(<i>matrix</i>): Proteína de Matriz
nt	nucleotídeos
mRNA	(<i>messenger RNA</i>): RNA mensageiro
ORF	(<i>open read frame</i>): Fase aberta de leitura
RNA	Ácido Ribonucléico
IL	Interleucina
H	Hemaglutinina
N	Neurominidase

aa	Aminoácidos
kDA	Kilodalton (10^3 daltons)
IFN	Interferon
RNP	Complexo ribonucleoproteína
Mab	Anticorpos monoclonais
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i>): Reação em cadeia da polimerase
GAGs	glicosaminoglicanos
HEp-2	(<i>human laryngeal carcinoma cell</i>) : células de carcinoma de laringe Humano

RESUMO

Os membros da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* são vírus envelopados, não-segmentados dotados de genoma de RNA de fita simples com sentido negativo. O vírus Respiratório sincicial humano (hRSV) é o agente viral melhor caracterizado neste grupo, associado à doença do trato respiratório inferior. Recentemente foi identificado um novo patógeno humano pertencente à subfamília *Pneumovirinae*, o metapneumovírus humano (hMPV), o qual possui similaridades com o hRSV, na sua organização genômica, estrutura viral, antigenicidade e sintomas clínicos.

Na primeira parte do presente trabalho o objetivo foi analisar a variabilidade genética dos isolados de hRSV circulantes na região de Campinas, no período de Abril a Setembro de 2004, comparando as seqüências previamente obtidas do gene que codifica as proteínas F e G do vírus com seqüências parciais e completas de gene homólogo de isolados identificados em outros países. A análise filogenética permitiu classificar os isolados de hRSV como pertencentes aos subgrupos A e B. Os isolados pertencentes ao subgrupo A se distribuíram em três genótipos: GA2, GA5 e SSA1. O genótipo SSA1 foi identificado pela primeira vez no sul da África, e existem poucos relatos do mesmo na literatura. As seqüências analisadas dos isolados do subgrupo B foram identificadas em 3 genótipos distintos dentro desse subgrupo, notadamente GB3 (SAB3) e BA (BAIII). Das amostras analisadas no presente estudo, duas foram identificadas como pertencentes ao genótipo BA, os isolados apresentaram a duplicação dos 60nt na posição 781-840 do gene.

Na segunda parte da tese o objetivo foi identificar a presença e caracterizar molecularmente o hMPV por seqüenciamento parcial do gene que codifica para a proteína F de amostras coletadas de crianças em dois hospitais universitários na região de Campinas, São Paulo, Brasil.

Com base nas seqüências de nucleotídeos do gene F do hMPV, foi identificada a presença do subgrupo B/genótipo B1 em nosso trabalho, semelhante ao que foi relatado em 2004 na Austrália. Nossas amostras apresentaram duas amostras variantes neste mesmo genótipo, com base nas seqüências de nucleotídeos.

ABSTRACT

The members of the *Paramyxoviridae* are enveloped, non-segmented viruses, with negative-sense single stranded genomes. Respiratory syncytial virus (hRSV) is the best characterized agent viral of this group, associated with respiratory diseases in lower respiratory tract. Recently, a new human pathogen belonging to the subfamily *Pneumovirinae* was identified, the human metapneumovirus (hMPV), which is structurally similar to the hRSV, in genomic organization, viral structure, antigenicity and clinical symptoms.

In the first part of the present work the objective is to analyze the genetic variability hRSV isolates circulating in the region of Campinas, in the period April and September 2004, comparing previously obtained sequences from the F and G protein gene of such strains with other partial and complete gene sequences from the homologous genes from isolates identified in other countries. The phylogenetic analysis conducted here allowed us to allocate the isolates belonging to groups A and B. The isolates belonging to the group A showed three clusters, GA2, GA5 and SAA1. The genotype SSA1 was previously identified in South Africa, and there are few reports of such genotype it in the literature. Analyzed sequences belonging to group B were identified in three distinct clusters, GB3 (SAB3) and BA (BAIII).

Of the analyzed sequences in the present study, two were identified as belonging to genotype BA the isolates showed 60 nucleotide (nt) duplication at positions 781-840 the gene.

In the second part of the thesis the objective was to identify the presence and molecular characterization of hMPV by partially sequencing of the F protein gene in samples collected from children of two university hospitals in the region of Campinas, São Paulo state, Brazil.

Based on nucleotide sequences of hMPV F gene, we identified the presence of subgroup B/genotype B1 in our work, similarly to reports in 2004 in Australia. Our samples showed to variants in the same genotype, based on nucleotides sequences.

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- O vírus Respiratório sincicial humano

O vírus Respiratório sincicial humano (hRSV) foi isolado pela primeira vez em 1956 (Morris et al., 1956). O vírus tem distribuição mundial e é reconhecido na população pediátrica como o mais importante agente viral associado à doença do trato respiratório inferior, caracterizada por bronquiolite e pneumonia (Collins et al., 2001). Recentemente este agente vem sendo relacionado de forma similar como causa de doença respiratória na população adulta em geral, principalmente idosa e em indivíduos transplantados de medula óssea (Falsey, 1998; Falsey et al., 2000; Collins et al., 2001).

O vírus apresenta como característica a sazonalidade (Collins et al., 2001). Nos países de clima temperado, como os Estados Unidos (Hall et al., 1990), Japão (Tsutsumi et al., 1988), Inglaterra (Cane, 2001), Argentina (Carballal et al., 2001) e Uruguai (Hortal et al., 1994), os surtos ocorrem principalmente durante os meses de inverno.

Nas regiões de clima tropical e subtropical, os surtos têm uma distribuição diferente ao longo do ano. Na Austrália (Hierholzer et al., 1994), no Brasil, particularmente nas cidades do Rio de Janeiro (Nascimento et al., 1991), São Paulo (Vieira et al., 2001) e Ribeirão Preto (Cintra et al., 2001) foram relatados surtos de hRSV com início no outono estendendo-se até o inverno, com pico de incidência no mês de Maio.

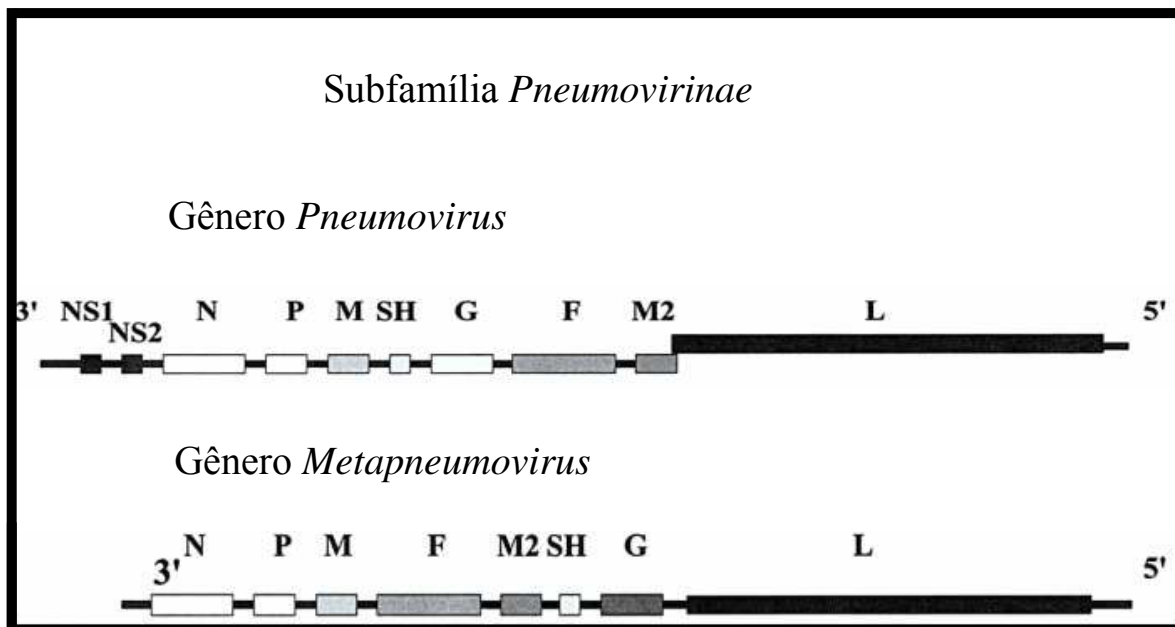
1.2- O metapneumovírus humano

O metapneumovírus humano (hMPV) foi isolado pela primeira vez em 2001 na Holanda (van den Hoogen et al., 2001). O vírus apresenta como característica o acometimento pulmonar, com padrão semelhante àquele causado pelo hRSV, estando associado principalmente aos casos de bronquiolite e pneumonia (Collins et al., 2001; van den Hoogen et al., 2001). Estudos sorológicos realizados na época do primeiro isolamento do vírus revelaram que maioria das crianças na Holanda com aproximadamente cinco anos tinham sido infectadas pelo hMPV. Estudos posteriores relataram que a circulação do vírus na população humana é de aproximadamente 50 anos, sugerindo que o vírus não transpôs recentemente do seu reservatório natural e, portanto ainda suscita

dúvidas sobre a origem deste novo agente (van den Hoogen et al., 2001). Desde a sua descoberta tem sido encontrado em muitos países, incluindo Austrália (Nissen et al., 2002), Canadá (Peret et al., 2002), Finlândia (Jartti et al., 2002), Estados Unidos (Njenga et al., 2003), França (Freymunth et al., 2003), Reino Unido (Stockton et al., 2002), Espanha (Vicente et al., 2003; Garcia-Garcia et al., 2004; Ordás et al., 2006), Irlanda (Carr et al., 2005), Japão (Takao et al., 2003) e Brasil (Cuevas et al., 2003; Debur et al., 2007) na população humana, principalmente em crianças, idosos e indivíduos imunodeficientes (Boivin et al., 2002).

1.3- Classificação

Os membros da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* são vírus envelopados, não-segmentados dotados de genoma de RNA de fita simples com sentido negativo. O vírus Respiratório sincicial humano (hRSV) é o agente viral melhor caracterizado neste grupo, associado à doença do trato respiratório inferior (Easton et al., 2004). Recentemente foi identificado um novo patógeno humano pertencente à subfamília *Pneumovirinae*, o metapneumovírus humano (hMPV), o qual possui similaridades com o hRSV, na sua organização genômica, estrutura viral, antigenicidade e sintomas clínicos (Easton et al., 2004). A subfamília *Pneumovirinae* é dividida em dois gêneros: gênero *Pneumovirus* que contém o hRSV, o RSV bovino (bRSV), bem como os vírus respiratórios sinciciais ovino, caprino e o vírus da Pneumonia do camundongo, além do gênero *Metapneumovirus* que consiste do metapneumovírus aviário (AMPV) e metapneumovírus humano (hMPV). O gênero *Metapneumovirus* difere do gênero *Pneumovirus* na ausência das proteínas não estruturais NS1 e NS2 (Fig. 1) e na ordem dos genes F e M2 (Collins et al., 2001).

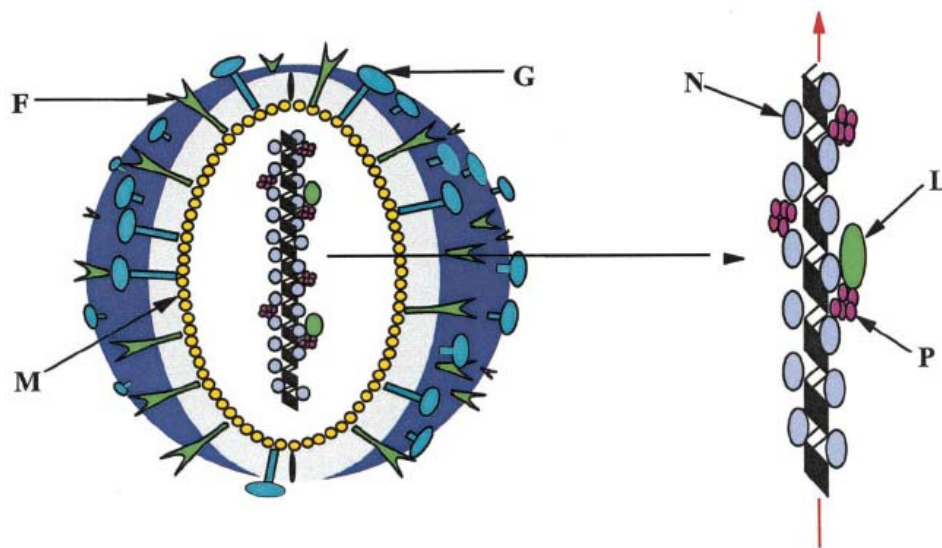


Modificado de Easton et al., 2004. Clin Microb Reviews, 17:390-412

Fig. 1- Estrutura esquemática dos genomas de vírus da subfamília *Pneumovirinae*, gêneros *Pneumovirus* e *Metapneumovirus*. Esta ilustração compara os genes em comum nos dois gêneros indicando à ausência das proteínas não estruturais NS1 e NS2 no gênero *Metapneumovirus* e a ordem dos genes F e M2.

1.4- Vírion

Os membros da subfamília *Pneumovirinae* são vírus pleomórficos de tamanho variável: as partículas esféricas medem 150 a 300 nm de diâmetro; as partículas filamentosas medem entre 60 e 100 nm de diâmetro com aproximadamente 10 µm de comprimento (Collins et al., 2001). As partículas virais são compostas do nucleocapsídeo e por um envelope lipoprotéico, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira (Collins et al., 2001). Sua superfície possui 3 glicoproteínas (Fig. 2), a proteína de ligação ao receptor celular (G), a proteína de fusão (F) e a proteína hidrofóbica pequena (*small hydrofobic*; SH). As glicoproteínas F e G estão intimamente relacionadas com a proteína de matriz (M) localizada na camada interna do envelope viral (Collins et al., 2001; Easton et al., 2004).



Easton et al., 2004. *Clin Microb Reviews*, 17:390-412

Fig. 2- Representação esquemática da partícula viral dos pneumovírus com as proteínas associadas a nucleocápside: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) e a large polimerase (L). Estão presentes a proteína de matriz (M), as glicoproteínas de ligação (G) e de fusão (F). A proteína SH não é ilustrada.

1.5- Genoma

O genoma dos pneumovírus consiste de aproximadamente 15.000 nucleotídeos (nt) e genoma dos metapneumovírus possui aproximadamente 13.000 nt. Em ambos os vírus, a transcrição do genoma se processa no sentido 3'→5'. A região 3' do RNA genômico do hRSV consiste de uma região extragênica de 44 nucleotídeos, conhecida como *leader*, onde se localiza o promotor viral havendo também uma região *trailer* de 155 nt na extremidade 5' (Collins et al., 1991; Mink et al., 1991). O genoma dos pneumovírus codifica 10 proteínas distintas. Em contraste, os metapneumovírus codificam através de seu genoma 8 proteínas distintas (Collins et al., 2001). Cada um destes mRNAs subgenômicos contém uma única fase aberta de leitura (ORF, open reading frame), exceto o gene M2, que contém as ORFs M2-1 e M2-2 (Collins et al., 2001). O RNA genômico é

utilizado por um lado na síntese de um mRNA, que por sua vez é traduzido em novas proteínas virais; por outro lado, ocorre a síntese de antigenomas que irão servir como moldes na síntese de um novo RNA genômico (Easton et al., 2004).

O início de cada gene contém um sinal de 10 nucleotídeos, altamente conservado 3' – CCCCGUUUA (U/C), exceto o gene L que apresenta diferenças em dois nucleotídeos (**negrito**): 3' – CCC**UGU**UUUA, e termina com um sinal de 12 a 13 nucleotídeos, semiconservado que elicia a poliadenilação e a liberação do mRNA viral completo (Collins et al., 2001). Regiões intergênicas de 56 nucleotídeos estão presentes entre os genes dos *Pneumovirus*- NS1, NS2, N, P, M, SH, G, F - à exceção dos genes M2 e L, no qual o gene L sobrepõe em 68 nucleotídeos o gene M2. Deste modo, a sobreposição em 68 nucleotídeos, é transcrita duas vezes, uma durante a síntese do mRNA M2; a segunda, durante a síntese do mRNA L (Collins et al., 2001).

1.6- Proteínas virais

A proteína F é uma glicoproteína transmembrana inserida no envelope viral sendo responsável pela fusão, penetração e formação de sincícios, portanto determinando características estreitamente associadas ao efeito citopático do vírus (Collins et al., 2001). A proteína F dos pneumovírus apresenta características semelhantes com aquelas descritas em outros membros da família *Paramyxoviridae* (Morrison, 1988; van den Hoogen et al., 2002).

A proteína F é sintetizada como um precursor inativo F0, posteriormente clivado por proteases celulares semelhantes à tripsina, no compartimento trans-Golgi, dando origem ao heterodímero F2 e F1, que consiste de subunidades protéicas ligadas por pontes dissulfeto (Collins et al., 2001). A clivagem libera o peptídeo de fusão (₁₃₁KKRKRR₁₃₆), um fragmento hidrofóbico localizado na porção amino-terminal da subunidade F1, estando diretamente envolvido à inserção da proteína na membrana celular (Ellis et al., 1992; Collins et al., 2001; Earp et al., 2004; Ruiz-Arguelo et al., 2004;

Schickli et al., 2005). A subunidade F2 demonstrou-se como o determinante de especificidade nas infecções por vírus respiratórios sinciciais (Schlender et al., 2003).

Adjacente à proteína F existem duas regiões contendo seqüências repetidas de sete aminoácidos denominadas HR-N e HR-C. Estas regiões repetidas são necessárias para o processo de fusão viral (Chambers, et al., 1990; Buckland & Wild, 1989; Lamb, 1993; Russel et al., 1991; van den Hoogen et al.; 2002). As regiões HR-N e HR-C são consideradas candidatos como alvo para o desenvolvimento de drogas direcionadas contra a proteína F, inibindo a ligação de peptídeos à região HR-C e prevenindo a mudança conformacional necessária para a fusão do envelope viral à membrana celular (Lambert et al., 1996).

A proteína F também interage com uma proteína da família Ras chamada RhoA (Pastey et al., 1999). RhoA é uma pequena GTPase que possui inúmeras funções biológicas, tais como: secreção de interleucinas (IL), especificamente IL-1 β ; IL-6 e IL-8; interferência com a reorganização da actina no citoesqueleto; modulação da expressão gênica; alterações na morfologia, mobilidade e proliferação celular (Narumiya, 1996; Pastey et al., 1999). A interação da proteína F do hRSV com RhoA induz a formação de sincícios em células Hep-2 infectadas (Pastey et al., 1999).

A proteína G foi identificada como a principal responsável pela adesão do vírus à célula hospedeira, pela observação de que anticorpos específicos contra a mesma inibem a esse processo (Levine et al., 1987; Collins et al., 2001). A proteína G é análoga as hemaglutinina (H) e neuroaminidase (N) presentes em membros da subfamília *Paramyxoviridae*, porém não possui ação hemaglutinante ou neuramínica (Tristram & Welliver, 1996). A glicoproteína G é uma proteína transmembrana tipo II, ou seja, a mesma possui uma região hidrofóbica localizada próxima a sua porção amino-terminal, sendo esta localizada no citoplasma, enquanto seu fragmento carboxi-terminal permanece exposto externamente à membrana (Langedijk et al., 1998). A proteína G do hRSV codifica um polipeptídeo formado por 289 a 298 resíduos de aminoácidos (aa). O gene que a codifica possui em média 918 nt de extensão nas amostras pertencentes ao subgrupo A e 921 nt para o subgrupo B (Collins et al., 2001). O peso

molecular da proteína estimado é de 32 kDA, aumentando para 90 kDA na sua forma madura devido à intensa glicosilação do tipo *mucin-like* (ligação de glicídios por ligações glicosídicas do tipo O) existente nas regiões amino e carboxi-terminal da proteína (Collins et al., 2001; Hacking & Hull, 2002). O ectodomínio é altamente variável, sendo rico em serina, treonina, prolina e potenciais sítios de ligação de glicídios por ligações glicosídicas *mucin-like* e tipo N. As regiões *mucin-like* são separadas por uma região conservada de 13 aa (164 a 176) incluindo quatro resíduos de cisteína (C¹⁷³, C¹⁷⁶, C¹⁸², C¹⁸⁶) são conservados em praticamente todas as amostras de hRSV (Collins et al., 2001; Hacking & Hull, 2002). A proteína G não é essencial à replicação viral *in vitro*; todavia, a mesma parece desempenhar importante papel na infecção *in vivo* (Karger et al., 2001).

A proteína SH é uma proteína pequena, integral de membrana, inserida no envelope viral, sua região C-terminal é voltada ao compartimento interno do envelope, correspondente à face citoplasmática da membrana (Collins et al., 2001). A mesma pode ser encontrada em quatro formas diferentes: SH₀, SH_G, SH_P e SH_T (Collins et al., 2001). Tais conformações, exceto SH_T, são encontradas nas células infectadas associadas entre si na forma de oligômeros (Perez et al., 1997), os quais se acumulam nas membranas do Complexo de Golgi formando estruturas do tipo *lipid-raft* e a expressão de tais proteínas é capaz de alterar a permeabilidade de membrana. A função exata da proteína SH ainda permanece desconhecida; entretanto, a expressão da mesma em sistemas heterólogos induz a um desequilíbrio osmótico na célula que a expressa, sugerindo que a proteína SH forme canais de membrana, modificando também as propriedades do Complexo de Golgi (Rixon et al., 2004).

A proteína de matriz (M) é uma proteína pequena não-glicosilada, interna à partícula viral, sendo composta por 256 aa (Collins et al., 2001). A proteína M tem como função promover a associação do nucleocapsídeo com o envelope viral nascente (Ghildyal et al., 2002; Easton et al., 2004). A proteína possui um domínio hidrofóbico localizado na porção C-terminal da molécula, este domínio é responsável pela interação da mesma com membranas da célula hospedeira (Ghildyal et al., 2006).

As proteínas N, P e L são proteínas do nucleocapsídeo viral. A proteína N se liga fortemente ao RNA genômico e antígenômico na formação do nucleocapsídeo resistente a RNases (Collins et al., 2001). A proteína N do hRSV possui alto nível de identidade com aquela encontrada em outros membros do gênero *Pneumovirus*, tais como o vírus da Pneumonia dos camundongos (Barr et al., 1991). A proteína possui regiões específicas na sua sequência de aa que apresentam identidade com as proteínas homólogas do AMPV e hMPV (Li et al., 1996; van den Hoogen et al., 2002; Easton et al., 2004).

A proteína P é uma fosfoproteína que atua como chaperonina para a forma solúvel da proteína N (Collins et al., 2001). A fosforilação da proteína P se deve ao alto teor de serina, constituindo aproximadamente 80% dos 241 aa (Collins et al., 2001). É aceito que a proteína P também atue como co-fator para a polimerase viral após sua fosforilação (Collins et al., 2001). Na ausência de fosforilação da proteína P, a polimerase produz uma série de curtos oligonucleotídeos a partir da extremidade 3' do genoma sugerindo que a proteína P funcional é necessária para converter a polimerase em um complexo estável (Collins et al., 2001). A proteína L é a polimerase viral, componente do complexo RNA polimerase RNA – dependente; a proteína possui 2.165 aa constituintes no hRSV e 2.000 aa constituintes para o hMPV (Randhawa et al., 1996; van den Hoogen et al., 2001).

As proteínas N, P e L são responsáveis e suficientes para a replicação do RNA viral, requerendo a associação da proteína M2-1 (Collins et al., 2001). A proteína M2-1 funciona como um fator de elongação durante o processo de transcrição viral (Collins et al., 2001). A proteína M2-2 tem como função a regulação da síntese do RNA viral (Collins et al., 2001).

As proteínas não-estruturais NS1 e NS2 estão presentes somente nos membros do gênero *Pneumovirus*. As proteínas NS1 e NS2 têm como papel inibir a ação de interferons (IFNs) alfa (α) e beta (β) pela célula hospedeira, por meio do bloqueio da ativação do fator regulatório 3 do IFNs e da inibição da expressão de Stat2, diminuindo a resposta da célula à ação do IFNs (Valarcher et al., 2003).

1.7- Replicação viral

A adsorção desses vírus à célula é mediada pela ligação da proteína G a receptores celulares, os quais ainda não foram identificados; evidências sugerem que se trate de um ou mais glicosaminoglicanos (GAGs) encontrados na matriz extracelular (Krusat et al., 1997; Feldman et al., 2000; Hallak et al., 2000; Collins et al., 2001; Techaarpornkul et al., 2002). Após a ligação da proteína G, a proteína F promove a fusão do envelope viral à membrana celular da célula hospedeira através de um mecanismo no qual se envolve principalmente a porção hidrofóbica amino-terminal de F1. O processo de fusão introduz o nucleocapsídeo viral dentro do citoplasma da célula hospedeira. A replicação se inicia com a transcrição do genoma viral pela polimerase (Collins et al., 2001). Os genes são transcritos de forma sequencial a partir da extremidade 3', onde se localiza o promotor viral, terminando e reiniciando a cada uma das junções intergênicas. A expressão de cada mRNA está relacionada com a posição do gene no sentido 3'→5', ocorrendo um maior acúmulo dos mRNAs tanto mais próximos se encontram do promotor viral (Collins et al., 2001; Krempl et al., 2002). Na junção entre a região intergênica não-transcrita e o gene seguinte, o complexo polimerase reinicia a transcrição, pelo reconhecimento de sítios indutores da replicação que estão presentes na região inicial de cada gene. Durante o processo de transcrição ocorre a síntese de mRNAs antigenômicos, que são cópias complementares completas do genoma viral, com adição de um sítio CAP na extremidade 5'. Durante a atividade antiterminação durante o processo de transcrição, ocasionalmente acontece uma falha do complexo RNA polimerase em reconhecer o sinal de terminação dos genes localizados mais próximo à extremidade 5', no que pode resultar no acúmulo de mRNAs próximos à extremidade 3' (Easton et al., 2004). Os antigenomas (genoma viral intermediário positivo) são 10 a 20 vezes menos abundantes no citoplasma de uma célula infectada que o genoma viral propriamente dito (Collins et al., 2001).

A montagem dos nucleocapsídeos acontece no citoplasma, sendo que a mesma acontece em etapas distintas. Primeiramente ocorre com a associação da proteína N aos genomas ou antigenomas, formando o complexo ribonucleoproteína (RNP) subsequente às proteínas P e L se associam ao complexo formando o nucleocapsídeo. A proteína M

direciona os nucleocapsídeos as regiões da membrana celular onde se localizam as glicoproteínas virais, já modificadas durante o seu transporte através do retículo endoplasmático e complexo de golgi. O nucleocapsídeo alcança a superfície viral realizando então o processo de brotamento da partícula viral, com a liberação do vírus, no qual este adquire o envelope protéico na superfície da célula hospedeira (Wechsler et al., 1985; Kingsbury, 1990).

1.8- Variabilidade Genética do hRSV

A variabilidade antigênica entre os isolados de hRSV foi observada primordialmente ao comparar os isolados Long (1956) e CH 18537 (1962) através da reação de neutralização cruzada (Coates et al., 1963). Diferenças antigênicas entre vírus isolados no mesmo ano em diferentes países sugerem a circulação simultânea de diversas variantes antigênicas pelo mundo (Doggett & Taylor-Robinson, 1965).

A aplicação de anticorpos monoclonais (Mab) contra as proteínas F, G e N do hRSV permitiu observar a existência de variações antigênicas e estabelecer a divisão em dois grandes subgrupos relatados por Anderson et al. (1985). Mufson et al. (1985) identificou as amostras A2 e Long como pertencentes ao subgrupo A e CH18537 e SW8/60 ao subgrupo B. As principais diferenças encontradas entre os isolados foram observadas na glicoproteína G, revelando um alto número de variantes desta quando comparadas com as outras proteínas virais (Sullender et al., 2000).

Comparações entre seqüências de nucleotídeos foram realizadas posteriormente entre os dois subgrupos (Johnson et al., 1987). A glicoproteína G das amostras referência do subgrupo A foram comparadas entre si, apresentando 6% de diferenças em suas seqüências de aa enquanto a comparação entre os subgrupos A e B apresentaram 44 a 47% de diferenças. A mesma comparação foi realizada com as amostras referência do subgrupo B, no qual apresentaram 2% de diferenças em suas seqüências de aa (Sullender et al., 1990). O reconhecimento da variabilidade do gene da glicoproteína G entre os subgrupos permitiu o desenvolvimento de novas técnicas para diferenciação entre ambos. A técnica

de PCR (Reação em cadeia da polimerase) foi desenvolvida para o subgrupo A e B utilizando primers específicos, os quais se anelavam com o gene G e F de ambos os subgrupos, deste modo permitindo a detecção da variabilidade genética entre os subgrupos (Sullender et al., 1993).

Estudos subseqüentes demonstraram que 51% das mudanças de nucleotídeos resultaram em mudanças de aa, sugerindo uma possível pressão seletiva para as diferenças observadas na proteína G (Sullender et al., 1993). Baseados nas análises filogenéticas de seqüências de nucleotídeos do gene da proteína G foram identificados 5 genótipos e 22 subtipos pertencentes ao subgrupo A e 4 genótipos e 6 subtipos pertencentes ao subgrupo B (Sullender et al., 2000).

1.9- Epidemiologia da infecção pelo hRSV

A transmissão do hRSV ocorre através do contato direto com secreções de pessoas infectadas ou objetos contaminados. O hRSV está associado a bronquiolite e pneumonia durante os primeiros anos de vida. Bronquiolite e pneumonia ocorrem mais frequentemente entre 6 semanas de vida e 9 meses, com pico de incidência de infecções do trato respiratório inferior entre 2 e 7 meses, correspondendo à diminuição dos títulos de anticorpos maternos. Após infecção natural pelo hRSV, a proteção contra reinfecções é de curta duração e as reinfecções são frequentemente observadas em crianças menores de 2 anos. Reinfecções em adultos também ocorrem, porém com sinais clínicos brandos, sugerindo que a severidade da doença diminui após reinfecções consecutivas (Van der Poel et al., 1994).

No Brasil, nas cidades do Rio de Janeiro, Porto Alegre e Ribeirão Preto foram observados os padrões de circulação do hRSV e co-circulação de ambos os grupos, alternância de predominância dos subgrupos A e B de ano para ano (Siqueira et al., 1991; Stralioto, et al, 2001; Cintra et al., 2001). Na cidade de Salvador Moura et al. (2004) através de análises filogenéticas identificou a presença dos dois subgrupos e os genótipos GA2, GA5 e GA7 (subgrupo A), SAB3 e GB3 (subgrupo B) circulantes no Brasil.

1.10- Manifestações clínicas da infecção pelo hRSV

O vírus replica-se nas células do trato respiratório, onde causa um processo inflamatório, que inclui destruição do epitélio, edema e aumento de produção de muco. Após um período de incubação médio de 3-5 dias, o quadro clínico inicia-se com sintomas das vias aéreas superior, e progride com o acometimento das vias aéreas inferior, sendo a bronquiolite a doença mais frequentemente encontrada. Quadros clínicos mais graves, são caracterizados por apnéia ou insuficiência respiratória grave, predominantemente obstrutivos, ocorrem principalmente em crianças menores de 6 meses de idade, prematuras e nas portadoras de doenças prévias, como cardiopatias congênitas, pneumopatias e imunodeficiências (Collins et al., 2001).

1.11- Epidemiologia da infecção pelo hMPV

A presença do hMPV tem sido descrita mundialmente com incidência do vírus em 1,5% a 41% dos casos estudados (Nissen et al., 2002; Maggi et al., 2003). No Brasil, um estudo realizado por Cuevas et al (2003) na cidade Aracaju, região Nordeste do país, observou-se que 17% dos casos de infecções virais estudados foram causadas pelo hMPV e 7% dos casos apresentaram co-infecção com o hRSV. Outro estudo realizado na cidade de Curitiba, na região Sul do país, observou-se a presença do hMPV em 6,4% dos casos estudados (Debur et al., 2007).

A infecção pelo hMPV é descrita como sazonal, apresentando as mesmas características do hRSV, com aumento da incidência nos meses de inverno (Peret et al., 2000; van den Hoogen et al., 2004).

Baseado em seqüências do genoma e análises filogenéticas foram identificados dois genótipos, denominados A e B, e estes apresentam ainda dois subgrupos cada: A1, A2 e B1, B2, respectivamente (Mackay et al., 2006). A predominância dos genótipos circulantes do hMPV na comunidade pode ser determinada por variações nas seqüências dos aa dos genes das proteínas de superfície G e F (Mahalingam et al., 2006).

1.12- Manifestações clínicas da infecção pelo hMPV

Os sintomas clínicos observados em crianças infectadas com hMPV são similares aos observados na infecção pelo hRSV. Crianças infectadas pelo hMPV apresentam um aumento dos níveis de IL-8 nas secreções respiratórias (Jartti et al., 2002). Alguns estudos têm relatado a associação do hMPV com a potencialização de crises de asma em crianças e adultos requerendo a hospitalização (Willians et al., 2005; Kahn, 2006).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivos gerais

- Investigar a presença e análise filogenética dos principais agentes virais respiratórios, hRSV e hMPV, em amostras de secreção nasofaríngea coletadas de crianças 0 a 12 meses com sintomatologia clínica, na região de Campinas, São Paulo.

2.2- Objetivos específicos

- Detecção do vírus hRSV e hMPV através de RT-PCR e RT-nested-PCR;
- Análise genética baseada nos genes das proteínas F e G do hRSV e F do hMPV através do sequenciamento, com vistas a caracterizar os genótipos circulantes em pacientes atendidos na região de Campinas, São Paulo; Brasil.

3- CAPÍTULO

CAPÍTULO 1

GENETIC VARIABILITY IN THE G PROTEIN GENE OF HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS ISOLATED FROM CAMPINAS METROPOLITAN REGION, BRAZIL

Luciana Helena Antoniassi da Silva, Fernando Rosado Spilki, Adriana Gut Lopes Riccetto,
Renata Servan de Almeida, Emílio Carlos Elias Baracat, Clarice Weis Arns

Aceito para publicação, Journal of Medical Virology

**GENETIC VARIABILITY IN THE G PROTEIN GENE OF HUMAN
RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS ISOLATED FROM CAMPINAS
METROPOLITAN REGION, BRAZIL**

Luciana Helena Antoniassi da Silva ^{a, b}, Fernando Rosado Spilki ^{b, c}, Adriana Gut Lopes
Ricetto ^d, Renata Servan de Almeida ^e, Emílio Carlos Elias Baracat ^d, Clarice Weis Arns ^{b*}

^a Faculdade de Ciências Médicas, Programa Pós Graduação - Clínica Médica – UNICAMP, Campinas, Brazil

^b Laboratório de Virologia Animal, Instituto de Biologia Unicamp, Depto. de Microbiologia e Imunologia -
UNICAMP, Campinas, Brazil

^c Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Campus II, Novo Hamburgo, Brazil

^d Hospital das Clínicas, Faculdade de Ciências Médicas, Depto. de Pediatria – UNICAMP, Campinas, Brazil

^e Contrôle des Maladies Animales Exotiques Emergentes, CIRAD, Département Systèmes Biologiques,
Campus International de Baillarguet, Montpellier, France

*Corresponding author. Present address: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109,
CEP 13081-970 Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 35216258; fax 19 35216276.

E-mail address; arns@unicamp.br (C.W.Arns)

ABSTRACT

Human respiratory syncytial virus (hRSV) is recognized as the most important viral agent of serious respiratory tract diseases in the pediatric population worldwide. A prospective study for hRSV was conducted in children ageing less than one year admitted in two university hospitals in Campinas, São Paulo, Brazil.

The aim of the present study was to investigate the genetic variability of both A and B subgroups of hRSV isolated during an epidemic period in the Campinas metropolitan region, Brazil, by sequencing a variable region of the G protein gene.

Phylogenetic trees were constructed from alignments of sequences available in the GenBank database and Brazil isolates for hRSV A and B.

The data demonstrates that Brazilian isolates clusters together with A and B viruses from Kenya, New Zealand, South Africa, West Virginia, United States (CH, Rochester), and other Brazilian isolates. Phylogenetic analysis of subgroup A isolates showed that the sequences obtained on the present study falls on three clusters, namely GA2, GA5 and SAA1 that co-circulate during the analyzed period. Subgroup B isolates detected belongs to three genotypes, GB3 (SAB3) and BA (BAIII). In the present study, two of the viruses detected showed such 60-nt duplication were included in the BA subgroup on the phylogenetic analysis, which corroborates the circulation of this genetic subgroup in Southeastern Brazil.

This is one of the first reports of the molecular epidemiology of hRSV strains from the Campinas metropolitan region, São Paulo state, Brazil. And also is the first description of the circulation pattern of hRSV genotypes in two university hospitals, revealing interesting differences between the two subgroups of the virus.

Keywords: Human respiratory syncytial virus; genetic variability; phylogenetic analysis

INTRODUCTION

Human respiratory syncytial virus (hRSV), a member of the genus *Pneumovirus*, family *Paramyxoviridae*, is recognized as the most important viral agent of serious respiratory tract diseases in the pediatric population worldwide (Collins et al., 2001). It is also recognized as an important respiratory pathogen in elderly and immunocompromised individuals, as well as in patients with cardiopulmonary disease, (Falsey et al., 2000). The burden of illness is most significant for infants less than 2 years of age and increases health-care costs both at the community level and following hospitalization (Joffe et al., 1999; Marchetti et al., 1999; Paes et al., 2003).

Children infected with one antigenic subgroup are more likely to be reinfected with the heterologous subgroup (Mufson et al., 1987; Sullender et al., 1991; Waris et al., 1991; Sullender et al., 1998; Sato et al., 2005; Parveen et al., 2006a). This may have an influence on the epidemiology of the infection, since previous reports have shown that subgroups of hRSV may have different patterns of circulation both in different years and countries. It can be found in three different scenarios: only viruses from one subgroup are detected, one of the subgroups is predominant (more frequently subgroup A), and both subgroups cocirculate with a similar frequency (Viegas et al., 2005).

The two principal antigenic hRSV subgroups are A and B, and they have been identified on the basis of reactivity with monoclonal antibodies for major structural glycoproteins G and F (Anderson et al., 1985; Mufson et al., 1985).

A number of studies based on nucleotide and deduced amino sequences of genes and its respective protein products, specially nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), small hydrophobic (SH) protein, fusion protein (F) and attachment (G), have confirmed the division of hRSV into two major subgroups (A and B) and also identified numerous variants or lineages within each subgroup (Johnson et al., 1987; Cane and Pringle, 1991; Sullender et al., 1991; Sanz et al., 1994; Peret et al., 1998; Sullender, 2000). The greatest genetic and antigenic differences among the two subgroups are identified in the G protein gene and its corresponding protein. The variability of this protein is concentrated in the ectodomain, which consists of two variable regions separated by a conserved central region of 13 amino acids (positions, 164-176) and four closely positioned cysteins (C¹⁷³, C¹⁷⁶, C¹⁸²

and C¹⁸⁶), present in both subgroups (Cane et al., 1991; Collins et al., 2001). The second variable region, near to the C-terminal portion of the protein, has been reported to representatively reflects the entire G-gene variability and thus, has been used in phylogenetic analysis for molecular epidemiology studies (Rueda et al., 1995; Melero et al., 1997; Viegas et al., 2005).

In Brazil, studies have identified the simultaneous circulation of hRSV subgroups in different years in the Northern, Southeastern, Northeastern and Southern regions (Melo et al, 1992; Siqueira et al., 1991; Stralioto et al., 1994; 2001; Moura et al., 2004). The aim of the present study was to investigate the genetic variability of both A and B subgroups of hRSV isolated during an epidemic period in the Campinas metropolitan region, Brazil, by sequencing a variable region of the G protein gene. Isolates were also compared with hRSV from Europe, North and South America, and South Africa through phylogenetic analysis.

MATERIAL AND METHODS

Patients

A prospective study for hRSV was conducted in children ageing less than one year admitted in two university hospitals in Campinas, São Paulo, Brazil, namely the Clinical Hospital (HC) and Sumaré Hospital (HS). The local Research Ethics Committee approved the research project. From April to September 2004, 142 nasopharyngeal aspirates were collected from infants with the initial diagnosis of acute respiratory infections (ARI), based on clinical symptoms of tachydyspnea, abnormal lung sounds and pulse oximetry lower than 95%. Detailed clinical histories were obtained during the admission at the respiratory ward of pediatric hospitals. In all cases, parents or guardians signed an informed consent (Ricetto et al., 2006).

Virus Isolation

All nasopharyngeal aspirates were inoculated in HEp-2 cells cultures for virus isolation. The specimens were inoculated in duplicate into preformed cell monolayers. Successive passages were conducted, always using Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) for dilution of the samples and maintenance of the cells. Typical cytopathic effects (CPE) were observed daily until 7 days post-inoculation. Cultures that did not show CPE 7 days post-infection were further submitted to at least six blind passages as described.

RNA Extraction and Viral nucleic acid amplification

RNA was extracted from infected HEp-2 cultures and directly from nasopharyngeal aspirates using High Pure Viral Nucleic extraction kit™ (Roche Diagnostics™, Mannheim, Germany). cDNA was synthesized using High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems™, Foster City, USA). Both procedures were performed according to the manufacturer's instructions.

All samples were investigated for hRSV using amplification of specific genome fragments. The second hypervariable region of the G protein gene was the target for polymerase chain reaction. The forward primer Gr5 (5'-CTGGCAATGATAATCTCAACTTC-3'), (Sanz et al., 1994; Wertz et al., 1985) corresponds to bases 151-173 of the gene G protein. The reverse primer, FV (5'-GTTATGACTGGTATACCAACC-3'), (Zheng et al., 1996; Parveen et al., 2000) corresponds to bases 163-186 of the F gene of strain 18537 (with one mismatch site with the F protein gene of strain 2, underlined), and has previously been used to amplify the G protein gene from both groups (Sullender et al., 1993; Parveen et al., 2000).

PCR was done in 5µl mixture containing 2,5µl of 10X PCR buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl and 0,2mM MgCl₂), 1µl of a 10mM dNTPs mixture, 10µM of each primer, 2,5µl of cDNA, and 1µl (1U/µl) of Taq DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain™). The amplification was done for 35 cycles, each of them composed of

1 min at 94°C (denaturation), 1 min at 55°C (annealing), and 1 min at 72°C (extension). After completion of the 35 cycles, a final extension of 7 min at 72°C was performed. A second step of semi-Nested PCR was done from the amplified products of template the first-round using forward primer Gr5 for subgroup A and B and F1 (5'-CAACTCCATTGTTATTTGCC-3'), (Peret et al., 1998) corresponds to bases 3-22 of the F gene the reaction conditions were the same of the first step of the PCR. The amplified products of semi-Nested PCR of 900bp for subgroup A/B. The PCR products were run on 1.5% agarose gel and visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

Sequencing and phylogenetic analysis

PCR products were sequenced three times each, both in forward and reverse directions using ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems™, Foster City, USA). The BioEdit software, version 7.0.5.2 (Hall et al., 1999), was used to manipulate the nucleotide and amino acid retrieved sequences. The sequence alignments were performed using the Clustal W software, version 1.83, (Thompson et al., 1994) using full alignment and a number of 2000 total replication on the bootstrap in order to ensure a higher level of confidence to our analysis (Thompson et al., 1994).

Phylogenetic analyses were performed using neighbor-joining as implemented in MEGA version 4 software package, (Tamura et al, 2007) based on the Kimura two-parameter distance estimation method. Bootstrap re-sampling was performed for each analysis (500 replications). Reference subgroup A nucleotide sequences were retrieved from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) including sequences obtained

from viruses circulating in Argentina (ARG), Kenya (Ken), New Zealand (NZA), Salvador, Brazil (Sal), South Africa (SA), West Virginia (WV), United States (AL, Alabama; CH, Rochester, NY, New York; TX, Texas), Montevideo, Uruguay (Mon). Subgroup B nucleotide sequences were also retrieved for comparison Sw8/60 standard strain and nucleotide sequences from viruses circulating in different geographic locations, such as Montevideo, Uruguay (Mon), West Virginia (WV), South Africa (SA), Kenya (Ken), United States (CH, Rochester, NY, New York; TX, Texas), Argentina (BA), New Zealand (NZA), Mozambique (Moz), Salvador, Brazil (Sal), Belgian (BE) and, used as outgroup subgroups A and B, respiratory syncytial virus. The number of accession for these subgroup A and B sequences are depicted in brackets on phylogenetic trees (figures 2A and 2B). The hRSV nucleotide sequences obtained have been submitted to the GenBank.

RESULTS

Nucleic acid detection of hRSV and virus isolation

Forty-eight (34%) infants were found to be positive for hRSV infection by using RT-PCR directly from the nasopharyngeal aspirates. Out of which twenty-three virus strains were isolated in HEp-2 cells. All virus strains were isolated after three blind passages with initial rounding of cells followed by formation of syncytia after 5 – 7 days of inoculation.

Age and monthly distribution of hRSV infections

The mean age of 142 the patients with the initial diagnosis of (ARI) were 4, 4 months, of 86 males (61%) and 56 (39%) females. hRSV infections were found between April and August (Fig. 1A). A higher number of confirmed hRSV cases occurred in May, followed by June, and April.

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were conducted for 23 sequences obtained. From these, 15 belong to hRSV genetic subgroup A and 8 to subgroup B (Fig. 2A and 2B). The dendrogram obtained provides further support for the view that multiple hRSV lineages may co-circulate within a community, and that independent lineages may be widely distributed geographically (Sanz et al., 1994; Anderson et al., 1991).

Brazilian isolates clusters with different genotypes from Argentina, Kenya, New Zealand, South Africa, Salvador, Brazil and West Virginia, United States (CH, Rochester). Phylogenetic analysis of subgroup A isolates showed that the sequences obtained on the present study falls on three clusters, namely GA2, GA5 and SAA1 that co-circulate during the analyzed period (Fig. 1B and 1C). One isolate belong to the genotype SSA1. This genotype was previously identified in South Africa (Venter et al. 2001). Subgroup B isolates detected belongs to three genotypes, GB3 (SAB3, A22, A26, A32 and A39) and BA (BAIII, A18 and A27). Two isolates (A18, A27)) with 60 nucleotide (nt) duplication at position 781-840 of the G gene. Trento et al. (2003) reported three subgroup B strains (BA viruses) isolated in Buenos Aires, Argentina. These sequences had the identical duplication of 60 nt at the C-terminal third of the G protein gene.

A three-nucleotide insertion (TCG, codifying for serine), at position 653 to 656 of the G gene was identified in the sequence A39. Two isolates A15 and A 19 are located near SAB1 and URU2 genotypes. The genotype SAB3, previously related reported in South Africa (Venter et al., 2001) and Salvador, Brazil (Moura et al., 2004), was also found for sequences A22, A26, A32 and A39.

Distribution of the hRSV infections according to the months analyzed and the presence of subgroups A and B are shown in figure 1B. Both subgroups co-circulated

during the months analyzed, while the subgroup A was present during the months April and July and subgroup B during the months May and June.

DISCUSSION

Previous studies on genetic variability of subgroups A and B of human respiratory syncytial virus from other countries have identified two main branches and several sub-branches of genotypes (Choi and Lee, 2000; Frabasile et al., 2003; Moura et al., 2004).

These studies revealed a predominant lineage in each epidemic season (Choi and Lee, 2000). Several factors may be enrolled to determine the patterns of seasonal circulation and genetic evolution of hRSV strains. These include infectivity of the virus, the development of immunological resistance in the community, and viral genetic drift due to spontaneous mutation (Sullender, 2000).

From the phylogenetic analysis of hRSV subgroup A isolates, our results agree with those reported by researchers from different countries in the last years (Viegas et al., 2005). From genome sequences from other countries, like Argentina and Kenya, and previously reported isolates from Brazil, researchers described that the most frequently genotypes found were GA2 and GA5. Venter et al. (2001) reported dominance of the GA2 genotype in South Africa for two seasons and Choi and Lee (2000) found that most of the predominant genotypes were isolated in more than two consecutive epidemics. In a recent study from Belgium on 112 virus strains, it was reported that the GA2 and GA5 genotypes were predominant and co-circulated in 10 of 19 epidemics between 1983/1984 and 2000/2001 (Rafiefard et al., 2004). Another study from Belgium, from samples obtained during 10 successive epidemic seasons, showed a 3-year cyclic pattern for occurrence and re-emergence of different genotypes. GA5 remained the dominant hRSV genotype in two

subsequent epidemic seasons during the study period (Zlateva et al., 2007). This genotype was reported to be predominant among hRSV A strains during three consecutive seasons in a community in Japan (Sato et al., 2005) and India (Parveen et al., 2006a), and was the most representative hRSV A genotype in Sweden (Rafiefard et al., 2004) and New Zealand in recent years (Matheson et al., 2006; Zlateva et al., 2007). A similar occurrence of subgroup A genotypes was described in Argentine and Montevideo, Uruguay (Frabasile et al., 2003; Galiano et al., 2005). The 60-nucleotide duplication starts on nucleotide position 792 of G protein gene on the reference strain 18537 and is predicted to lengthen the G protein by 20 amino acids (Parveen et al., 2006b). The BA genotype appears to be spreading globally and has also been reported in Japan (Nagai et al., 2004; Sato et al., 2005; Kuroiwa et al., 2005), Kenya (Scott et al., 2004), Belgium (Zlateva et al., 2005), Canada, Brazil, the United Kingdom, and The United States (Trento et al., 2006). In the present study, two of the viruses detected showed such 60-nt duplication (A18, A27) were included in the BA subgroup on the phylogenetic analysis, which corroborates the circulation of this genetic subgroup in Southeastern Brazil. Comparisons of BA subgroup from around the world showed that all of the subgroup BA strains contained the 60-nucleotide duplication.

Paradoxally, from the findings reported it is noticeable that, in a relatively short time frame in a well defined geographic region, we were able to observe an enormous amount of diversity between the hRSV strains detected. Another interesting finding is that the phylogenetic characterizations of such viruses, by means of comparison with its counterparts recently isolated in near Salvador, Brazil, Argentina or as far as Kenya or New Zealand and South Africa, are presenting some degree of relatedness with these viruses. It seems that the circulation of the different hRSV genetic subgroups is worldwide, and the

genetic relationships among the isolates are rather determined by temporal features than to geographic barriers.

It has been suggested that those genetic differences may favor virus to escape from the host immune response and contribute to the capability of hRSV in establishing re-infections throughout life (Viegas et al., 2005). This is one of the first reports of the molecular epidemiology of hRSV strains from the Campinas metropolitan region, São Paulo state, Brazil. And also is the first description of the circulation pattern of hRSV genotypes in two university hospitals, revealing interesting differences between the two subgroups of the virus. Differences in clustering, nucleotide insertions and duplication are pertinent to group B. Many aspects of viral biology may contribute to the observed genetic differences and determining their nature may be useful for the design of future hRSV vaccines, as well as the development of novel prevention or treatment strategies.

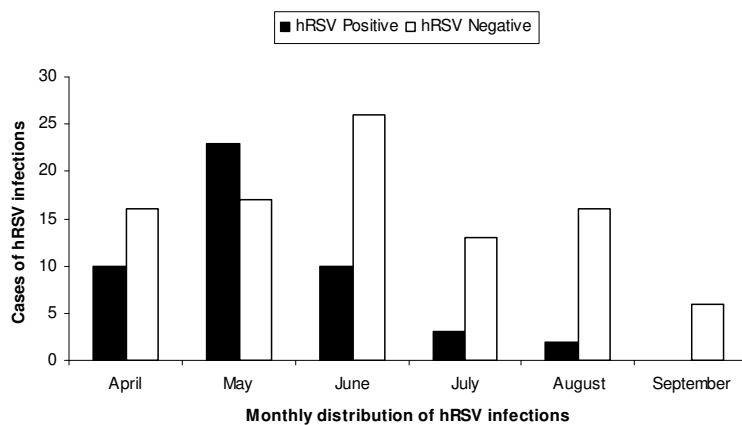
Figure captions

Figure 1

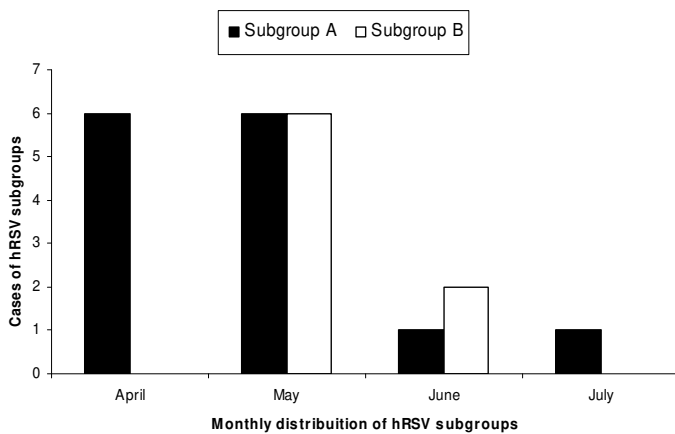
- A. Monthly distribution of respiratory syncytial virus (hRSV) in infants under 12 months old presenting acute lower respiratory tract infection. Samples and data collected from two university hospitals in Campinas (São Paulo, Brazil) between April and September 2004.
- B. Monthly distribution of subgroups A and B respiratory syncytial virus (hRSV) in Campinas (São Paulo, Brazil) between April and July 2004.
- C. Monthly distribution of subgroups A and B genotypes of respiratory syncytial virus (hRSV) in Campinas (São Paulo, Brazil) between April and July 2004.

Figure 2. Phylogenetic tree prepared with the G protein gene nucleotide sequences of Brazilian isolates of subgroup A (2A) and isolates of subgroup B (2B) and worldwide distributed strains of hRSV. For the parameters used to measure genetic relationships please refer to the text. GenBank accession numbers are given in each taxon and the correspondent name of the strain is shown in brackets. The previously described Brazilian strains are narrowed with a blue lozenge, the isolates characterized in the present work are assigned with a red lozenge; the tree was rooted using a BRSV sequence.

1A



1B



1C

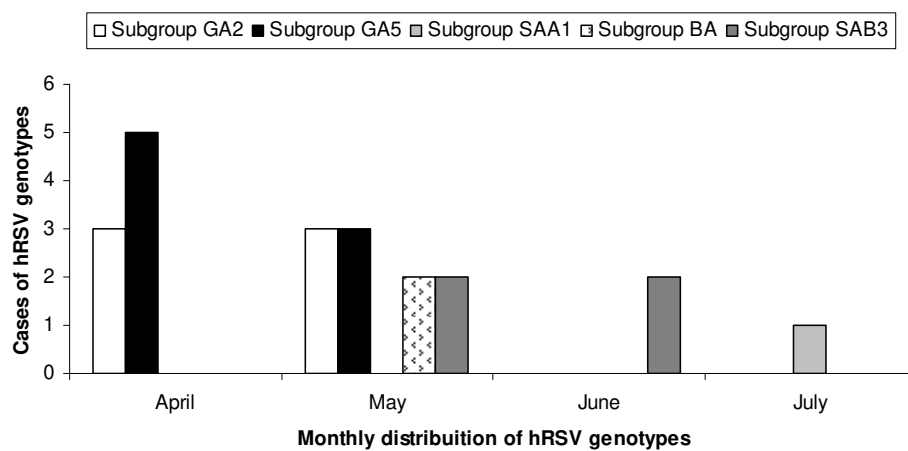


Figure 2A

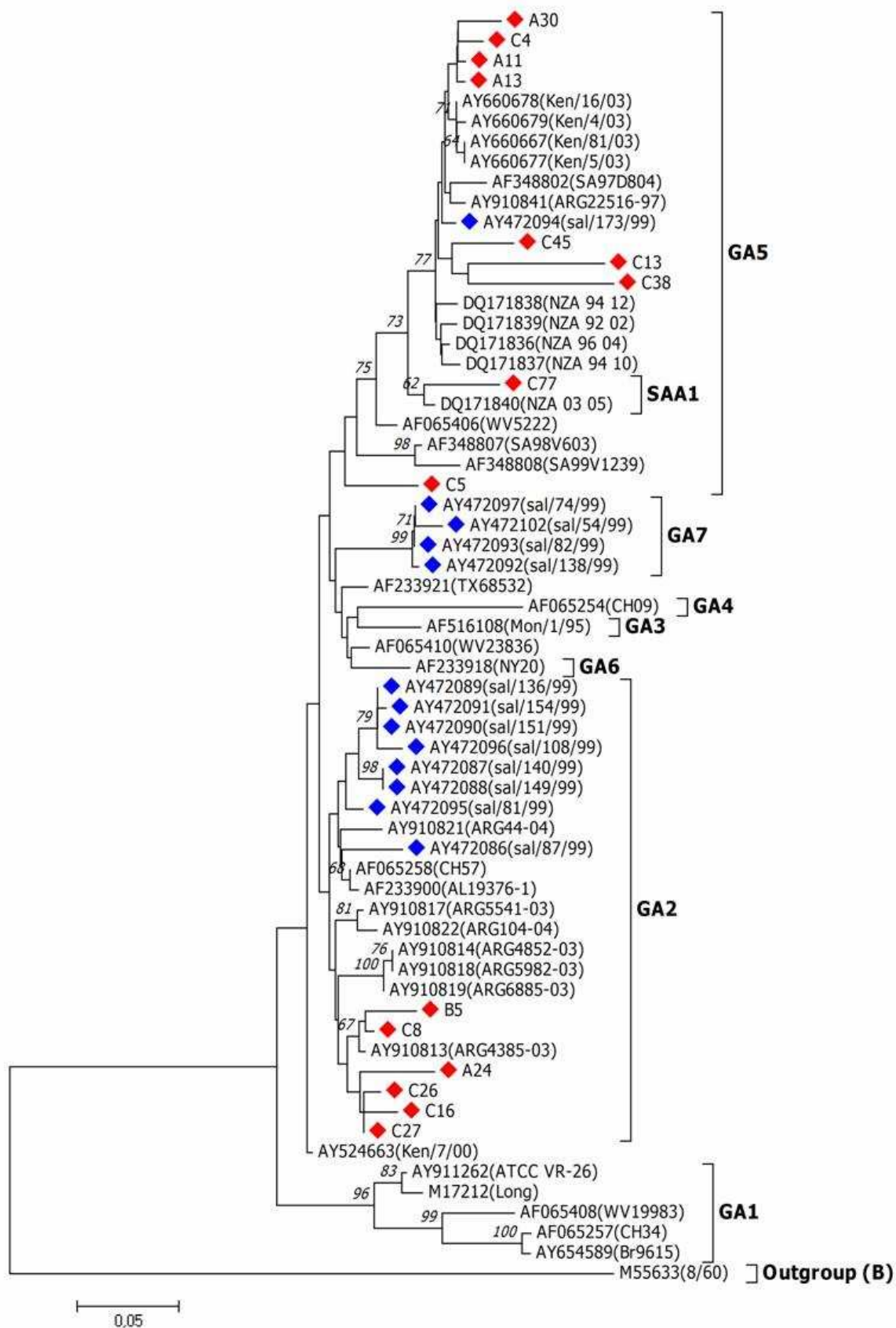
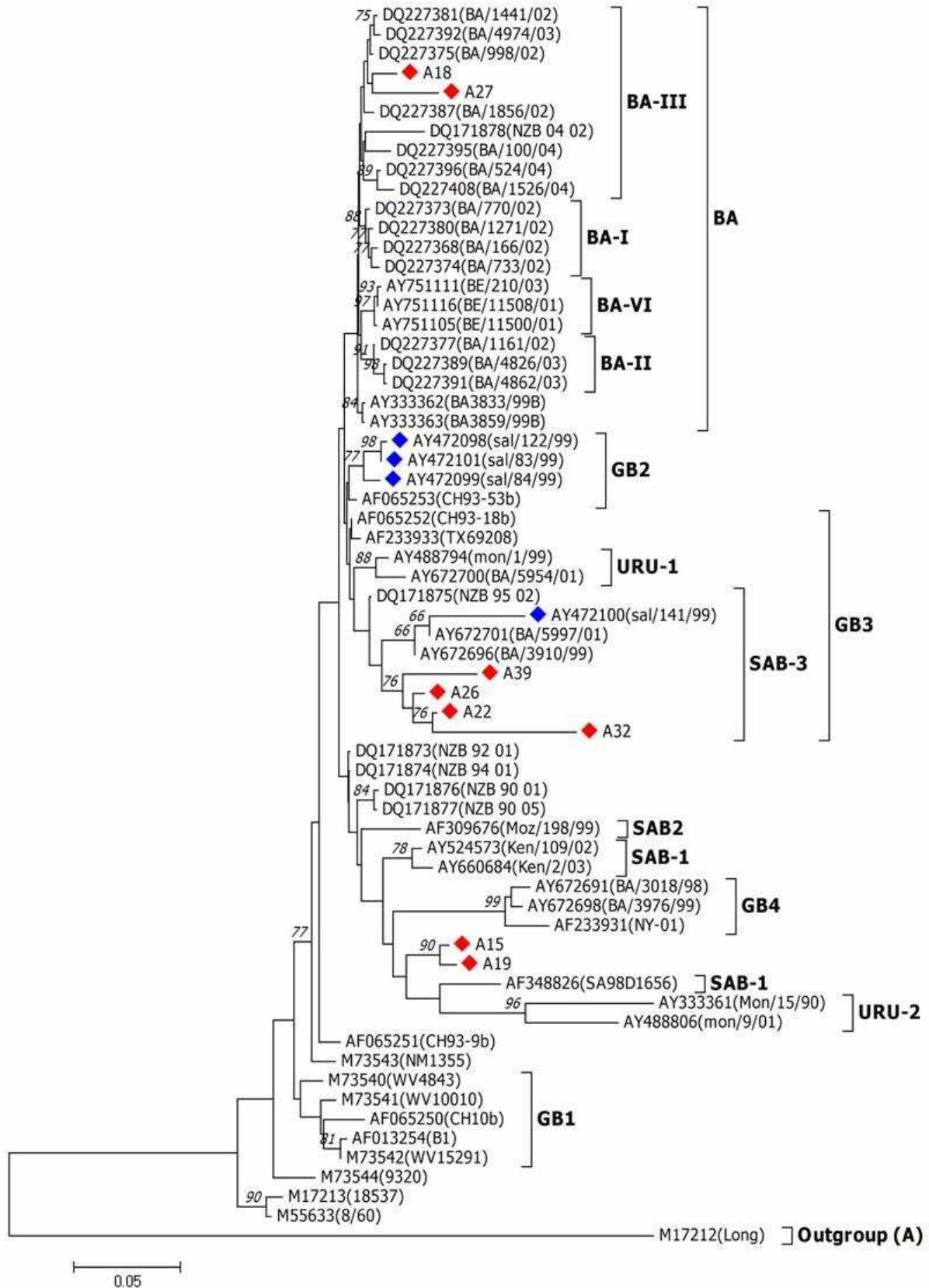


Figure 2B



REFERENCES

- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K. 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 151:626-633.
- Anderson LJ, Hendry RM, Piedik LT, Tsou C, McIntosh K. 1991. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J Inf Dis* 163:687-692.
- Cane PA, Matthews D, Pringle C. 1991. Identification of variable domains of attachment G protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J Gen Virol* 72:2091-2096.
- Choi EH, Lee HJ. 2000. 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 Inf Dis* 181:1547-1556
- Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. 2001. Respiratory syncytial virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors *Fields virology*, 4th edn. Lippincott-Williams and Wilkins, Philadelphia: p1443-1486.
- Falsey AR, Wash EE. 2000. Respiratory Syncytial Virus Infections in Adults. *Clin Microb Rev* 13: 371-384.
- Frabasile SA, Facal DL, Videla M, Galiano M, Sierra MJ, Ruchansky D, Viturera N, Berois M, Carballa G, Rossi J, Arbiza J. 2003. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina: 1993-2001. *J Med Virol* 71:305-312.
- Galiano M, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. 2005. Genetic and

- Antigenic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus (Groups A and B) Isolated over Seven Consecutive Seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Microb* 43:2266-2273.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Joffe S, Ray GT, Escobar GJ, Black SB, Lieu TA. 1999. Cost-effectiveness of respiratory syncytial virus prophylaxis among preterm infants. *Ped* 104: 419-427.
- Johnson PR, Olmsted RA., Collins PL. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: Extensive sequence divergence antigenically related proteins. *Proc Nat Acad Sci* 84:5625-5629.
- Kuroiwa Y, Nagai L, Okita I, Kase T, Nakayama Tsutsumi H. 2005. A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses group A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002. *J Med Virol* 76:241-247.
- Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1987; 68: 2521:2524.
- Marchetti A, Lau H, Magar R, Wang L, Devercelli G. 1999. Impact of palivizumab on expected costs of respiratory syncytial virus infection in preterm infants: potential for savings. *Clin Ther* 21:752-766.
- Matheson JW, Rich FJ, Cohet C, Grimwood K, Hung QS, Penny D, Hendy MD, Kirman J. 2006. Distinct patterns of evolution between respiratory syncytial virus subgroups A and B from New Zealand isolates collected over thirty years. *J Med Virol* 78:1354-1364.

- Melero JA, García-Barreno B, Martínez I, Pringle CR, Cane PA. 1997. Antigenic structure, evolution, and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment G protein. *J Gen Virol* 78:2411-2418.
- Mello WA, Silva C. 1992. Epidemiological aspects of RSV subgroups in Belém, Brazil. *Bol Lat Ame* 1:8.
- Moura FEA, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, Sierra MJ, Tome L, Ramos AG, Siqueira MM, Arbiza J. 2004. Genetic Diversity of Respiratory Syncytial Virus Isolated During an Epidemic Period from Children of Northeastern Brazil. *J Med Virol* 74:156-160.
- Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrby E. 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 66:2111-2124.
- Mufson MA, Belshe RB, Orvell C, Norrby E. 1987. Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains from children with consecutive infections. *J Clin Microb* 25:1535-1539.
- Nagai K, Kamasaki H, Kuroiwa Y, Okita L, Tsutsumi H. 2004. Nosocomial outbreak of respiratory virus subgroup B variants with the 60 nucleotides-duplicated G protein gene. *J Med Virol* 74:161-165.
- Paes BA. 2003. Current strategies in the prevention of respiratory syncytial virus disease. *Paed Res Rev* 4:21-27.
- Parveen S, Sullender WM, Fowler K, Lefkowitz EJ, Kapoor SK, Broor S. 2000. Genetic Variability in the G Protein Gene of Group A and B Respiratory Syncytial Virus from India. *J Clin Microb* 44:3055-3064.
- Parveen S, Broor S, Kapoor SK, Fowler K, Sullender WM. 2006a. Genetic diversity among respiratory syncytial viruses that have caused repeated infections in children from rural India. *J Med Virol* 78:659-665.

- Parveen S, Sullender WM, Fowler K, Lefkowitz EJ, Kapoor SK, Brorr S. 2006b. Genetic Variability in the G Protein Gene of Group A and B Respiratory Syncytial Viruses from India. *J Clin Micro* 44:3055-3064.
- Peret TCT, Hall CB, Schanabel KC, Golub JA, Anderson L. 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in community. *J Gen Virol* 79:221-2229.
- Rafiefard F, Johansson B, Tecle T, Örvell C. 2004. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) of group A in Stockholm, Sweden, between 1965 and 2003. *Virus Res* 105:137-145.
- Ricchetto AGL, Ribeiro JD, Silva MTN, Almeida RS, Arns CW, Baracat, ECE. 2006. Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Infants Hospitalized for Acute Lower Respiratory Tract Disease: Incidence and Associated Risks. *Braz J Infect Dis* 10(5): 357-361.
- Rueda P, Palomo C, García-Barreno B, Melero JA. 1995. The three C-terminal residues of human respiratory syncytial virus G glycoprotein (long strain) are essential for integrity of multiple epitopes distinguishable by antiidiotypic antibodies. *Virol Immunol* 8: 37-46.
- Sanz MC, Kew OM, Anderson LJ. 1994. Genetic heterogeneity of the attachment glycoprotein G among group A respiratory syncytial viruses. *Vir Res* 33:203-217.
- Sato M, Saito R, Sakai T, Sano Y, Nishikawa M, Sasaki A, Shobugawa Y, Gejyo F, Suzuki H. 2005. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microb* 43:36-40.

- Scott PD, Ochola R, Ngama M, Okiro EA, Nokes DJ, Medley GF, Cane P. 2004. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J Med Virol* 74:344-354.
- Siqueira MM, Nascimento JP, Anderson LJ. 1991. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microb* 29:557-559.
- Straliotto SM, Roitman B, Lima, JB, Fischer GB, Siqueira MM. 1994. Respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis: comparative study of RSV groups A and B infected children. *Rev Soc Bras Med Trop* 27:1-4.
- Straliotto SM, Nestor SM, Siqueira MM. 2001. Respiratory syncytial virus groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswal Cruz* 92:155-158.
- Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. 1991. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J Virol* 65:5425-5434.
- Sullender WM, Sun L, Anderson LJ. 1993. Analysis of respiratory syncytial virus genetic variability with amplified cDNAs. *J Clin Microb* 31:1224-1231.
- Sullender WM, Mufson MA, Prince GA, Anderson LJ, Wertz, GW. 1998. Antigenic and genetic diversity among the attachment proteins of group A respiratory syncytial viruses that have repeat infections in children. *J Infect Dis* 178:925-932.
- Sullender WM. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin Microb Rev* 13:1-15.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.

- Thompson JD, Higgins, DG, Gibson, TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Trento A, Galiano M, Videla C, Caballal G, García-Barreno B, Melero JA, Palomo C. 2003. Mayor changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol* 84:3115-3120.
- Trento A, Viegas M, Galliano M, Videla C Garballal G, Mistchenko AS, Melero JA. 2006. Natural history of human respiratory syncytial virus inferred from phylogenetic analysis of the attachment (G) glycoprotein with a 60-nucleotide duplication. *J Virol* 80:975-984.
- Venter M, Mashi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. 2001. 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: 2117-2114.
- Viegas M, Mistchenko AS. 2005. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004) in Argentina. *J Med Virol* 77:302-310.
- Waris M. 1991. Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: Two-year cycles with alternating prevalence of groups A and B. *J Infect Dis* 163:464-469.
- Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA. 1985. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Natl Acad Sci USA* 82:4075-4079.
- Zheng H, Peret TC, Randolph VB, Cowley JC, Anderson LJ. 1996. Strain-Specific Reverse Transcriptase PCR Assay: Means to Distinguish Candidate Vaccine from Wilde-Type Strains of Respiratory Syncytial Virus. *J Clin Microb* 34:334-337.

- Zlateva KT, Lemey P, Moes E, Vandamme AM, Van Ranst M. Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein. *J. Virol.* 2005; 79; 9157:9167.
- Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaecker N, Naranjo C, Van Ranst M. 2007. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. *J Clin Microb* 45:3022-3030.

CAPÍTULO 2

Short communication

Variant isolates of human metapneumovirus subgroup B genotype 1 in Campinas, Brazil

Luciana Helena Antoniassi da Silva, Fernando Rosado Spilki, Adriana Gut Lopes Riccetto,
Renata Servan de Almeida, Emílio Carlos Elias Baracat, Clarice Weis Arns

Aceito para publicação, Journal of Clinical Virology

**Variant isolates of human metapneumovirus subgroup B
genotype 1 in Campinas, Brazil**

Luciana Helena Antoniassi da Silva ^{a, b}, Fernando Rosado Spilki ^b, Adriana Gut Lopes Riccetto ^c, Renata Servan de Almeida ^d, Emílio Carlos Elias Baracat ^c, Clarice Weis Arns ^{b*}

^a Faculdade de Ciências Médicas, Programa Pós Graduação - Clínica Médica – UNICAMP, Campinas, Brazil

^b Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia Unicamp, Depto. de Microbiologia e Imunologia- UNICAMP, Campinas, Brazil

^c Hospital das Clínicas, Faculdade de Ciências Médicas, Depto. de Pediatria – UNICAMP, Campinas, Brazil

^d Contrôle des Maladies Animales Exotiques Emergentes, CIRAD, Département Systèmes Biologiques, Campus International de Baillarguet, Montpellier, France

*Corresponding author. Present address: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, CEP 13081-970 Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 35216258; fax 19 35216276.

E-mail address; arns@unicamp.br (C.W.Arns)



ELSEVIER

Journal of Clinical Virology xxx (2008) xxx–xxx



www.elsevier.com/locate/jcv

Short communication

Variant isolates of human metapneumovirus subgroup B genotype 1 in Campinas, Brazil

Luciana Helena Antoniassi da Silva^{a,b}, Fernando Rosado Spilki^b,
Adriana Gut Lopes Riccetto^c, Renata Servan de Almeida^d,
Emílio Carlos Elias Baracat^c, Clarice Weis Arns^{b,*}

^a Faculdade de Ciências Médicas, Programa Pós Graduação - Clínica Médica – UNICAMP, Campinas, Brazil

^b Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia Unicamp, Depto. de Microbiologia e Imunologia-UNICAMP, Campinas, Brazil

^c Hospital das Clínicas, Faculdade de Ciências Médicas, Depto. de Pediatria – UNICAMP, Campinas, Brazil

^d Contrôle des Maladies Animales Exotiques Emergentes, CIRAD, Département Systèmes Biologiques, Campus International de Baillarguet, Montpellier, France

Received 12 July 2007; received in revised form 11 October 2007; accepted 6 November 2007

Abstract

Background: Human metapneumovirus (HMPV) is a paramyxovirus associated with respiratory illness. The genotypes of HMPV isolates in Brazil have not been well characterized.

Objectives: To investigate the presence of HMPV in clinical samples collected from pediatric patients of two university hospitals in the region of Campinas (São Paulo, Brazil) and to genotype them by partial sequencing of the HMPV F gene.

Study design: Nasopharyngeal aspirates were collected from children hospitalized between April and September, 2004 because of acute respiratory infections (ARI).

Results: We identified HMPV in 8 of 142 (5.6%) clinical samples. We determined through phylogenetic analysis that HMPV isolates in Campinas during the study were clustered within subgroup B genotype 1. Two of the isolates analyzed showed significant differences from previously isolated B1 viruses, when compared to HMPV isolated in South Africa and Canada, and clustered in a separate branch within this genotype.

Conclusions: In 2004 in our geographic region all HMPV isolates from pediatric patients were in the B1 HMPV genetic group, with two variant isolates.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Human metapneumovirus; Molecular characterization; Genotype B subgroup 1

1. Introduction

Human metapneumovirus (HMPV), a paramyxovirus associated with respiratory illness, was first described in the Netherlands (van den Hoogen et al., 2001). HMPV infections are similar to respiratory syncytial virus (RSV) infections, occurring predominately in childhood during winter months, although severe respiratory tract illness due to HMPV has also

been reported in elderly and immunocompromised patients (Falsey et al., 2006; Englund et al., 2006; Boivin et al., 2007; van den Hoogen, 2007). The genomic organization of HMPV resembles that of Avian Pneumovirus (Collins et al., 2001) and has been assigned to the subfamily *Pneumovirinae*, genus *Metapneumovirus*. Sequence analysis of isolates identified two main genotypes of HMPV, A and B, with the subtypes A1, A2, B1 and B2 (Ishiguro et al., 2004; Gray et al., 2006).

Our objective was to investigate the presence and molecular identity of HPMV isolated from children seen at two university hospitals in the Campinas region of the State of São Paulo, Brazil.

* Corresponding author. Present address: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, CEP 13081-970 Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 35216258; fax: +19 35216276.

E-mail address: arns@unicamp.br (C.W. Arns).

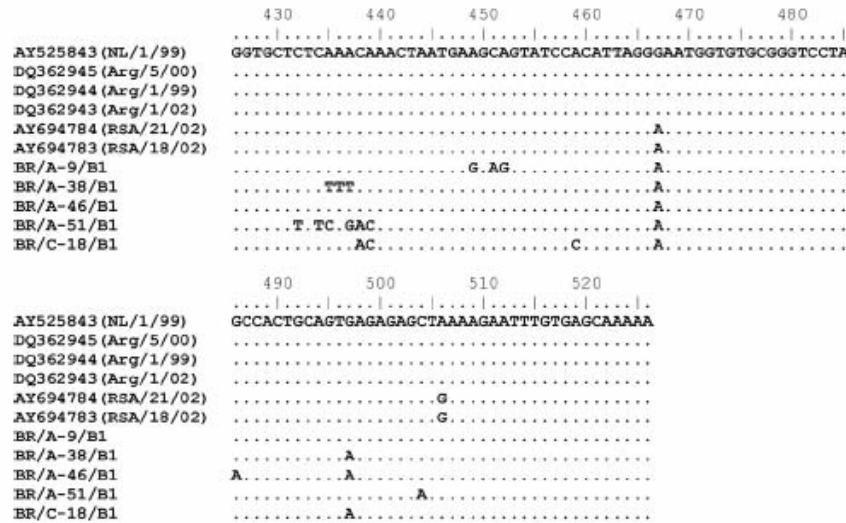


Fig. 1. Alignment showing differences in nucleotide sequence of HMPV F genes from five Brazilian strains of B1 sublineage. Isolates were compared to strains from Netherlands (NL), Argentine (Arg) and South Africa (RSA).

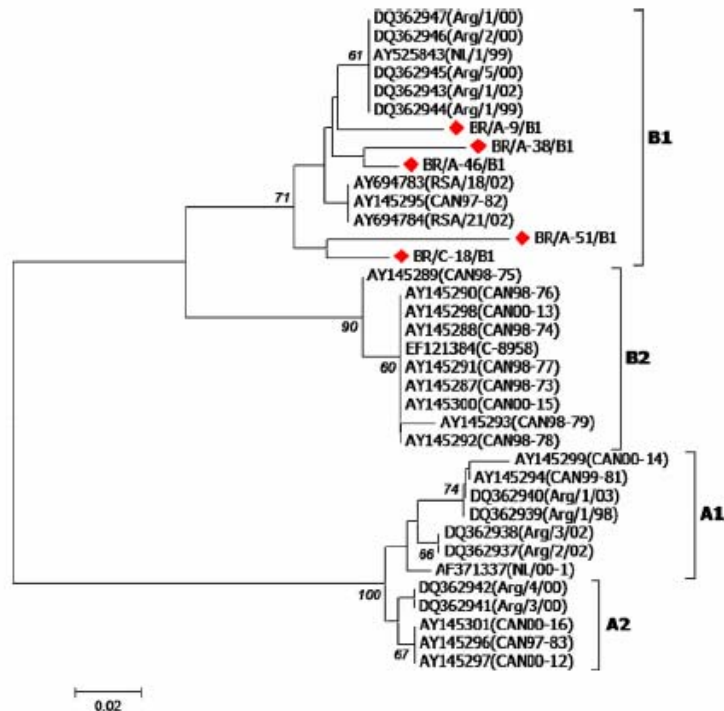


Fig. 2. Phylogenetic analysis of part of the F gene of five Brazilian isolates. Brazilian isolates are dotted with a red lozenge. The bar indicates substitutions per site. Only bootstrap values higher than 60% are shown. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

2. Material and methods

Nasopharyngeal aspirates (NPA) were collected from children hospitalized between April and September, 2004 because of a diagnosis of acute respiratory infections (ARI) in two university hospitals in Campinas, São Paulo, Brazil.

RNA was extracted from NPA using a High Pure Viral Nucleic extraction kitTM (Roche DiagnosticsTM, Mannheim, Germany). cDNA was synthesized using a High Capacity cDNA kit (Applied BiosystemsTM, Foster City, USA) according to the manufacturer's instructions. Samples were investigated for HMPV using specific amplification fusion protein (Falsey et al., 2003).

For molecular characterization and nucleotide phylogeny analyses, the PCR products were sequenced in forward and reverse direction using ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied BiosystemsTM, Foster City, USA). Five sequences were obtained with quality sufficient for further analysis. Sequences from representative HMPV strains were obtained from the GenBank database with the following accession numbers: AY694784, AY145295, South Africa; AY145298, AY145287, AY145301, AY145296, Canada; DQ362944, DQ362940, Argentina; AY525843; AF371337, Netherlands.

The alignment of sequences was performed using the Clustal W software, version 1.83 (Thompson et al., 1994). Nucleotide sequence phylogenetic analyses were performed using the neighbor-joining method in the MEGA version 3.1 software package (Kumar et al., 1994), based on the Kimura two-parameter distance estimation method. Sequences obtained have been submitted to the GenBank.

3. Results

Samples were collected from 142 hospitalized infants <1 years of age. The mean age of the patients was 4, 4 months; 86 were male (61%). We identified HMPV in 8 (5.6%) of the samples. Most cases of HMPV (5/8) occurred in children <6 months old and 75% (6/8) were boys. The clinical features (5/8) were bronchiolitis and (3/8) bronchiolitis associated with pneumonia.

The five of the HMPV isolates that yielded nucleotide sequences of sufficient quality for genotyping were genotype B1. Two of the these isolates (BR/A-51/B1 and BR/C-18/B1) were variant viruses (Fig. 1), which clustered in a separate branch within this genotype (Fig. 2).

4. Discussion

Our data, based on a small sample size, demonstrates that HMPV caused 5.6% of the ARI seen in our region in 2004. This proportion is similar to a previous report of a prevalence of 5.7% to 6.5% in the St Louis region (Agapov et al., 2006). Cuevas et al. (2003) described the

epidemiology and clinical characteristics of children in Aracaju, Northeastern Brazil, where the HMPV prevalence reached 17% alone, and 7% with combined HRSV/HMPV co-infections (Cuevas et al., 2003). A report of HMPV in hospitalized children in Southeastern Brazil showed 6.4% prevalence (Debur et al., 2007). The samples studied on the present work were examined by molecular diagnostic methods for HRSV infection, and no co-infections were found (Antoniassi da Silva et al., in preparation). Prior phylogenetic analyses based on sequencing of F gene allowed us to classify our HMPV isolates in the context of these genetic lineages (Bastien et al., 2003; Boivin et al., 2004; Galiano et al., 2006). Sequences from viruses in Australia, France, Canada, Israel and Netherlands were closely related with few polymorphisms in the F gene (Kahn, 2006). Our samples belong within genotype B subgroup 1. Subgroup B1 was the subgroup most frequently detected in 2004 in Australia (Mackay et al., 2006). A sharp increase in the incidence of subgroup B1 from 2001 to 2004 established it as the predominant subgroup during that time in Australia (Mackay et al., 2006). Phylogenetic analysis based on nucleotide sequences in South Africa revealed that subgroup B1 emerged in 2002 (Ludewick et al., 2005). The absence of subgroup B1 in previous years may have been due to preexisting community immunity rather than diagnostic assay limitations (Mackay et al., 2004; Ludewick et al., 2005).

Two of our subgroup B isolates, BR/A-51/B1 and BR/C-18/B1, contained nucleotide substitutions in the F gene (Fig. 2). Phylogenetic analysis clearly allocates these isolates to a separate branch from the B1 viruses detected in Argentina, South Africa, and Canada. Although our study is limited by a low number of HMPV sequences, we show that some polymorphisms may be present in HMPV isolates circulating in a defined geographic region, in a relatively short period of time. Genetic variability is a strong indicator of virus evolution and the ability of a genotype to persist in a given population (Ludewick et al., 2005). This variability may pose a challenge for future vaccine development, which will be informed by worldwide molecular studies. Further studies, including a larger sample size and more nucleotide sequences, may be conducted to determine the significance of the substitutions reported here.

Acknowledgements

C.W.A is CNPq Research fellowship. F.R.S. is in receipt of a Post-Doctoral grant from FAPESP.

References

- Agapov E, Sumino KC, Gaudreault-Keener M, Storch GA, Holtzman MJ. Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness. *J Infect Dis* 2006;193:396–403.

- Bastien N, Normand S, Taylor T, Ward D, Peret TCT, Boivin G, et al. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. *Virus Res* 2003;93:51–62.
- Boivin G, Mackay I, Sloots TP, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, et al. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1154–7.
- Boivin G, Serres G, Hamelin ME, Côté S, Argouin M, Tremblay G, et al. An outbreak of severe tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clin Infect Dis* 2007;44:1152–8.
- Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory syncytial virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins; 2001. p. 1443–86.
- Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RO, Grensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003;12:1626–8.
- Debur MC, Bordignon J, Santos CND, Vidal LR, Nogueira MB, Almeida SM, et al. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol* 2007;39:59–62.
- Englund JA, Boeckh M, Kuypers J, et al. Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients. *Ann Intern Med* 2006;144:344–9.
- Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh E. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003;187:785–90.
- Falsey AR, Criddle MC, Walsh E. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reactions in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol* 2006;35:46–50.
- Galiano M, Trento A, Ver L, Carballal G, Videla C. Genetic heterogeneity of G and F protein genes from Argentinean human metapneumovirus strains. *J Med Virol* 2006;78:631–7.
- Gray GC, Capuano AW, Setterquist SF, Sanchez JL, Neville JS, Olsone J, et al. Human metapneumovirus. *Peru Emerg Infect Dis* 2006;12:347–50.
- Ishiguro N, Ebihara T, Endo R, Ma X, Kikuta H, Ishiko H, et al. High Genetic Diversity of the Attachment (G) Protein of Human Metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2004;42:3406–14.
- Kahn J. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:546–57.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci* 1994;10:189–91.
- Ludewick HP, Abed Y, van Niekerk N, Boivin G, Klugman KP, Madhi SA. Human metapneumovirus genetic variability, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1075–8.
- Mackay IM, Bialasiewicz S, Waliuzzaman Z, Chidlow GR, Fegredo DC, Laingam S, et al. Use of the P gene to genotype human metapneumovirus identifies 4 viral subtypes. *J Infect Dis* 2004;190:1913–8.
- Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Arden KE, Nissen MD, et al. Genetic diversity of human metapneumovirus over 4 consecutive years in Australia. *J Infect Dis* 2006;193:1630–3.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673–80.
- van den Hoogen. Respiratory tract infection due to human metapneumovirus among elderly patients. *Clin Infect Dis* 2007;44:1159–60.
- van den Hoogen BG, Jong JC, Groen J, Kuiken T, Groot R, Fouchier RAM, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;6:719–24.

4- DISCUSSÃO GERAL

4.1- Classificação genética hRSV

Com base nos dados de seqüências de nucleotídeos dos genes G e F do hRSV gerados a partir dos respectivos fragmentos do genoma de isolados, foram determinadas as relações filogenéticas entre os isolados e outros presentes em várias partes do mundo. Os isolados foram caracterizados como pertencentes respectivamente, aos subgrupos A e B. Esse padrão de circulação simultânea destes subgrupos no mesmo período epidêmico já foi observado em inúmeros relatos (Nascimento et al., 1991; Vieira et al., 2001; Cintra et al., 2001). O subgrupo A apresentou ser o predominante em nosso estudo, o que se assemelha ao encontrado por outros pesquisadores nos últimos anos (Viegas et al., 2005). Os isolados pertencentes ao subgrupo A se distribuíram em três genótipos: GA2, GA5 e SSA1. O genótipo SSA1 foi identificado pela primeira vez no sul da África por Venter e colaboradores (2001), e existem poucos relatos do mesmo na literatura. Os genótipos GA2 e GA5 foram os genótipos predominantes durante o período estudado. A ocorrência destes genótipos foi observada também em países vizinhos ao Brasil, tais como Argentina e Uruguai (Frabasile et al., 2003; Galliano et al., 2005).

As seqüências analisadas dos isolados do subgrupo B foram identificadas em 3 genótipos distintos dentro desse subgrupo, notadamente GB3 (SAB3) e BA (BAIII). O genótipo do subgrupo B identificado como BA foi isolado pela primeira vez na Argentina por Trento et al. (2003), tendo como principal característica deste genótipo a duplicação de 60nt na posição após o resíduo 792 do gene G. Das amostras analisadas no presente estudo, duas foram identificadas como pertencentes ao genótipo BA, os isolados apresentaram duplicação dos 60nt na posição 781-840 do gene.

4.2- Classificação genética do hMPV

Com base nas seqüências de nucleotídeos do gene F do hMPV, foi identificada a presença do subgrupo B1 em nosso trabalho, semelhante ao que foi relatado em 2004 na Austrália (Mackay et al., 2006). Baseado nas análises filogenéticas das seqüências de nucleotídeos no Sul da África foi observado o aparecimento do subgrupo B1 em 2002 (Ludewick et al., 2005). Nossas amostras apresentaram ainda duas amostras variantes neste mesmo genótipo, com base nas seqüências de nucleotídeos. A variabilidade genética

observada nas amostras pode ser um forte indicador da evolução do vírus como resposta à imunidade adquirida pela população para esses patógenos.

5- CONCLUSÕES GERAIS

- Este foi o primeiro estudo realizado na região geográfica de Campinas para identificação de dois importantes agentes virais respiratórios: hRSV e hMPV;
- Foram isoladas e caracterizadas 23 amostras do vírus Respiratório sincicial humano em cultivo de células *HEp-2* proveniente de 142 amostras de aspirados nasofaríngeos de pacientes pediátricos;
- A análise filogenética dos hRSV mostrou que das 23 amostras isoladas, quinze (15) são pertencentes ao subgrupo A e oito (8) pertencentes ao subgrupo B;
- Foram identificadas e caracterizadas oito (8) amostras de metapneumovírus humano (hMPV) provenientes de amostras de aspirados nasofaríngeos de pacientes pediátricos;
- A análise filogenética dos isolados de hMPVs mostrou que pertencem ao subgrupo B/genótipo B1.
- Com base nas seqüências de nucleotídeos, duas (2) amostras do hMPV subgrupo B/genótipo B1 apresentaram diferenças significativas em relação a outros vírus deste mesmo genótipo.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Ferine BF, Stoney Y, Mcinstosh K. Antigenic Characterization of Respiratory Syncytial Virus Strains With Monoclonal Antibodies. *J Infect Dis* 1985; 151: 626:633.

Barr J, Chambers P, Pringle CR & Easton AJ. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J Gen Virol* 1991; 72:677:685.

Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côte S, Peret TCT, Erdman DD, Anderson LJ. Virological Features and Clinical Manifestations Associated with Human Metapneumovirus: A New Paramyxovirus Responsible for Acute Respiratory – Tract Infections in All Age Groups. *J Infect Dis* 2002; 186:1330: 1334.

Botosso VF. Diversidade Genética da Glicoproteína G do Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) Entre Amostras Isoladas na Cidade de São Paulo, 1995 -1998. Dissertação (Doutorado), Universidade de São Paulo, 2002.

Buckland R & Wild F. Leucine zipper motif extends. *Nature* 1989; 338:547.

Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2001; 11:103:116.

Carballal G, Videla CM, Espino MA, Savy V, Uez O, Sequeira MD, Knez V, Requeijo PV, Posse CR, Miceli I. Multicentered Study of Viral Acute Lower Respiratory Infections in Children From Four Cities of Argentina, 1993 -1994. *J Med Virol* 2001; 64: 164:74.

Carr MJ, McCormack GP, Crowley B. Human metapneumovirus-associated respiratory tract infections in the Republic of Ireland during the influenza season of 2003-2004. *Clin Microb Infect* 2005; 11:366:371.

Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* 1990; 71:3075:3080.

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

Coates HV, Kendrick L, Chanock RM. Antigenic Differences Between Two Strains of Respiratory Syncytial Virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963; 12: 958:64.

Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory syncytial virus. In: Knipe DM, Howley PM, Editors *Fields virology*, 4th edn. Lippincott-Williams and Wilkins, Philadelphia: 2001 p1443:1486.

Cuevas LE, Nasser AM, Dove W, Gurgel RO, Grensill J, Hart CA. Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003; 12: 1626:1628.

Debur MC, Bordignon J, Santos CND, Vidal LR, Nogueira MB, Almeida SM, Raboni SM. Acute respiratory infection by human metapneumovirus in children in southern Brazil. *J Clin Virol* 2007; 39:59:62.

Doggett JE, Taylor-Robinson D. Serological studies with respiratory syncytial virus. *Arch Gesam Virusforsch* 1965; 15:601:608.

Earp LJ, Delos SE, Park HE, White JM. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Trop Microbiol* 2004; 285:25:66.

Easton AJ, Domachowske JB, Rosenberg HF. Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis. *Clin Microb Rev* 2004; 17:390:412.

Ellis JA, Russell H, Cavender J, Haven TR. Bovine Respiratory Syncytial Virus-Specific Immune-Responses in Cattle Following Immunization with Modified-Live and Inactivated Vaccines-Analysis of the Specificity and Activity of Serum Antibodies. *Veter Immunol and Immunopath* 1992; 34:35:45.

Falsey AR. Respiratory Syncytial Virus Infections in Older Persons. *Vaccine* 1998; 16: 1775:1778.

Falsey AR, Wash EE. Respiratory Syncytial Virus Infections in Adults. *Clin Microb Rev* 2000; 13: 371:384.

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

Frabasile SA, Facal DL, Videla M, Galiano M, Sierra MJ, Ruchansky D, Vitureira N, Berois M, Carballa G, Rossi J, Arbiza J. Antigenic and genetic variability of human respiratory syncytial viruses (group A) isolated in Uruguay and Argentina:1993-2001. 2003; 71:305:312.

Freymounth F, Vabret A, Legrand L, Etarradossi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, Guilloi B. Presence of new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis* 2003; 22:92:94.

Galiano M, Palomo C, Videla CM, Arbiza J, Melero JA, Carballal G. Genetic and Antigenic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus (Groups A and B) Isolated over Seven Consecutive Seasons in Argentina (1995 to 2001). *J Clin Micro* 2005; 43:2266:2273.

Garcia Garcia ML, Calvo Rey C, Martin del Valle F, Lopez Huertas MR, Casa Flecha I, Diaz-Delgado R, Perez-Brena P. Respiratory infections due to metapneumovirus in hospitalized infants. *An Pediatr* 2004; 61:213:218.

Ghildyal R, Mills J, Murray M, Vardaxis N & Meanger J. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. *J Gen Virol* 2002; 83:753:757.

Ghildyal R, Ho A & Jans DA. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection. *FEMS Microb Rev* 2006; 30:692:705.

Hacking D & Hull J. Respiratory Syncytial Virus – Viral Biology and the Host Response. *J Infect* 2002; 45:18:24.

Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW & Anderson LJ. Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiology and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J Infect Dis* 1990; 162: 1283:1290.

Hallak LK, Collins PL, Knudson W & Peeples ME. Iduronic Acid-Containing Glycosaminoglycans on Target Cells Are Required for Efficient Respiratory Syncytial Infection. *Virology* 2000; 271:264:275.

Hallak LK, Spillmann D, Collins PL & Peeples ME. Glycosaminoglycan Sulfation Requirements for Respiratory Syncytial Virus Infection. *J Virol* 2000; 74:10508:10513.

Hierholzer JC, Tannock GA, Hierholzer CM, Coombs RA, Kennett ML, Phillips PA, Gust TID. Subgrouping of Respiratory Syncytial Virus Strains From Australia and Papua New Guinea by Biological and Antigenic Characteristics. *Arch Virol* 1994; 136: 133:147.

Jartti TB, van den Hoogen RP, Garofalo AD, Osterhaus, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002; 360:1393: 1394.

Johnson PR, Stricks MK, Olmsted RA, Collins PL. The G Glycoprotein Of Human Respiratory Syncytial Virus of Subgroups A and B: Extensive Sequence Divergence Between Antigenically Related Proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:5625:5629.

Kahn J. Epidemiology of Human Metapneumovirus. *Clin Microb Rev* 2006; 19:546:557.

Karger A, Schmidt U & Buchholz U. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *J Gen Virol* 2001; 82:631:640.

Kingsbury DW. Paramyxoviridae and Their Replication. In B N Fields, *Virology*. Lippincott-Raven Publishers Philadelphia: 1990 p945:962.

Krempl C, Murphy BR & Collins PL. Recombinant Respiratory Syncytial Virus with the G and F Genes Shifted to the Promoter-Proximal Positions. *J Virol* 2002; 76:11931:11942.

Krusat T & Streckert HJ. Heparin – dependent attachment of respiratory syncytial virus (RSV) to host cells. Arch Virol 1997; 142:1247:1254.

Lamb RA. Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes. Virol 1993; 197:1:11.

Lamberts DM, Barney S, Lambert AL et al. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:2186:2191.

Langedijk JPM, Groot BL, Berendsen HJC, van Oirschot JT. Structural Homology of the Central Conserved Region of the Attachment Protein G of Respiratory Syncytial Virus with the Fourth Subdomain of 55-kDa Tumor Necrosis Factor Receptor. Virol 1998; 243:293:302.

Levine S, Klaiber FR, Paradiso PR. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. J Gen Virol 1987; 68:2521:4.

Li J, Ling R, Randhawa JS, Shaw K, Davis PJ, Juhasz K, Pringle CR, Easton AJ, Cavanagh D. Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. Virus Res 1996; 41:185:191.

Ludewick HP, Abed Y, van Niekerk N, Boivin G, Klugman KP, Madhi SA. Human Metapneumovirus Genetic Variability, South Africa. Emerg Infect Dis 2005; 11:1075:1078.

Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Arden KE, Nissen MD, Sloots TP. Genetic Diversity of Human Metapneumovirus over 4 Consecutive Years in Australia. J Infect Dis 2006; 193:1630:1633.

Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, Lanini L, Andreoli E, Gagazzo V, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Human Metapneumovirus Associated with Respiratory Tract Infections in a 3- Year Study of Nasal Swabs from Infants in Italy. J Clin Microb 2003; 41:2987:2991.

Mahalingman S, Schwarze J, Zaid A, Nissen M, Sloots T, Tauro S, Storer J, Alvarez R, Tripp RA. Perspective on the host response to human metapneumovirus infection: what can we learn from respiratory syncytial virus infections? *Microbes Infect Rev* 2006; 8:285:293.

Mink MA, Stec DS, Collins PL. Nucleotide Sequences of the 3' Leader and 5' Trailer Regions of Human Respiratory Syncytial Virus Genomic RNA. *Virology* 1991; 186: 615:24.

Moller FW & Ohmit SE. Severity of illness models for respiratory syncytial virus-associated hospitalization. *Am J Resp Crit Care Med* 1999; 159: 1234:1240.

Morris JA. JR, Blount RE, Savage RE. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Coryza. *Proc Soc Exp Med* 1956; 92: 544:550.

Morrison TG. Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* 1988; 10:113:135.

Moura FEA, Blanc A, Frabasile S, Delfraro A, Sierra MJ, Tome L, Ramos AG, Siqueira MM, Arbiza J. Genetic Diversity of Respiratory Syncytial Virus Isolated During an Epidemic Period from Children of Northeastern Brazil. *J Med Virol* 2004; 74:156:160.

Mufson MA, Örvell C, Rafnar B, Norrby E. Two Distinct Subtypes of Human Respiratory Syncytial Virus. *J Gen Virol* 1985; 66: 2111:2124.

Nascimento JP, Siqueira MM, Suttmoller F, Krawczuk MM, De Farias V, Ferreira V. & Rodrigues MJ. Longitudinal Study of Acute Respiratory Diseases in Rio de Janeiro: Occurrence of Respiratory Viruses during Four Consecutive Years. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33:287:296.

Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem* 1996; 120:215:228.

Nissen MD, Siebert DJ, Mackay LM, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Med J Aust* 2002; 176:188.

Njenga MK, Lwamba HM, Seal BS. Metapneumovirus in birds and humans. *Virus Res* 2003; 91:163:169.

Ordás J, Boga JA, Alvarez-Argüelles M, Villa L, Rodríguez-Dehli C, Oña M, Rodríguez J, Melón S. Role of Metapneumovirus in Viral Respiratory Infections in Young Children. *J Clin Microb* 2006; 44: 2739:2742.

Pastey MK, Crowe JE, Graham BS. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol* 1999; 73:7262:7270.

Peret TCT, Hammond GW, Piedra PA, Stoch GA, Sullender WM, Tsou C, Anderson LJ. Circulation Patterns of Group A and B Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5 Communities in North America. *J Infect Dis* 2000; 6: 181:1891.

Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus ADME, Erdman DD & Anderson LJ. Characterization of Human Metapneumovirus Isolated from Patients in North America. *J Infect Dis* 2002; 185: 1660:1663.

Perez M, García-Barreno B, Melero JA, Carrasco L, Guinea R. Membrane Permeability Changes Induced in Escheria coli by the SH Protein of Human Respiratory Syncytial Virus. *Virol* 1997; 235:342:351.

Randhawa JS, Wilson SD, Tolley KP, Cavanagh D, Pringle CR, Easton AJ. Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. *J Gen Virol* 1996; 77:3047:3051.

Rixon HWM, Brown G, Aitken J, McDonald T, Graham S, Sugrue RJ. The small hydrophobic (SH) protein accumulates within lipid-raft structures of the Golgi complex during respiratory syncytial virus infection. *J Gen Virol* 2004; 85:1153:1165.

Ruiz-Arguello, MB, Martin D, Wharton SA, Calder LJ, Martin SR, Cano O, Calero M, Garcia-Barreno B, Skehel JJ, Melero JA. Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism. *J Gen Virol* 2004; 85:3677:3687.

Schickli, JH, Kaur J, Ulbrandt N, Spaete RR, Tang RS. An S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters. *J Virol* 2005; 79:10678:10689.

Schelender J, Zimmer G, Herrler G, Conszelmann KK. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *J Virol* 2003; 77:4609:4616.

Siqueira MM, Nascimento JP, Anderson LJ. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus group A and B isolates in Rio de Janeiro, Brasil. *J Clin Microb* 1991; 29: 557:559, 1991.

Spilki, FR. Análise Filogenética de Isolados Autóctones do Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e Aprimoramento de um Modelo Experimental em Camundongos Dissertação (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, 2006.

Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:897:901.

Stralioto SM, Nestor SM, Siqueira MM. Respiratory Syncytial Virus Groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 155:158.

Sullender WM, Anderson LJ, Anderson K & Wertz GW. Differentiation of Respiratory Syncytial Virus Subgroups with cDNA Probes in a Nucleic Acid Hybridization Assay. *J Clin Microb* 1990; 28:1683:1687.

Sullender WM, Sun L & Anderson LJ. Analysis of Respiratory Syncytial Virus Genetic Variability with Amplified cDNAs. *J Clin Microb* 1993; 31:1224:1231.

Sullender WM. Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:1:15.

Takao S, Shimozone H, Kashiwa H, Shimazu Y, Fukuda S, Kuwayama M, Miyazaki K. Clinical study of pediatric cases of acute respiratory diseases associated with human metapneumovirus in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56:127:129.

Techaarpornkul S, Collins PL & Peeples MK. Respiratory Syncytial Virus with the Fusion Protein as Its only Viral Glycoprotein Is Less Dependent on Cellular Glycosaminoglycans for Attachment than Complete Virus. *Virol* 2002; 294:296:304.

Trento A, Galiano M, Videla C, Caballal G, García-Barreno B, Melero JA, Palomo C. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol* 2003; 84: 3115:3120.

Tsutsumi H, Onuma M, Suga K, Honjo T, Chiba Y, Chiba S, Ogra PL. Occurrence of Respiratory Syncytial Virus Subgroup A and B Strains in Japan, 1980 to 1987. *J Clin Microb* 1988; 26: 1171:1174.

Valarcher JF, Furze J, Wyld S, Cook R, Conzelmann KK, Taylor G. Role of Alpha/BETA Interferons in the Attenuation and Immunogenicity of Recombinant Bovine Respiratory Syncytial Viruses Lacking NS Proteins. *J Virol* 2003; 77:8426:8439.

van den Hoogen BG, Jong JC, Groen J, Kuiken T, Groot R, Fouchier, RAM, Osterhaus ADME. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 6: 719:724.

van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Analysis of the Genomic Sequence of a Human Metapneumovirus. *Virol* 2002; 295:119:132.

van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, Swart RL, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Antigenic and Genetic Variability of Human Metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:658:666.

Van der Poel WH, Brand A, Kramps JA, Van Oirschot JT. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *J Infect* 1994; 29:215:228.

Venter M, Mashi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J Gen Virol* 2001; 82: 2117:2114.

Vicente D, Cilla G, Montes M, Perez-Trallero E. Human metapneumovirus and community – acquired respiratory illness in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:602:603.

Viegas M, Mistchenko AS. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus subgroup A over a six-year period (1999-2004) in Argentina. *J Med Virol* 2005; 77: 302:310.

Vieira SE, Stewien KE, Durigon EL, Török TJ, Anderson LJ, Miyao CR, Hein N, Botosso VF, Pahl MM, Gilio AE, Ejzenberg B, Okay Y. Clinical Patterns and Seasonal Trends in Respiratory Syncytial Virus Hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2001; 43:125:31.

Wechsler SL, Lambert DM, Galinski MS, Heineke BE, Lambert AL, Mink M, Rochovansky OM, Pons MW. A simple method for increased recovery of purified paramyxovirus virions. *J Virol Methods* 1985; 12:179:182.

Williams JV, Crowe JF, Enriquez R, Minton P, Peebles RS, Hamilton RJ, Higgs S, Griffin M, Harbert TV. Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. *J Infect Dis* 2006; 192:1149:1153.

