

Katia Corrêa de Oliveira Santos

**Caracterização genética da hemaglutinina (HA) dos
vírus da Influenza tipos A e B, nas regiões de
abrangência do Instituto Adolfo Lutz, no período de
2013 – 2015**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Coordenadoria de
Controle de Doenças da Secretaria
de Estado da Saúde de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva

SÃO PAULO

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Santos, Katia Corrêa de Oliveira

Caracterização genética da hemaglutinina (HA) dos vírus da Influenza tipos A e B, nas regiões de abrangência do Instituto Adolfo Lutz, no período de 2013 - 2015 / Katia Corrêa de Oliveira Santos. – 2018.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisa Laboratorial em Saúde Pública

Orientação: Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva

1. Influenza humana. 2. Hemaglutinina. 3. Vacina contra influenza.

SES/CCD/CD-384/2018

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar saúde, força e guiar meus caminhos em todos os momentos de minha vida.

A toda minha família, especialmente aos meus pais Shirley e Benedito, ao meu esposo Ricardo e a meus filhos Isabel e Davi por todo amor, paciência e suporte.

A meu orientador Profº Dr. Marcos Vinicius da Silva pela confiança, dedicação e ensinamentos repassados.

A minha amiga Dra. Terezinha Maria de Paiva pelo apoio, incentivo e ajuda ao longo desses anos em minha profissão.

Aos amigos do Núcleo de Doenças Respiratórias pelo suporte durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Centro de Virologia pela força recebida.

Aos profissionais do Programa de Pós Graduação em Ciências-CCD/SES pelos serviços e orientações prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

Aos colegas do curso de pós-graduação e a todo corpo docente.

À banca pela disponibilidade, avaliação e sugestões que muito contribuíram para a finalização deste trabalho.

A todos que, mesmo que indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A constante evolução do vírus da Influenza requer o monitoramento global contínuo e a reformulação frequente das vacinas. O presente estudo analisou a dinâmica genética da hemaglutinina (HA) dos vírus da Influenza do tipo A, subtipos H1 e H3, e do tipo B, linhagens Yamagata e Victoria, através de sua caracterização pelo sequenciamento de Sanger e pela análise filogenética, realizados no período de 2013 a 2015, nos estados de abrangência do Instituto Adolfo Lutz (IAL) (São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Piauí, Rondônia e Tocantins). Os resultados encontrados mostraram que na análise do segmento 4 do genoma viral, que codifica a HA, foram identificadas mutações em sítios antigênicos nos subtipos H1 e H3 dos vírus da Influenza A e nas linhagens Yamagata e Victoria dos vírus da Influenza B, com consequentes alterações das estirpes vacinais. Os vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 foram incluídos no grupo genético 6B e permaneceram similares à estirpe da vacina A/California/7/2009, quando caracterizados antígenicamente com antissoro de furão, desde o ano de 2013. A mutação D222G, associada a maior severidade da doença e ao óbito foi observada duas vezes no estado de São Paulo. Diversos subgrupos genéticos do grupo 3C dos vírus da Influenza A(H3N2) circularam desde o ano de 2013 e houve uma estirpe diferente do vírus vacinal para cada ano, no Hemisfério Sul. A co-circulação das linhagens dos vírus da Influenza B ocorreu nos anos de 2014 e 2015, o que não aconteceu no ano de 2013, quando houve divergência entre os vírus circulantes e os da estirpe vacinal. As mutações em sítios antigênicos correspondentes ao grupo genético 3 da linhagem Yamagata, as quais resultaram na alteração da estirpe do vírus da vacina para o ano de 2015 (B/Phuket/3073/2013), foram observadas a partir do ano de 2014. Diante disso, mostrou-se a contínua evolução genética e a necessidade de vigilância dos vírus da Influenza para melhor conhecimento técnico científico, prevenção da doença humana, das epidemias, das pandemias e agregar conhecimento para a evolução das vacinas.

Descritores: Influenza Humana, Hemaglutinina, Vacina contra Influenza.

Abstract

The constant evolution of the Influenza virus requires continuous global monitoring and frequent reformulation of vaccines. The present study analyzed the hemagglutinin (HA) genetic dynamics of Influenza A viruses, subtypes H1 and H3, and type B, Yamagata and Victoria lineages, through their characterization by Sanger sequencing and phylogenetic analysis, performed in the (IAL) (São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Federal District, Piauí, Rondônia and Tocantins). The results showed that in the analysis of segment 4 of the viral genome that encodes the HA, mutations were identified in antigenic sites in the H1 and H3 subtypes of Influenza A viruses and in the Yamagata and Victoria lineages of Influenza B viruses, with consequent changes of the vaccine strains. Influenza A (H1N1) viruses pdm09 were included in genetic group 6B and remained similar to the A / California / 7/2009 vaccine strain, when characterized antigenically with ferret antiserum, since the year 2013. The D222G mutation, associated with increased disease severity and death was observed twice, in the state of São Paulo. Several genetic subgroups of the 3C group of Influenza A (H3N2) viruses have circulated since the year 2013 and there was a different vaccine strain for each year in the Southern Hemisphere. Co-circulation of Influenza B lineages occurred in the years of 2014 and 2015, which did not happen in the year 2013, when there was divergence between circulating viruses and the vaccine strain. Mutations at antigenic sites corresponding to Yamagata lineage 3, which resulted in a change of vaccine strain for the year 2015 (B/Phuket/3073/2013), were observed from 2014. In this regard, the continuous genetic evolution and the need for surveillance of Influenza viruses for better scientific technical knowledge, prevention of human disease, epidemics, pandemics and knowledge for the evolution of vaccines were shown.

Keywords: Human Influenza, Hemagglutinin, Influenza Vaccine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> - Ferramenta básica de busca de alinhamento local
Bioedit	<i>Bioedit Sequence Alignment Editor</i> – Editor de alinhamento de sequências Bioedit
CCD	Coordenadoria de Controle de Doenças
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> - Centros de Controle e Prevenção de Doenças de Atlanta, Estados Unidos da América
CEPIAL	Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz
CNI	Centro Nacional de Influenza
Ct	<i>Threshold Cycle</i> – Ciclo que ultrapassa o ponto de corte do teste
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
GAL	Galactose
GenBank	Banco de dados de sequências genéticas dos Institutos Nacionais de Saúde
GISAID	<i>Global Initiative on Sharing All Influenza Data</i> – Iniciativa Global de Compartilhamento de Todos os Dados sobre Influenza
HÁ	Hemaglutinina
HPAI	<i>High pathogenic avian Influenza</i> - Influenza aviário de alta patogenicidade
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IEC	Instituto Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LAIV	<i>Live, Attenuated Influenza Vaccine</i> - Vacina atenuada contra Influenza
LPAI	<i>Low pathogenic avian influenza</i> - influenza aviário de baixa patogenicidade
M	Gene da Matriz
M1	Proteína da matriz
M2	Proteína do canal de prótons
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i> – Células de rim de cão Madin Darby
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> – Análise Genética Evolutiva Molecular
MS	Ministério da Saúde
NA	Neuraminidase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia
NEP	<i>Nuclear Export Protein</i> – Proteína de exportação nuclear
NIH	<i>National Institutes of Health</i> – Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América
NP	Nucleoproteína
NS	Gene não estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Polimerase Ácida

PB1	Polimerase Básica 1
PB2	Polimerase Básica 2
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Salina em tampão fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
Primer	Oligonucleotídeo iniciador da reação de PCR
Probe	Oligonucleotídeo marcado com fluorescência utilizado para sinalizar a amplificação do fragmento de DNA em uma reação de RT-qPCR
QIV	<i>Quadrivalent Influenza Vaccine</i> - Vacina quadrivalente contra influenza
RMVVI	Rede Mundial de Vigilância do Vírus da Influenza
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - ácido ribonucleico
RNVI	Rede Nacional de Vigilância da Influenza
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
SE	Semana Epidemiológica
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SG	Síndrome Gripal
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SRAG– UTI	Síndrome Respiratória Aguda Grave – Unidade de Terapia Intensiva
Template	Fragmento de DNA alvo para amplificação
TIV	<i>Trivalent inactivated Vaccine</i> - Vacina trivalente inativada
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Estirpes virais, recomendadas pela OMS, para a composição da vacina trivalente contra os vírus da Influenza, para o Hemisfério Sul, no período de 2013 a 2015.....45

Tabela 2. Distribuição de amostras biológicas humanas positivas para os vírus da Influenza, identificadas por RT-qPCR no IAL, no período de 2013 a 2015.....46

Tabela 3. Distribuição de amostras biológicas humanas sequenciadas pelo método de Sanger e incluídas na análise filogenética no IAL, no período de 2013 a 2015.....47

Tabela 4. Substituições de aminoácidos na HA dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B(linhagem Victoria) e B(linhagem Yamagata), analisados filogeneticamente, na região de abrangência do IAL, no período de 2013 a 2015, comparados com a estirpe vacinal A/California/7/2009, A/Victoria/361/2011, B/Ohio/01/2005 e B/Massachusetts/02/2012, respectivamente, empregadas no mesmo período.....64

Figura 1. Hospedeiros e origens das linhagens para o segmento do gene do vírus da Influenza A (H1N1)pdm09: PB2(polimerase básica 2), PB1(polimerase básica 1), PA(polimerase ácida), HA(hemaglutinina), NP(nucleoproteína), NA(neuraminidase), M(gene da matriz), NS(gene não estrutural).....20

Figura 2. A) Representação esquemática da partícula do vírus da Influenza A, segmentos genéticos e proteínas. B) RNA viral revestido por nucleoproteína e ligado ao complexo das polimerases.....22

Figura 3. A) Estrutura primária da HA do vírus da Influenza com as subunidades HA1 e HA2 ligadas por pontes dissulfídicas. B) Estrutura terciária da HA do vírus da Influenza, com destaque para o peptídeo de fusão.....	23
Figura 4. Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus da Influenza.....	25
Figura 5. Antigenic drift e antigenic shift, responsáveis pelas alterações antigênicas nas duas glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) do vírus da influenza. Comparação com a proteína interna do vírus, nucleoproteína (NP), sem alterações antigênicas.....	28
Figura 6. Distribuição da Rede Mundial de Vigilância do Vírus da Influenza, coordenada pela OMS, atualizado em 20 de dezembro de 2017.....	31
Figura 7. Vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 isolados e visualizados por microscopia eletrônica , no IAL, durante a pandemia de 2009, vistos com aumento de 200 mil vezes.....	39
Figura 8. Distribuição dos estados de abrangência no contexto da Rede Nacional de Vigilância do vírus da Influenza coordenada pelo Ministério da Saúde, com destaque para o Instituto Adolfo Lutz (IAL), laboratório de referência macrorregional no Brasil. As regiões de abrangência do IAL são realçadas em verde.....	41
Figura 9. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 coletados no ano de 2013. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal.....	49

Figura 10. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H3N2) coletados no ano de 2013. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal.....50

Figura 11. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza B coletados no ano de 2013. As mutações na linhagem Victoria estão relacionadas à estirpe vacinal B/Ohio/01/2005, anterior a B/Brisbane/60/2008.....51

Figura 12. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 coletados no ano de 2014. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal.....53

Figura 13. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H3N2) coletados no ano de 2014. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal A/Victoria/361/2011.....54

Figura 14. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza B coletados no ano de 2014. As mutações na linhagem Yamagata estão relacionadas à estirpe vacinal B/Massachusetts/02/2012. As mutações na linhagem Victoria estão relacionadas a estirpe vacinal B/Ohio/01/2005.....55

Figura 15. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 coletados no ano de 2015. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal.....58

Figura 16. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H3N2) coletados no ano de 2015. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal A/Victoria/361/2011.....59

Figura 17. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza B coletados no ano de 2015. As mutações na linhagem Yamagata estão relacionadas à estirpe vacinal B/Massachusetts/02/2012. As mutações na linhagem Victoria estão relacionadas a estirpe vacinal B/Ohio/01/2005.....60

Figura 18. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 coletados no período de 2013 a 2015. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal A/California/07/2009.....61

Figura 19. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H3N2) coletados no período de 2013 a 2015. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal A/Victoria/361/2011.....62

Figura 20. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza B coletados no período de 2013 a 2015. As mutações na linhagem Yamagata estão relacionadas à estirpe vacinal B/Massachusetts/02/2012. As mutações na linhagem Victoria estão relacionadas a estirpe vacinal B/Ohio/01/2005.....63

ÍNDICE

1. Introdução.....	17
1.1 Histórico.....	17
1.2 Vírus da Influenza.....	20
1.2.1 Classificação.....	20
1.2.2 Estrutura.....	21
1.2.3 Hemaglutinina e o ciclo replicativo.....	22
1.2.4 Receptores da hemaglutinina.....	25
1.2.5 Glicosilação.....	26
1.2.6 Sítios Antigênicos.....	26
1.3 Epidemiologia.....	27
1.4 Vigilância dos vírus da Influenza.....	29
1.5 Sintomas e transmissão.....	31
1.6 Patologia.....	32
1.7 Caracterização Genética.....	33
1.8 Análise filogenética.....	34
1.9 Vacina.....	34
2. Justificativa.....	36
3. Objetivos.....	37
3.1 Objetivo Geral.....	37
3.2 Objetivos Específicos.....	37
4. Materiais e métodos.....	38
4.1 Modelo de estudo.....	38

4.2 Casuística.....	38
4.2.1 Instituto Adolfo Lutz.....	38
4.2.2 Seleção de amostras.....	39
4.2.3 Aspectos Éticos.....	40
4.3 Amostras clínicas.....	41
4.4 Extrações de ácidos nucleicos.....	42
4.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).....	43
4.6 Sequenciamento e caracterização do gene da hemaglutinina.....	43
4.7 Composição da vacina para o Hemisfério Sul.....	45
5. Resultados.....	46
5.1 Caracterização genética (HA) dos vírus da Influenza no ano de 2013.....	47
5.2 Caracterização genética dos vírus da Influenza no ano de 2014.....	52
5.3 Caracterização genética dos vírus da Influenza no ano de 2015.....	56
5.4 Árvores filogenéticas dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) e dos vírus da Influenza B, no período de 2013 a 2015.....	61
5.5 Mutações em sítios antigênicos.....	64
6. Discussão.....	65
7. Conclusão.....	69

8. Referências bibliográficas.....	71
---	-----------

Anexos

1. INTRODUÇÃO

A Influenza (gripe) é considerada uma doença infecciosa de alta contagiosidade e causa doença respiratória aguda em todos os continentes. Estima-se um total de 250.000 a 500.000 óbitos/ano mundialmente, durante a sazonalidade do vírus ¹.

A vacinação é o meio mais eficaz para prevenir a infecção e os efeitos graves causados pelos vírus da influenza. A evolução desses vírus requer o monitoramento global contínuo e a reformulação frequente das vacinas ². A natureza fragmentada do genoma do vírus e a circulação desses em aves selvagens, aves domésticas e mamíferos apresenta uma oportunidade contínua para o rearranjo de genes virais e o surgimento de um novo vírus ³.

1.1 Histórico

A influenza (gripe) é considerada uma das mais antigas doenças da humanidade. Relatos de doença, descrevendo os sintomas que acometiam os egípcios e que atualmente são descritos como gripe, foram encontrados em papiros datados de 1700 a.C. e 1500 a.C. No entanto, a primeira descrição científica da gripe ocorreu em 412 a.C., na Grécia, pelo relato de Hipócrates, que definiu a doença que há tempos acometia populações em curto período de tempo, levando muitos indivíduos ao óbito como uma doença respiratória aguda, cuja transmissão se mantinha por algumas semanas, e em muitos casos com evolução fatal ⁴.

A informação quanto ao comportamento cíclico de sua ocorrência e a possibilidade da existência de um intervalo constante entre os períodos de sua maior incidência, datam do século XVI. A denominação de pandemia foi utilizada pela primeira vez em 1580, considerando uma doença originada na Ásia, disseminando-se pela África, Europa e, em seguida, disseminando-se para a América ⁴.

O marco histórico do potencial de disseminação e das elevadas taxas de mortalidade apresentadas pelo vírus da Influenza decorreu da primeira pandemia do século XX – denominada Gripe Espanhola – no período de 1918 – 1920. À época, em plena vigência da Primeira Guerra Mundial, houve a disseminação do vírus da Influenza pelo deslocamento de tropas militares e trabalhadores, assim como por rotas marítimas, atingindo os diferentes continentes. A humanidade vivenciou o caos globalizado gerado por uma doença respiratória de etiologia desconhecida que sobrepujou toda e qualquer estratégia terapêutica de tratamento, prevenção ou controle. A Espanha era um terreno neutro durante a guerra e por isso as autoridades espanholas divulgavam as informações quanto à gravidade da doença, diferente dos países em guerra. Dessa forma, elegeu-se o território espanhol como o local de origem da gripe, sendo então denominada Gripe Espanhola ⁵.

Estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas foram a óbito ao redor do mundo por causa da Gripe Espanhola. No Brasil, a gripe chegou com as embarcações oriundas da Europa, as quais atracavam nos portos de Recife, Salvador e Rio de Janeiro. Estima-se que o vírus da Gripe Espanhola atingiu aproximadamente 65% da população brasileira. Foram contabilizados 350 mil óbitos em todo o país, sendo que o total de 35.240 foi contabilizado considerando-se as cidades de São Paulo e Rio de Janeiro. A Gripe Espanhola foi responsável pela morte do diretor do Instituto Adolfo Lutz (à época Instituto Bacteriológico), Theodoro Bayma, e do presidente da república eleito, Rodrigues Alves, que não chegou a assumir a presidência ⁶.

O agente etiológico da doença respiratória aguda, denominado vírus da Influenza do tipo A, foi isolado 15 anos após a pandemia de 1918, pela inoculação de secreções respiratórias de indivíduos apresentando quadro de doença respiratória aguda, por via nasal, em furões, durante epidemia de doença respiratória ocorrida na Inglaterra ⁷. O vírus da Influenza do tipo B foi isolado em furões no ano de 1940 ⁸. O vírus da Influenza do tipo C foi isolado em ovos embrionados de galinha, em 1947 ⁹.

No período pós-pandêmico, surtos de gravidade considerável de Influenza foram registrados nos períodos de 1928 – 1929, 1932 – 1933, 1936 – 1937, 1943 – 1944, na Inglaterra e Estados Unidos. A primeira vacina contra a Influenza data de 1944 e foi composta pelas estirpes A(PR8)/A(Weiss) e B(Lee), porém em 1947 esta vacina não foi eficaz na proteção à população. A composição antigênica do vírus da Influenza A havia mudado e, em função disto, a nova variante foi denominada “A Prime”^{10,11}. A ineficácia da vacina contra a influenza em 1947, a qual conferiu proteção nas temporadas (1943-1944) e (1944-1945), acarretou grande preocupação quanto à possibilidade de um novo evento semelhante ao de 1918. O temor das autoridades a respeito resultou na Rede Mundial de Vigilância do Vírus da Influenza (RMVVI) coordenada pela Organização Mundial da Saúde (OMS)¹².

No século XX, a humanidade vivenciou mais duas pandemias pelo vírus da Influenza nos seguintes períodos: 1957 H2N2, 1968 H3N2; denominadas Gripe Asiática e Gripe de Hong Kong, respectivamente. Em ambas o genoma viral tem origem total ou parcialmente em reservatórios não humanos e o gene da hemaglutinina de Influenza aviária. Em 1977, o vírus da Influenza A H1N1 do início da década de 50 reemergiu e até 2009 evoluiu o suficiente para que houvesse oito atualizações do componente H1 da vacina¹³.

Entre 1988-1989, foram detectadas duas variantes antigênicas da Influenza B por ensaios de inibição de hemaglutinação. Todos os vírus da Influenza B isolados nos Estados Unidos neste período foram antigenicamente relacionados à variante B/Victoria/2/87, enquanto no Japão a variante B/Yamagata/16/88 também foi isolada^{14,15,16}.

Em abril de 2009, a primeira pandemia do século XXI, causada pelo vírus Influenza A (H1N1)pdm09, resultou do seguinte rearranjo gênico: NA (neuraminidase) e M (gene da matriz) da linhagem suína Euroasiática; HA (hemaglutinina), NP (nucleoproteína) e NS (gene não estrutural) da linhagem suína clássica norte-americana; PB2 (polimerase básica 2) e PA (polimerase

ácida) da linhagem aviária norte-americana; PB1 (polimerase básica 1) da linhagem sazonal A H3N2 (Figura 1) ^{13,17}.

No ano de 2016 o vírus da Influenza D, o qual afeta principalmente o gado bovino, foi anunciado pelo International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV ^{18,19}.

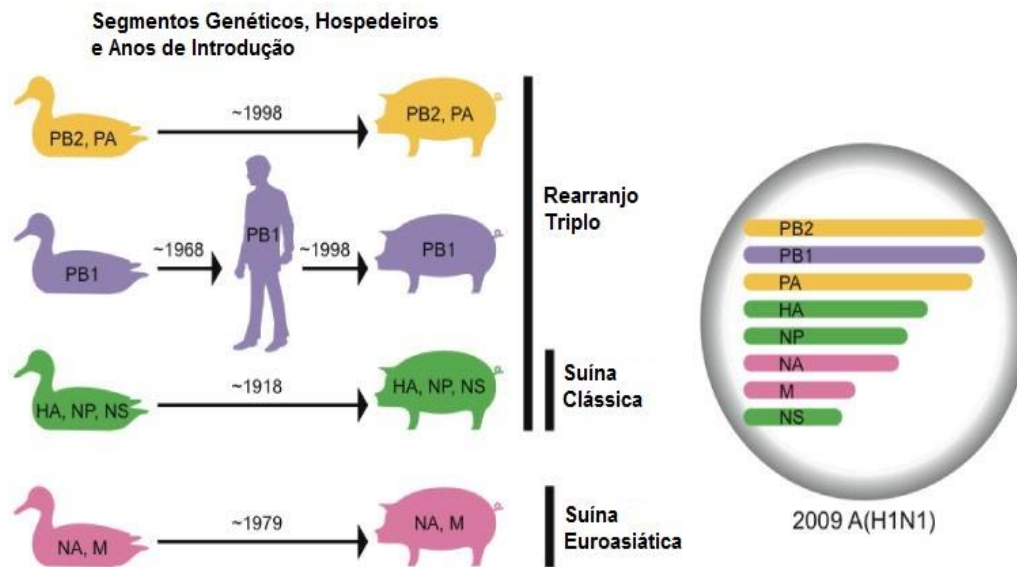


Figura 1. Hospedeiros e origens das linhagens para o segmento do gene do vírus da Influenza A (H1N1)pdm09: PB2(polimerase básica 2), PB1(polimerase básica 1), PA(polimerase ácida), HA(hemaglutinina), NP(nucleoproteína), NA(neuraminidase), M(gene da matriz), NS(gene não estrutural).

Fonte: Garten et al, 2009.¹³

1.2 Vírus da Influenza

1.2.1 Classificação

Há quatro tipos de vírus da Influenza: A, B, C e D, pertencentes à família Orthomyxoviridae. Os tipos A e B contêm 8 segmentos de RNA fita simples, polaridade negativa, enquanto o tipo C contém 7 segmentos, assim como o novo vírus da Influenza D ^{18,19,20}. Esta classificação é baseada na constituição antigênica das duas maiores proteínas estruturais, a

nucleoproteína (NP) e a proteína da matriz (M), as quais têm somente 20-30% de homologia entre os diferentes gêneros de Influenza e são os antígenos utilizados para distingui-los ²¹.

Os vírus da Influenza do tipo A são classificados em subtipos os quais são determinados pela variação antigênica das glicoproteínas de superfície HA e NA (H1N1, H3N2, H7N9, H5N1) com base na combinação dos 18 tipos de HA e 11 tipos de NA, descritos até a presente data ²². Os vírus da Influenza B não são divididos em subtipos e sim em duas linhagens: B/Yamagata e B/Victoria ¹⁶. Infecções por Influenza C geralmente causam uma doença respiratória leve ¹⁸, no entanto, há relatos de quadros de infecção respiratória grave acometendo principalmente crianças ²³. Os vírus da Influenza D afetam principalmente o gado bovino, mas também foram isolados de porcos, ovelhas, cabras, cavalos e camelos ^{18,24}.

Os vírus da Influenza A aviária podem ser classificados, também, como Influenza aviária de alta patogenicidade (HPAI) ou Influenza aviária de baixa patogenicidade (LPAI) de acordo com as características moleculares do vírus e sua habilidade em causar doença e mortalidade em aves ²⁵.

O sistema de nomenclatura para os vírus da Influenza proposto pela OMS consiste em descrever o tipo de vírus (baseado na especificidade antigênica da nucleoproteína), o hospedeiro de origem (apenas para amostras isoladas de hospedeiros não humanos), origem geográfica do isolamento, número da amostra e ano do isolamento. Para Influenza A, a descrição de subtipo de hemaglutinina e neuraminidase segue em parênteses (ex. A/Hong Kong/1/1968 (H3N2)) ²⁶.

1.2.2 Estrutura

As partículas virais são geralmente esféricas (80 a 120 nm de diâmetro), embora possam apresentar pleomorfismo. Possuem envoltório lipídico onde se localizam duas glicoproteínas de superfície denominadas hemaglutinina e neuraminidase, além da proteína M2 (canais de prótons) (Figura 2A). O RNA é encapsidado pela nucleoproteína. Complexos

contendo as três polimerases virais (PB1, PB2 e PA) estão situados nas extremidades dos nucleocapsídeos (Figura 2B) ²⁷.

O genoma viral pode codificar até 16 proteínas ²⁸. A hemaglutinina codificada pelo fragmento 4 do genoma viral é responsável pelo reconhecimento dos receptores celulares que possibilita a entrada do vírus nas células e é o componente viral de reconhecimento imunológico; ou seja anticorpos desenvolvidos contra esta glicoproteína conferem proteção à infecção; assim sendo é o componente utilizado na formulação das vacinas^{27,29}; enquanto a glicoproteína NA está envolvida na liberação das partículas virais da superfície das células infectadas e consequente propagação do vírus ²⁷.

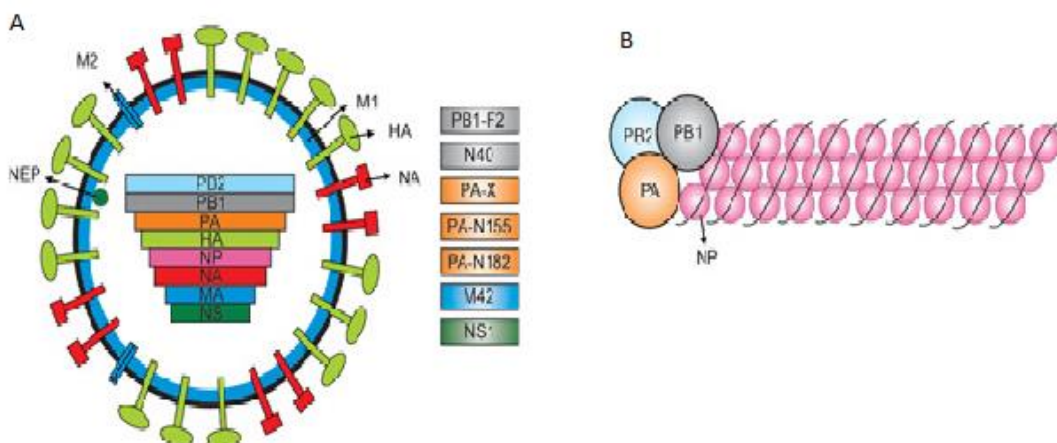


Figura 2. A) Representação esquemática da partícula do vírus da Influenza A, segmentos genéticos e proteínas. B) RNA viral revestido por nucleoproteína e ligado ao complexo das polimerases.

Fonte: Schrauwen et al, 2014. ²⁸

1.2.3 Hemaglutinina e o ciclo replicativo

A hemaglutinina é uma proteína trimérica com duas regiões estruturalmente diferentes: uma haste e uma cabeça globular posicionada no topo da haste e que contém o sítio de ligação ao receptor de ácido siálico na superfície celular. Durante a replicação viral, a hemaglutinina é clivada por

proteases do hospedeiro em subunidades HA1 e HA2; esta modificação pós-traducional é necessária para a infectividade viral. A porção HA2 desencadeia o processo de fusão entre o envelope viral e a membrana celular, enquanto que a porção HA1 contém os sítios antigênicos e de ligação ao receptor (Figura 3)^{30,31}.

A hemaglutinina dos vírus da Influenza aviária de baixa patogenicidade (LPAI) e da Influenza humana é clivada por proteases presentes apenas no aparelho respiratório humano e aviário, assim como no intestino de aves, restringindo, dessa forma, a replicação viral a esses tecidos. Alterações na sequência do sítio de clivagem da hemaglutinina podem torná-la suscetível a diversas proteases, propiciando a replicação sistemática do vírus, o qual passa a ser denominado vírus da Influenza aviária de alta patogenicidade (HPAI)²⁸.

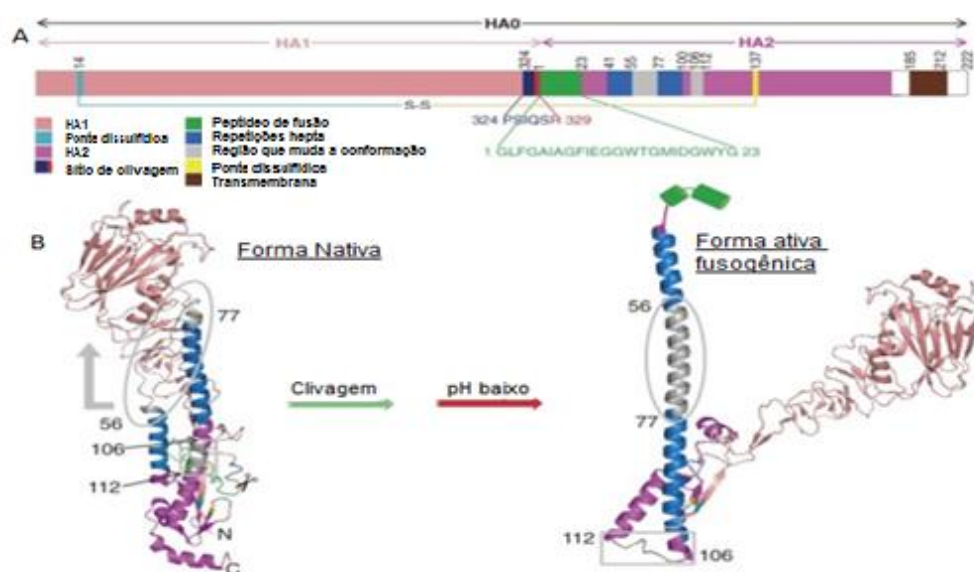


Figura 3. A) Estrutura primária da HA do vírus da Influenza com as subunidades HA1 e HA2 ligadas por pontes dissulfídicas. B) Estrutura terciária da HA do vírus da Influenza, com destaque para o peptídeo de fusão.

Fonte: Sriwilaijaroen N, Suzuki, 2012.³¹

Após a ligação ao receptor celular, as partículas virais são endocitadas e o baixo pH no interior do endossomo causa uma mudança conformacional na estrutura da hemaglutinina, expondo, dessa forma, o

peptídeo de fusão. Isto permite a fusão entre o envelope viral e a membrana do endossomo com consequente liberação das ribonucleoproteínas virais no citoplasma da célula ³². Uma forma adicional de desnudamento ocorre pela acidificação interna da partícula viral através do transporte de íons hidrogênio do endossomo via canais iônicos M2, presentes na membrana do vírus da Influenza. As ribonucleoproteínas são, então, dirigidas ao núcleo celular por meio de sinais de localização nuclear das proteínas virais ³⁰.

No núcleo, ocorrem os processos de transcrição e de replicação do genoma viral comandados pelo complexo das polimerases, formado pelas proteínas PB2, PB1 e PA, que agem sequencialmente na formação de RNA mensageiro (RNAm) e do RNA viral (RNAv) ³³. Ambos são transportados para o retículo endoplasmático rugoso, onde as proteínas virais são sintetizadas. Algumas destas proteínas retornam ao núcleo, onde se ligam ao RNA viral para formar as ribonucleoproteínas ³⁴. As proteínas de envelope, hemaglutinina, neuraminidase e canal de prótons (M2), seguem para o aparelho de Golgi, onde a glicosilação ocorre e, então, são transportadas para a membrana celular e nela se ancoram ^{30,34}.

O conjunto ribonucleoproteínas e proteína matriz (RNP-M1), já montado no núcleo, é encaminhado ao citoplasma através da proteína de exportação nuclear (NEP). A proteína M1 interage, então, com os domínios internos das hemaglutininas, que estão ancorados na membrana celular ³³.

Durante o brotamento, as espículas de hemaglutinina continuam se ligando aos resíduos de ácido siálico da superfície celular até que as partículas virais sejam liberadas pela atividade sialidásica da neuraminidase, a qual leva à clivagem de resíduos de ácido siálico para que ocorra a propagação da infecção viral às células vizinhas ^{30,33}.

O processo de replicação dos vírus da Influenza pode ser observado na Figura 4.

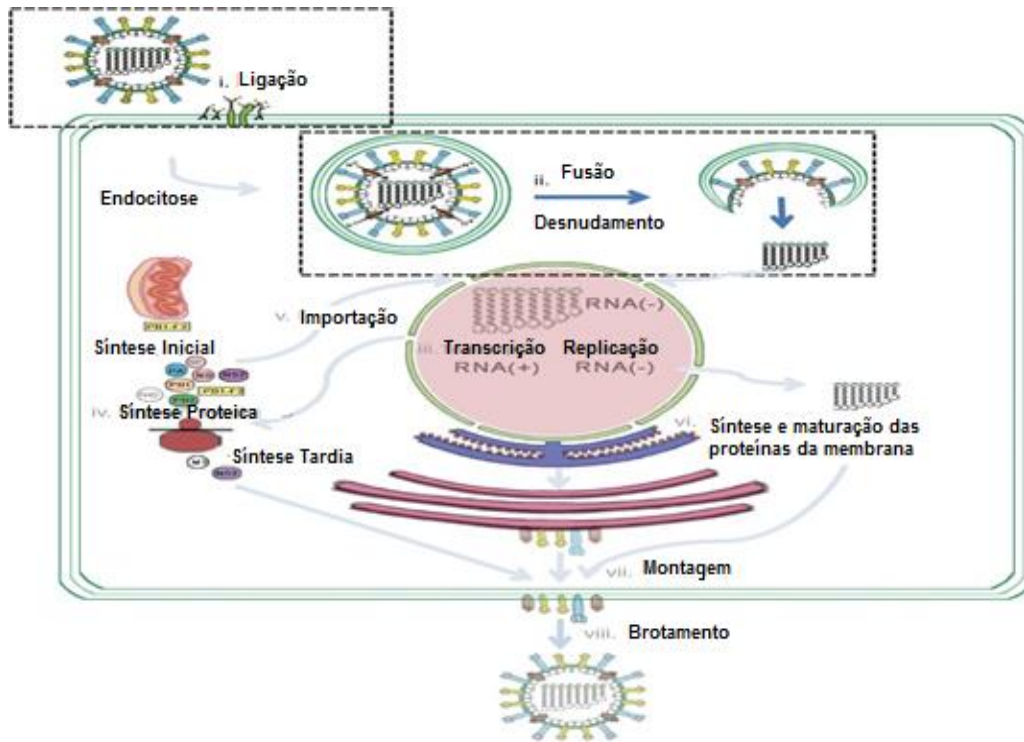


Figura 4. Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus da Influenza
 Fonte: Sriwilaijaroen N, Suzuki, 2012.³¹

1.2.4 Receptores da hemaglutinina:

Os ácidos siálicos são considerados receptores para a hemaglutinina dos vírus da Influenza e geralmente estão ligados à galactose (Gal) na superfície celular do hospedeiro em uma configuração $\alpha 2-3$ ou $\alpha 2-6$ ³⁵.

Os vírus da Influenza humana preferencialmente ligam-se ao ácido siálico do tipo $\alpha 2,6$ (SA $\alpha 2,6$ Gal), enquanto que a maioria dos vírus aviários preferencialmente liga-se a SA $\alpha 2,3$ Gal³⁶.

Em humanos, SA $\alpha 2,3$ Gal são prevalentes no trato respiratório inferior (bronquíolos e alvéolos). Assim, quando as estirpes aviárias infectam o pulmão humano, podem desencadear uma pneumonia grave e rapidamente progressiva³⁰.

1.2.5 Glicosilação

A ligação de oligossacarídeos a resíduos de asparagina de proteínas é uma modificação essencial que acontece no retículo endoplasmático e é finalizada no aparelho de Golgi ³⁷.

Esse processo, chamado de N-glicosilação, ocorre na sequência consenso N-X-S/T (onde X é qualquer aminoácido exceto prolina) e na hemaglutinina é importante para o dobramento e estabilidade da proteína ³⁸.

A modificação pós-traducional, provocada pela N-glicosilação na cabeça globular da hemaglutinina, pode modular a antigenicidade, a atividade de fusão, a virulência, a especificidade de ligação ao receptor e a evasão imune dos vírus Influenza, cobrindo sítios antigênicos e inibindo a ligação de anticorpos ^{38,39}. Tanto o ganho quanto a perda de sítios de N-glicosilação pode influenciar nestas propriedades ³⁹.

1.2.6 Sítios antigênicos da hemaglutinina

As moléculas de hemaglutinina possuem diferentes sítios antigênicos que sofrem extensas mutações. Estes sítios ocorrem em regiões expostas na superfície da hemaglutinina e estão envolvidos na neutralização do vírus ^{40,41}. Para Influenza A H1 são denominados os seguintes sítios antigênicos: Sa e Sb, quando contém epítomos predominantemente específicos, Ca1, Ca2 e Cb, quando compostos por epítomos predominantemente de reação cruzada ⁴². Para Influenza A H3 são designados de A, B, C, D e E ⁴¹. Para Influenza do tipo B, os sítios antigênicos são: 120 loop, 150 loop, 160 loop e 190 helix localizados na subunidade HA1 da hemaglutinina ^{43,44}. As descrições dos sítios antigênicos da Influenza B estão relacionadas a conformações nas estruturas secundárias da proteína, designadas hélice (helix- estrutura helicoidal) que são ligadas por alças (loops- regiões variáveis) ⁴⁵.

1.3 Epidemiologia

O vírus da Influenza causa a mais frequente doença respiratória aguda e acomete todas as faixas etárias ⁴⁶. Na América Latina e região do Caribe a Influenza sazonal é responsável por elevadas taxas de morbidade que desencadeia impacto econômico nos serviços de saúde e na sociedade ⁴⁷. A vigilância do vírus da Influenza no Brasil no período compreendido de 2000 a 2008 revelou que o total de 4.39% a 16.92% das consultas hospitalares foram decorrentes de pacientes com síndrome gripal ⁴⁸.

O perfil epidemiológico dos vírus da gripe é influenciado em grande parte por dois tipos de variações antigênicas que ocorrem, principalmente, nos antígenos hemaglutinina e neuraminidase. Tais variações tornam um indivíduo suscetível a novas infecções ⁴⁶.

As constantes mutações nas glicoproteínas de superfície – dos vírus da Influenza do tipo A e B - geram mecanismos de escape do vírus, denominado *antigenic drift*, que corresponde a mutações pontuais nos genes que codificam a HA e a NA; as mutações pontuais são consideradas brandas e responsáveis pelas epidemias anuais de Influenza. O vírus da Influenza A também sofre outro tipo de alteração antigênica denominada *antigenic shift*, que corresponde à troca completa de um ou mais segmentos do genoma viral, em função de rearranjo genético entre diferentes espécies ou através de transmissão direta de uma cepa do vírus da Influenza animal para a população humana; ambos são responsáveis pelas pandemias de Influenza (Figura 5) ^{46,49}.

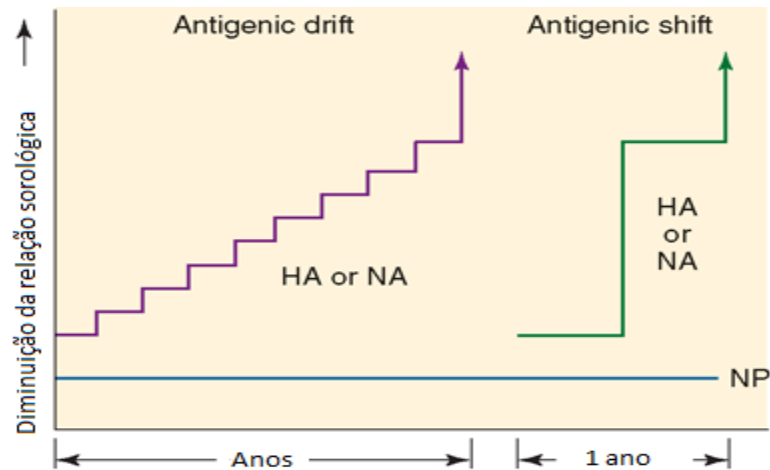


Figura 5. Antigenic drift e antigenic shift, responsáveis pelas alterações antigênicas nas duas glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) do vírus da Influenza. Comparação com a proteína interna do vírus, nucleoproteína (NP), sem alterações antigênicas.

Fonte: Brooks, 2012.³²

Apesar de o vírus da Influenza do tipo B ser mais estável quando comparado ao vírus da Influenza do tipo A, com menos *antigenic drift* e não sofrendo *antigenic shift*⁴⁸; a co-circulação das linhagens B/Yamagata e B/Victoria, as quais são antigenicamente distintas, ou seja, não conferem imunidade cruzada^{14,50,51}, demonstra a importância do monitoramento das linhagens circulantes com vistas à composição da vacina trivalente; cuja formulação inclui os componentes (A)H1, A(H3) e B; além de solicitar estudos quanto à composição de vacina quadrivalente, que contempla as linhagens B/Yamagata e B/Victoria, em sua formulação^{48,50,51,52}. Dados da literatura revelam que os vírus da Influenza do tipo B acometem preferencialmente, crianças, adolescentes e adultos jovens. Mundialmente, o vírus da Influenza do tipo B representa o total de 20% a 25% das infecções causadas pela Influenza^{50,53}.

A opção mais eficiente para o controle da doença é a prevenção utilizando-se a vacina. A composição da vacina é revisada anualmente e depende da vigilância dos vírus circulantes durante a sazonalidade da doença.

O Programa Nacional de Imunização define como prioritário para a vacinação os seguintes grupos: crianças de 6 meses a menores de 5 anos,

gestantes, puérperas, trabalhador da área da saúde, povos indígenas, indivíduos com 60 anos ou mais de idade, os adolescentes e jovens de 12 a 21 anos de idade sob medidas socioeducativas, a população privada de liberdade e os funcionários do sistema prisional, pessoas portadoras de doenças crônicas não transmissíveis e outras condições clínicas especiais (doença respiratória crônica, doença cardíaca crônica, doença renal crônica, doença hepática crônica, doença neurológica crônica, diabetes, imunossupressão, obesos, transplantados e portadores de trissomias). No ano de 2017, foram incluídos para a vacinação, os professores das escolas públicas e privadas ⁵⁴.

1.4 Vigilância dos vírus da Influenza

Atualmente, a Rede Mundial de Vigilância do Vírus da Influenza é composta por 6 Centros Colaboradores de Referência da OMS localizados na Inglaterra, Atlanta, Melbourne, Japão, China, e um Centro Colaborador para estudos da ecologia dos vírus animais localizado em Memphis; 13 laboratórios de referência da OMS para o vírus H5; 4 Laboratórios Regulatórios Essenciais, localizados na Austrália, Japão, Inglaterra e Estados Unidos da América; e grupos ad hoc criados para abordar questões emergentes específicas, além de 143 Centros Nacionais de Influenza, em 113 países, dos quais 3 localizam-se no Brasil ⁵⁵.

A Rede Nacional de Vigilância dos Vírus da Influenza foi instituída no país no ano de 2000, considerando a existência dos três Centros Nacionais de Influenza credenciados pela OMS e Ministério da Saúde (MS) na década de 50 - Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, Instituto Evandro Chagas em Belém e Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro - para subsidiar a implementação de ações de vigilância da Influenza em todos os estados da federação, com vistas à formulação da vacina contra a Influenza para o hemisfério sul ^{54,56}.

As ações de vigilância epidemiológicas dos vírus da Influenza no estado de São Paulo são coordenadas pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) “Prof. Alexandre Vranjac” da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) da Secretaria de Estado da Saúde (SES). Em função de risco de pandemia de gripe aviária o CVE/CCD/SES/SP elaborou, em 2005, o primeiro Plano de Preparação para Pandemia de Influenza do estado de São Paulo, o qual colaborou para o enfrentamento da pandemia de 2009⁵⁷.

A vigilância da Influenza no Brasil é composta pela vigilância sentinela de síndrome gripal (SG), de síndrome respiratória aguda grave em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (SRAG-UTI) e pela vigilância universal de SRAG (casos hospitalizados e óbitos - SRAG Universal). Na síndrome gripal o indivíduo apresenta febre de início súbito, mesmo que referida, acompanhada de tosse ou dor de garganta e pelo menos um dos seguintes sintomas: cefaleia, mialgia ou artralgia, na ausência de outro diagnóstico específico. Em crianças com menos de 2 anos de idade, febre de início súbito (mesmo que referida) e sintomas respiratórios (tosse, coriza e obstrução nasal), na ausência de outro diagnóstico específico, já caracteriza síndrome gripal. Na síndrome respiratória aguda grave, o indivíduo de qualquer idade, além da síndrome gripal deve apresentar dispneia. Também podem ser observados os seguintes sinais: saturação de O₂ menor que 95% ou desconforto respiratório ou aumento da frequência respiratória ou exacerbação de doença preexistente⁵⁸.

A identificação dos vírus da Influenza nas amostras respiratórias de casos suspeitos de SG ou SRAG é realizada pelas técnicas de RT-qPCR, isolamento do vírus, caracterização antigênica do vírus isolado pela reação de inibição da hemaglutinação (HI), utilizando-se soros imunes específicos doados pela OMS, além de caracterização molecular pelo sequenciamento genético viral e estudos filogenéticos. Alíquotas das amostras originais selecionadas e dos respectivos vírus isolados em células de rim de cão *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK) são encaminhados, em quatro

remessas trimestrais, para o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Atlanta, EUA), o centro colaborador da OMS das Américas responsável pela compilação das caracterizações antigênicas e genéticas das amostras de vírus procedentes de todos os NICs das Américas, além de realizar testes para avaliação de resistência aos antivirais (Figura 6). Os resultados dessas análises são apresentados em reunião anual junto à OMS para subsidiar a seleção das estirpes virais com vistas à composição da vacina ⁵⁶.



Figura 6. Distribuição da Rede Mundial de Vigilância do Vírus da Influenza, coordenada pela OMS, atualizado em 20 de dezembro de 2017.
Fonte: FluNet/ OMS ¹⁰²

1.5 Sintomas e transmissão

A doença se caracteriza pela febre de início súbito, o indivíduo infectado pelo vírus pode desenvolver tosse seca, dor de garganta, coriza, febre alta de 38°C a 40°C, calafrios, tremores, cefaleia, foto sensibilidade, mialgia e anorexia. A pneumonia decorrente de infecção primária pelo vírus é a complicação da Influenza que mais frequentemente leva à hospitalização e à morte; pneumonia secundária decorrente de complicações oriundas de infecção bacteriana, após infecção pelo vírus da Influenza, agrava o quadro

infeccioso podendo, também, levar o indivíduo ao óbito. Normalmente, o período da doença é em torno de uma semana considerada benigna e autolimitada, no entanto, fatores ligados às condições do indivíduo tais como: idade, gravidez, uso de tabaco, e indivíduos portadores de doenças crônicas poderão desenvolver um quadro grave da doença ⁵⁹. Embora a maioria das infecções pelos vírus da Influenza apresente evolução autolimitada, a febre poderá persistir de 3 a 5 dias, sendo que a tosse e a fadiga podem se prolongar por duas semanas ou mais ^{3,48,59}.

Um indivíduo infectado pelo vírus da Influenza transmite a doença pela eliminação de gotículas das secreções respiratórias pela tosse, espirro, de pessoa a pessoa (transmissão direta); a transmissão também ocorre quando um indivíduo entra em contato com superfícies contaminadas com as secreções respiratórias de doentes (transmissão indireta). O período de incubação é em torno de 1 a 4 dias. A excreção do vírus de um indivíduo infectado para o meio ambiente inicia-se 24 horas antes da manifestação dos sintomas perdurando até 10 dias. Crianças e indivíduos imunossuprimidos podem excretar o vírus por um período superior a 10 dias ⁵⁹.

1.6 Patologia

Os vírus invadem o epitélio ciliado da mucosa nasal, traqueia e brônquios causando destruição celular de gravidade variada. Vacuolização, contração das células, perda de cílios, picnose e fragmentação nuclear são seguidos de descamação das células superficiais ⁶⁰.

Na pneumonia os pulmões mostram inflamação intersticial com necrose do epitélio brônquico e alveolar ⁶¹. A resposta inflamatória, desencadeada pelo sistema imune do hospedeiro, promove o movimento de células (macrófagos, neutrófilos) para o pulmão, assim como na resposta adaptativa, células T citotóxicas migram para o local da infecção para limitar a propagação viral. Devido à destruição das células e à geração de resíduos

celulares e muco nas vias respiratórias, a função pulmonar fica prejudicada. A combinação dos efeitos dos vírus com a resposta do hospedeiro à infecção resulta nos sintomas experimentados pelo indivíduo infectado ⁶².

1.7 Caracterização Genética

A análise molecular do segmento 4 do genoma viral, que codifica a hemaglutinina, é uma importante ferramenta diagnóstica aliada à vigilância das alterações genéticas do vírus, pois permite identificar mutações envolvidas no mecanismo de evasão do vírus frente à resposta imune e à proteção conferida pela vacina, além de permitir identificar marcadores de virulência, como o localizado na posição 222 do gene, o qual está associado ao aumento da afinidade de ligação aos receptores de ácido siálico α 2-3, que são prevalentes no trato respiratório inferior ^{63,64,65,66}. A hemaglutinina é o principal antígeno contra o qual anticorpos neutralizantes são direcionados, e sua variabilidade é responsável pela evolução contínua do vírus e subseqüentes epidemias ³².

O método de Sanger é o mais utilizado para o sequenciamento parcial do genoma viral, enquanto as tecnologias mais recentes (sequenciamento de nova geração) são mais utilizadas para o sequenciamento completo do genoma. Através do sequenciamento de Sanger, a seqüência de nucleotídeos no gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza é comparada às seqüências de outros vírus da Influenza de mesmo tipo e assim são identificadas as variações entre elas. A caracterização genética é, então, esse processo de comparação de seqüências, as quais são submetidas a bancos de dados, tais como GenBank e Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) ⁶⁷.

O GenBank é o banco de dados de seqüências genéticas do NIH (National Institutes of Health) e faz parte da Colaboração Internacional de Banco de Dados de Sequências de Nucleotídeos, a qual é constituída

também pelo Banco de DNA do Japão e pelo Arquivo de Nucleotídeos Europeu ⁶⁸.

O GISAID é uma plataforma criada para compartilhamento de dados sobre Influenza, contribuindo para uma melhor compreensão sobre a circulação e evolução dos vírus da Influenza. Desde 2011, a Alemanha é o servidor oficial desta plataforma ⁶⁹.

1.8 Análise filogenética

A filogenética é o estudo da relação evolutiva entre espécies, através de dados de sequenciamento genético ^{70,71}.

A análise filogenética é uma importante ferramenta em estudos de epidemiologia molecular, podendo, por exemplo, inferir informações mais detalhadas sobre a origem de uma nova estirpe viral, sua circulação e evolução em determinada área geográfica ⁷⁰. Pode ser representada graficamente em árvores filogenéticas (cladogramas), as quais são divididas em grupos genéticos ou clados (grupos monofiléticos, ou seja, com ancestral comum) ^{67,72,73}.

Nas árvores filogenéticas dos vírus da Influenza, cada sequência de um específico vírus ocupa um ramo (linha horizontal) na árvore, o comprimento do ramo representa o número de diferenças de nucleotídeos e quanto mais separados os vírus estiverem na árvore, maiores serão as diferenças genéticas entre eles ⁶⁷.

1.9 Vacina

A vacinação é a principal medida para prevenir as infecções pelos vírus da Influenza e reduzir seu impacto na saúde pública ⁷³. Devido à grande capacidade evolutiva dos vírus da Influenza, a formulação da vacina é atualizada anualmente ⁷¹. Por isso, quanto maior for o entendimento sobre

a constante evolução e a epidemiologia dos vírus, melhor será o processo de seleção das estirpes vacinais ⁷⁴.

Assim, a rede mundial de laboratórios para vigilância da Influenza da OMS fornece informações sobre as análises antigênicas, genéticas e epidemiológicas dos vírus para subsidiar a recomendação da composição vacinal para os hemisférios norte e sul, em fevereiro e setembro de cada ano, respectivamente ².

Há três tipos de vacina contra os vírus da Influenza atualmente licenciadas: vacinas atenuadas para aplicação intranasal (LAIV), vacinas inativadas (TIV) e vacinas recombinantes compostas pela proteína HA, ambas para injeção intramuscular. Os três tipos de vacina contêm os subtipos da Influenza A, H1N1 e H3N2, além da linhagem predominante da Influenza B na última temporada ^{75,76}. Recentemente licenciada, a vacina contra a Influenza quadrivalente (QIV) inclui as duas linhagens da Influenza B junto com os dois subtipos da Influenza A ⁷⁶.

A produção de vacinas contra Influenza baseia-se na propagação viral em ovos embrionados de galinha ou cultura de células. A administração da primeira é contraindicada em casos de reação alérgica severa à proteína do ovo ⁷⁵.

Estudos recentes propõem a utilização de uma vacina universal, a qual induziria ampla proteção contra diversos vírus da Influenza e, ainda, eliminaria a necessidade de atualização anual. Para isso, proteínas virais conservadas como NP, PA, M1, M2, além da região da haste da HA, deverão ser os alvos para a vacina ^{76,77}. Contudo, o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas contra Influenza ainda é um grande desafio, pois estes antígenos conservados têm imunogenicidade relativamente fraca ^{77,78}.

2. Justificativa

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) e sua região de abrangência participam de um sistema de vigilância composto por uma rede de unidades sentinelas de síndrome gripal e síndrome respiratória aguda grave, cujo objetivo é monitorar a circulação dos vírus da Influenza. Como centro de referência para a Organização Mundial da Saúde e Ministério da Saúde, o IAL, localizado no estado mais populoso do Brasil, é responsável pelas análises antigênicas e genéticas de uma área que compreende além de São Paulo (região sudeste); os estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, além do Distrito Federal (região centro-oeste); Piauí (região nordeste); Rondônia e Tocantins (região Norte).

A grande abrangência evidencia o desafio constante em monitorar a circulação dos vírus da Influenza, assim como a importância da caracterização genética de vírus com rápido processo evolutivo, quanto às estratégias de prevenção e controle.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Analisar o padrão genético do segmento 4 do genoma viral (HA) dos vírus da Influenza do tipo A subtipos H1 e H3 , e das linhagens do vírus da Influenza do tipo B, Yamagata e Victoria, de 2013 a 2015, nas regiões de abrangência do Instituto Adolfo Lutz.

3.2 Objetivos específicos

- Monitorar mutações nos sítios antigênicos alvos dos anticorpos que conferem imunidade à infecção pela utilização da vacina;
- Identificar a mutação D222G, associada a maior severidade da doença e óbito nas amostras de Influenza A (H1N1)pdm09;
- Realizar a análise filogenética, correlacionando com as estirpes vacinais e com os vírus que circularam mundialmente.

4. Materiais e Métodos

4.1 Modelo de estudo

O modelo de estudo epidemiológico empregado foi descritivo, transversal e retrospectivo, da distribuição dos vírus da Influenza, com períodos e regiões definidas.

4.2 Casuística

4.2.1 Instituto Adolfo Lutz

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) foi fundado em 1940, em decorrência da unificação dos Institutos Bacteriológicos e de Análises Químicas, criados em 1892, para atendimento das novas políticas de saúde do estado de São Paulo. Como referência nacional de vigilância do vírus da Influenza, junto à OMS, colaborou com a saúde pública do país pelo isolamento dos tipos de vírus da Influenza responsáveis pelas pandemias de 1957, 1968 e 2009 (Figura 7) ^{79,80}. A partir de 2002 tornou-se referência macrorregional da rede nacional de vigilância do vírus da Influenza, coordenada pelo Ministério da Saúde (MS) ⁵⁶.

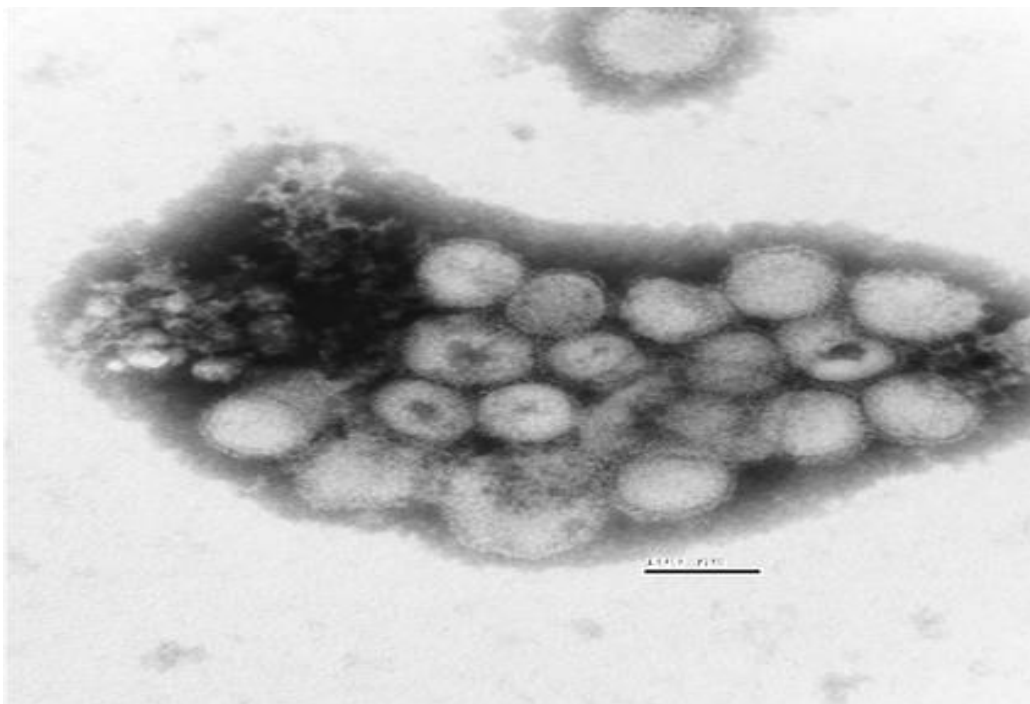


Figura 7. Vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 isolados e visualizados por microscopia eletrônica, no IAL, durante a pandemia de 2009, vistos com aumento de 200 mil vezes.

Fonte: Kisiellius J, Ueda M, 2009.⁸⁰

4.2.2 Seleção de amostras

Foram selecionadas amostras para o sequenciamento com base em critérios clínicos e epidemiológicos (diferentes semanas epidemiológicas, diferentes faixas etárias, SG e SRAG, casos de surtos, uso de oseltamivir, vacinados, óbitos) dos casos positivos para Influenza A H1N1(pdm09), A (H3N2) e Influenza B, de janeiro de 2013 a dezembro de 2015, contemplando os diferentes estados de abrangência do IAL quanto à vigilância dos vírus da Influenza, conforme recomendação do Ministério da Saúde para os laboratórios de referência⁵⁶.

Outro critério utilizado foi a seleção de amostras com $Ct \leq 30$, ou seja, com base na quantificação do produto da RT-qPCR, na qual a quantidade de DNA é medida a cada ciclo, através de sinais de fluorescência. Quando o sinal de fluorescência emitido ultrapassa o ponto de corte do teste (treshhold), o número do ciclo correspondente a este ponto é denominado Ct

(threshold cycle). Quanto menor o valor de Ct, maior a concentração de moléculas alvo na amostra ^{56,81}.

A diferenciação entre as linhagens Victoria e Yamagata dos vírus da Influenza B foi realizada pela RT-qPCR, utilizando-se o kit Influenza B Lineage Genotyping Panel - FluRUO-05, desenvolvido pelo CDC ⁸².

4.2.3 Aspectos Éticos

A partir do ano de 2000 o Ministério da Saúde implantou a Rede Nacional de Vigilância do Vírus da Influenza. Nesta rede, o Instituto Adolfo Lutz é responsável pela vigilância do vírus nos seguintes estados: São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Tocantins, Rondônia e Piauí (Figura 8). Desde então as amostras destes estados são enviadas, rotineiramente, ao Núcleo de Doenças Respiratórias do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, com vistas à identificação do vírus pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), isolamento viral, caracterização antigênica, sequenciamento genético e análise filogenética.

Depois de identificado e após o consentimento verbal para a coleta da secreção respiratória, o paciente que se enquadre na definição de caso de Síndrome Gripal (SG) é conduzido para uma sala de coleta, onde é preenchido o protocolo do Ministério da Saúde com os dados do indivíduo para cadastro no sistema nacional denominado SIVEP-GRIPE. O consentimento verbal é formalizado no sistema acima informado e no caso de crianças o consentimento é fornecido pelos pais ou responsáveis ^{83,84}. Em se tratando de internação ou óbito de Hospitais Sentinelas de SRAG-UTI, as informações são formalizadas no protocolo SIVEP-SRAG; no caso de SRAG Universal as amostras são acompanhadas das fichas de notificação individual do Sinan Web Influenza – Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) – Internada ou óbito por SRAG – CID – J11.

A Rede Nacional de Vigilância do Vírus da Influenza contempla a análise genética do vírus de rotina, pois há necessidade de avaliarmos a

evolução do vírus com vistas à seleção de amostras para composição da vacina para o Hemisfério Sul.

O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos – CEPIAL do Instituto Adolfo Lutz (parecer número 2.051.157) (anexo 9).

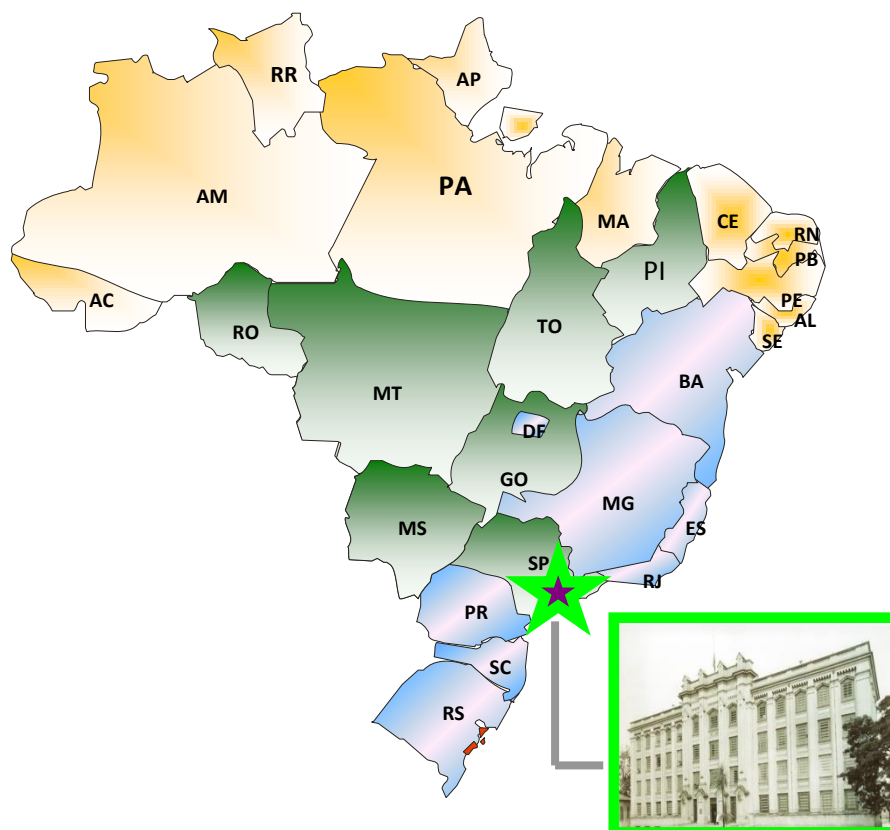


Figura 8. Distribuição dos estados de abrangência no contexto da Rede Nacional de Vigilância do vírus da Influenza coordenada pelo Ministério da Saúde, com destaque para o Instituto Adolfo Lutz (IAL), laboratório de referência macrorregional no Brasil. As regiões de abrangência do IAL estão realçadas em verde.

Fonte: Adaptada de BVS MS .⁵⁶

4.3 Amostras clínicas

Secreções respiratórias: swabs combinados (nasofaringe e orofaringe); aspirados da nasofaringe foram colhidos pelas Unidades Sentinela de síndrome gripal (SG) e de síndrome respiratória aguda grave

(SRAG-UTI) que integram a Rede Nacional de Vigilância da Influenza, nas regiões de abrangência do IAL, além da SRAG-Universal, conforme critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde, por semana epidemiológica. Para acondicionamento da amostra utilizou-se tubo cônico tipo Falcon com capacidade de 15 mL contendo 3 mL de soro fisiológico estéril. As referidas amostras foram encaminhadas na temperatura entre 2 e 8°C em até 72h ou em nitrogênio líquido ou gelo seco após este período e armazenadas em freezer -70°C no Laboratório de Vírus Respiratórios/NDR/CV/IAL.

Amostras de tecidos (pulmões e brônquios): os fragmentos de tecidos foram acondicionados em frascos estéreis e encaminhados na temperatura entre 2 e 8°C até 24h ou em nitrogênio líquido ou gelo seco após este período e armazenadas em freezer -70°C no Laboratório de Vírus Respiratórios/NDR/CV/IAL ⁸⁵.

4.4 Extrações de ácidos nucleicos

Secreções respiratórias: O volume de 200uL da secreção respiratória foi submetido à extração do RNA total – utilizando-se o kit de extração VX viral DNA/RNA “QIAxtractor virus reagent” pelo extrator automático “QIAxtractor instrument, Qiagen, CA, USA”. O RNA extraído foi eluído no volume de 60 uL.

Fragmentos de tecidos (pulmões e brônquios): Para extração de ácidos nucléicos em amostras de tecidos foram utilizados de 20 a 30 microgramas de tecido. O micro fragmento foi lisado pela utilização do kit MagNA Lyser Green Beads e do equipamento Magna Lyser-Roche, pela adição de 600uL do tampão RLT com Betamercaptoethanol 1% e para a extração do RNA do produto lisado utilizou-se o kit QIAamp RNA Blood Mini Kit 50. O RNA extraído foi eluído no volume de 50 uL.

4.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

A investigação do vírus da Influenza na amostra clínica foi realizada pela RT-qPCR utilizando-se um painel de oligonucleotídeos (primers e probes) com vistas à identificação dos vírus da Influenza do tipo A (H1N1)pdm09, A (H3N2) e dos vírus da Influenza do tipo B. As sequências dos oligonucleotídeos foram fornecidas pelo Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde (OMS) em Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ⁸⁶. Foi utilizado o Protocolo IAL 2009 ⁸⁷, uma otimização do protocolo preconizado pela OMS para os Centros Nacionais de Influenza (CNI), validado previamente no Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Adolfo Lutz.

A metodologia utilizou a enzima SuperScript^R III Platinum^R One step RT-qPCR kit (Life Technologies, Corporation, SP, Brazil) e as plataformas de RT-qPCR Roche Light Cycler^R 480 RT-qPCR systems (Roche Diagnostics, SP, Brazil) ^{86,88} e Applied BiosystemsTM 7500 real time PCR systems.

4.6 Sequenciamento e caracterização do gene da hemaglutinina

O método de Sanger foi utilizado para o sequenciamento do gene inteiro da HA (1701 a 1758 nucleotídeos) dos vírus da Influenza do tipo A (H1N1)pdm09, A (H3N2) e vírus da Influenza do tipo B, seguindo o protocolo disponibilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Utilizaram-se sequências de oligonucleotídeos fornecidas pelo CDC. Os produtos do RT-qPCR foram sequenciados utilizando-se os reagentes ABI PRISMR BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, CA, USA) e o sequenciador ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, CA, USA) ⁸⁹. A edição das sequências obtidas foi realizada pelo programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, MI, USA); quanto ao alinhamento foi utilizado o programa Bioedit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (Copyright 1997-2013 Tom Hall). A análise da filogenia e evolução

molecular foi realizada através do programa MEGA 5.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)⁹⁰.

As sequências foram submetidas ao banco de dados GISAID e, no ano de 2013, ao GenBank e ao GISAID. Os números de acesso e as identificações das sequências de hemaglutinina dos vírus da Influenza incluídos neste estudo estão representados nos anexos 1, 2 e 3, para os anos de 2013, 2014 e 2015, respectivamente. Foram incluídas ainda, na análise filogenética, sequências similares as do estudo e que circularam mundialmente, através da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponível em National Center for Biotechnology Information (NCBI), sequências de referência do CDC e sequências das vacinas. São utilizados como referências, os vírus com grupos genéticos já estabelecidos e caracterizados antigenicamente pelo CDC.

As árvores filogenéticas do gene da HA foram construídas pelo método de Neighbor-joining e pelo modelo de substituição de nucleotídeos Maximum Composite Likelihood, incluídos no software MEGA 5.2. O método de Neighbor-joining segue o princípio da evolução mínima, mostrando uma topologia com menor valor na soma dos tamanhos de ramos⁹¹.

A numeração dos aminoácidos foi obtida após a remoção do sinal peptídico, localizado no início da sequência do gene da HA, o qual funciona como marcador da proteína para o transporte através da membrana, mas que é clivado posteriormente. Esta numeração é iniciada, então, na subunidade HA1 da hemaglutinina^{92,93}.

Cada subtipo de HA tem um tamanho diferente de sinal peptídico. Correspondem a 17 aminoácidos para Influenza A (H1N1)pdm09, 16 aminoácidos para Influenza A (H3N2) e 15 aminoácidos para Influenza B^{31,40,93}.

4.7 Composição da vacina para o Hemisfério Sul

A composição da vacina trivalente contra os vírus da Influenza para o hemisfério sul, no período de 2013 a 2015 ⁹⁴, está descrita na tabela 1.

Tabela 1. Estirpes virais, recomendadas pela OMS, para a composição da vacina trivalente contra os vírus da Influenza, para o Hemisfério Sul, no período de 2013 a 2015.

2013	2014	2015
A/California/7/2009 (H1N1)	A/California/7/2009 (H1N1)	A/California/7/2009 (H1N1)
A/Victoria/361/2011 (H3N2)	A/Texas/50/2012 (H3N2)	A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)
B/Wisconsin/1/2010	B/Massachusetts/2/2012	B/Phuket/3073/2013

5. Resultados

No período de 2013 a 2015, foram recebidas e processadas 37.666 amostras com suspeita de SG e SRAG, no Laboratório de Vírus Respiratórios/NDR/CV/IAL, das quais 5.661 (15%) foram positivas para o vírus da Influenza. No ano de 2013, a positividade para Influenza entre estas amostras foi de 3.596 (18,1%). Destas, 2.270 (63,1%) foram de Influenza A(H1N1)pdm09, 238 (6,6%) de Influenza A(H3N2) e 1.088 (30,3%) de Influenza B. Em 2014 houve um total de 1.384 amostras positivas para Influenza (13%), com 284 (20,5%) Influenza A(H1N1)pdm09, 758 (54,8%) Influenza A(H3N2) e 342 (24,7%) Influenza B. Em 2015 houve um total de 681 (9,4%) amostras positivas para Influenza, com 56 (8,2%) Influenza A(H1N1)pdm09, 428 (62,8%) Influenza A(H3N2) e 197 (28,9%) Influenza B.

A distribuição das amostras positivas está discriminada na tabela 2.

Tabela 2. Distribuição de amostras biológicas humanas positivas para os vírus da Influenza, identificadas por RT-qPCR no IAL, no período de 2013 a 2015.

Ano	Total de amostras recebidas/processadas	A (H1N1)pdm09	A (H3N2)	B	Total de positivas
2013	19.820	2.270(63,1%)	238(6,6%)	1.088(30,3%)	3.596
2014	10.631	284(20,5%)	758(54,8%)	342(24,7%)	1.384
2015	7.215	56(8,2%)	428(62,8%)	197(28,9%)	681

Entre estas amostras positivas para Influenza, o total de 475 foi selecionado para o sequenciamento genético da HA, concomitante ao isolamento dos vírus para os envios trimestrais ao CDC, conforme preconizado pela OMS.

Para a análise filogenética, foram selecionadas sequências representativas do IAL, de regiões e períodos diversos para cada ano, assim como as sequências de referência do CDC e as sequências dos vírus das vacinas. A escolha das sequências representativas incluídas na árvore filogenética foi realizada através de alinhamento com o Bioedit e pesquisa das sequências com o BLAST. Com estas ferramentas, houve a visualização

da similaridade entre as sequências do IAL e consequente escolha das representativas.

A distribuição de amostras sequenciadas e analisadas filogeneticamente está discriminada na tabela 3.

Tabela 3. Distribuição de amostras biológicas humanas sequenciadas pelo método de Sanger e incluídas na análise filogenética no IAL, no período de 2013 a 2015.

Ano	Tipo de Influenza	Sequenciadas	Incluídas na análise filogenética
2013	A (H1N1)pdm09	45	15
	A (H3N2)	9	7
	B	16	8
2014	A (H1N1)pdm09	45	26
	A (H3N2)	108	61
	B	63	27
2015	A (H1N1)pdm09	18	10
	A (H3N2)	112	47
	B	59	20

5.1 Caracterização genética (HA) dos vírus da Influenza no ano de 2013:

- Influenza A (H1N1)pdm09

Os vírus caracterizados estão incluídos no grupo genético 6B (vírus referência: A/Bolivia/559/2013), de acordo com a análise filogenética do gene da hemaglutinina (Figura 9), os quais permanecem antigenicamente similares ao vírus da vacina (A/California/7/2009). Este grupo genético contém as seguintes substituições de aminoácidos: D97N, K163Q, S185T, S203T, A256T, K283E, E374K, S451N e E499K quando comparado com A/California/7/2009. A substituição de aminoácidos D222G no gene da hemaglutinina, associada à maior severidade da doença e óbito, foi

detectada em duas amostras no estado de São Paulo de casos de síndrome respiratória aguda grave (SRAG), porém não houve óbito.

- Influenza A (H3N2)

Os vírus da Influenza A (H3N2) que circularam nas regiões de abrangência do IAL pertencem ao grupo genético 3C (vírus referência: A/Victoria/361/2011 e A/Texas/50/2012), os quais apresentam alterações na composição dos aminoácidos nas seguintes posições da molécula da hemaglutinina: S45N, T48I, K62E, K144N, A198S, T212A, S214I, V223I, N312S quando comparados com o vírus referência A/Perth/16/2009.

Em uma subdivisão do grupo genético 3C, denominado subgrupo genético 3C.3 (vírus referência: A/New York/39/2012), encontram-se a maioria das sequências do IAL (Figura 10). Este subgrupo, apesar da similaridade antigênica, possui as seguintes mutações, quando comparado com o vírus da vacina A/Victoria/361/2011: Q33R, T128A, R142G, N145S, N278K.

- Influenza B

Todas as sequências analisadas estão incluídas no grupo genético 1A da linhagem Victoria e são antigenicamente similares ao vírus referência: B/Brisbane/60/2008 (Figura 11).

Árvore filogenética Influenza A (H1N1)pdm09
Hemaglutinina (HA)
2013

Vacina 2013
Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (data de coleta):

Mar

Apr

Jun

Jul

Aug

Sep

Oct

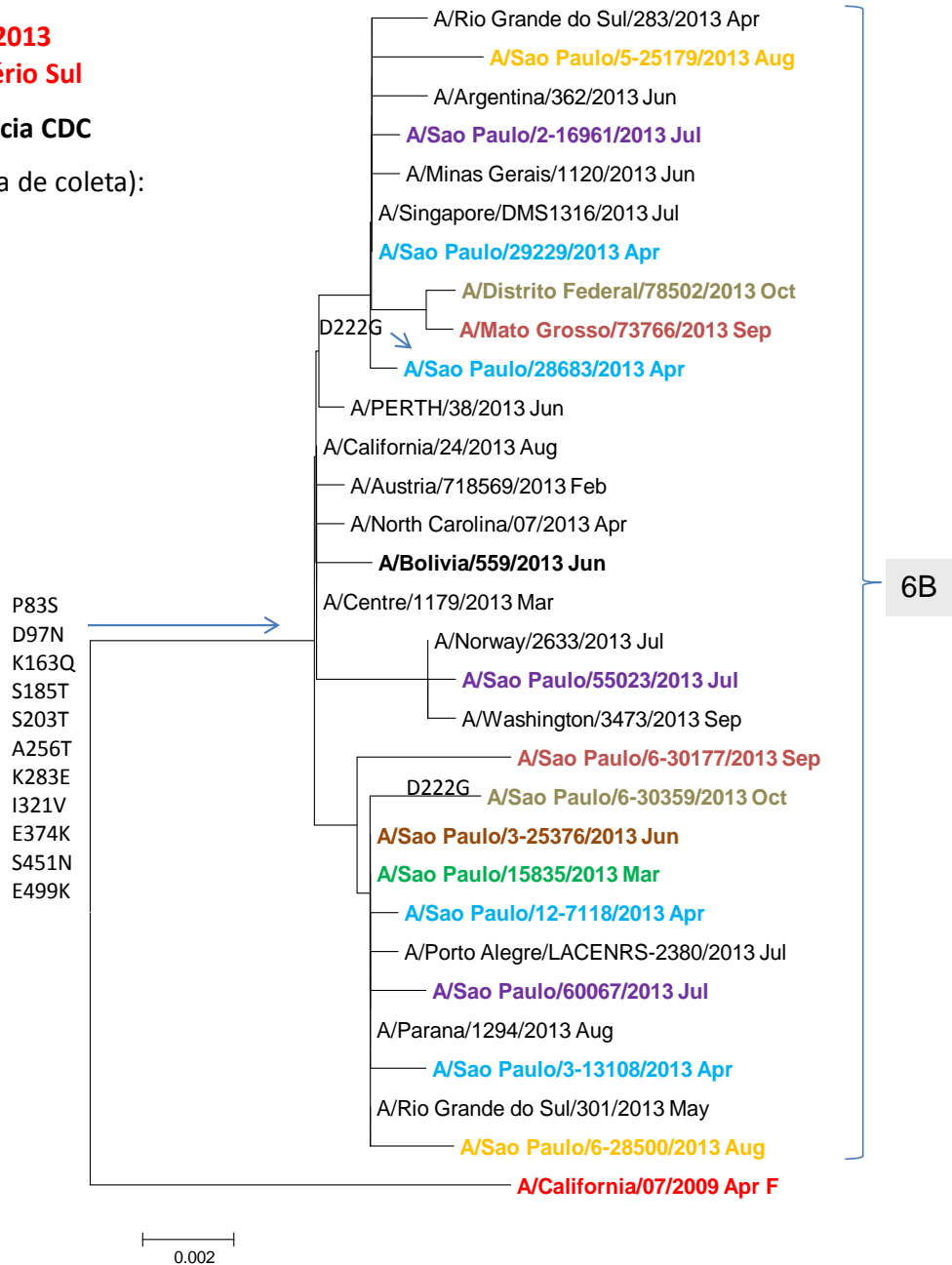


Figura 9. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 coletados no ano de 2013. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal.

Árvore filogenética Influenza A (H3N2)
Hemaglutinina (HA)
2013

Vacina 2013
Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (data de coleta):

Feb

Jun

Jul

Aug

Dec

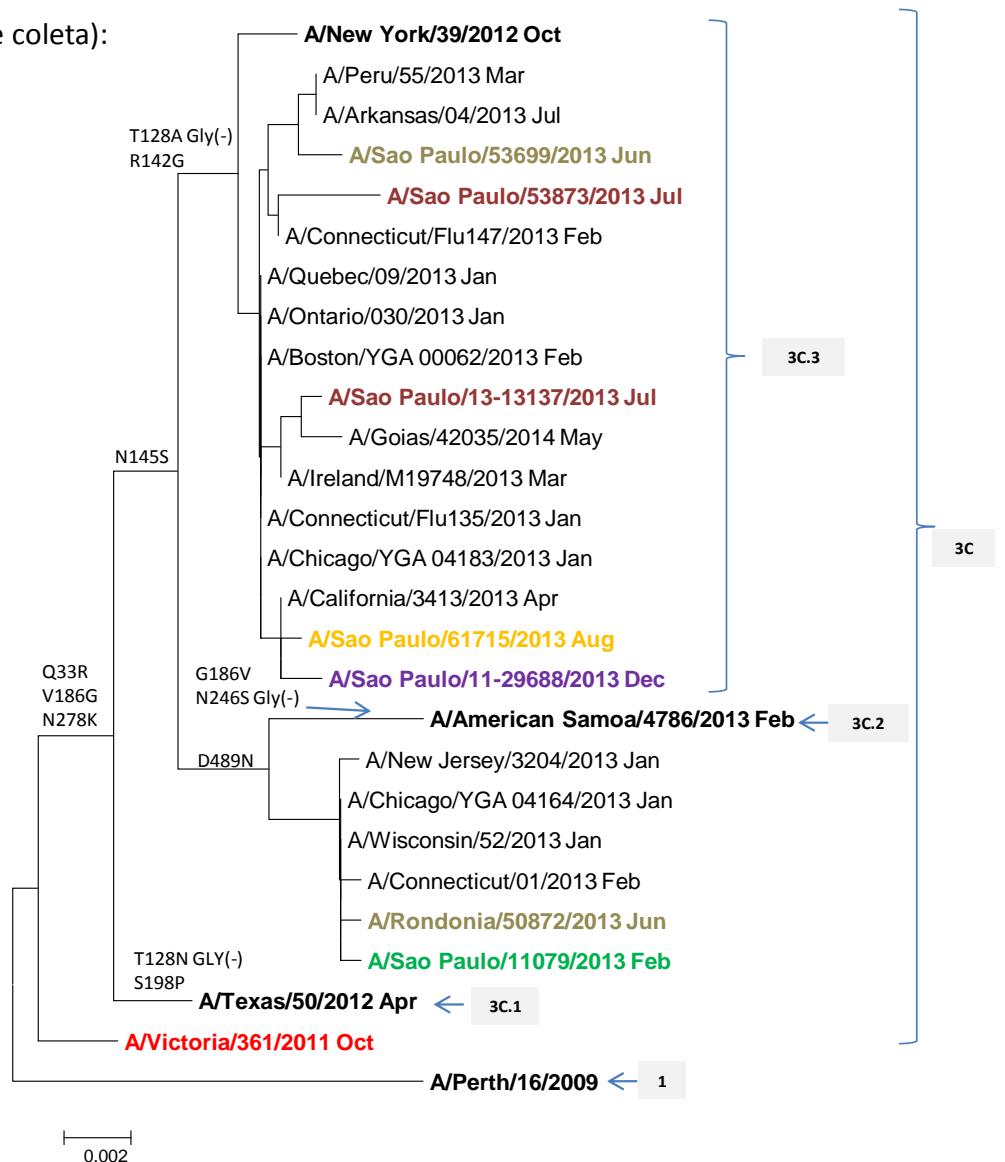


Figura 10. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H3N2) coletados no ano de 2013. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal.

Árvore filogenética Influenza B
Hemaglutinina (HA)
2013

Vacina 2013
Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (data de coleta):

Apr

Jul

Aug

Sep

Y3 – Yam (clade 3)

V1A – Vic (clade 1A)

V1B – Vic (clade 1B)

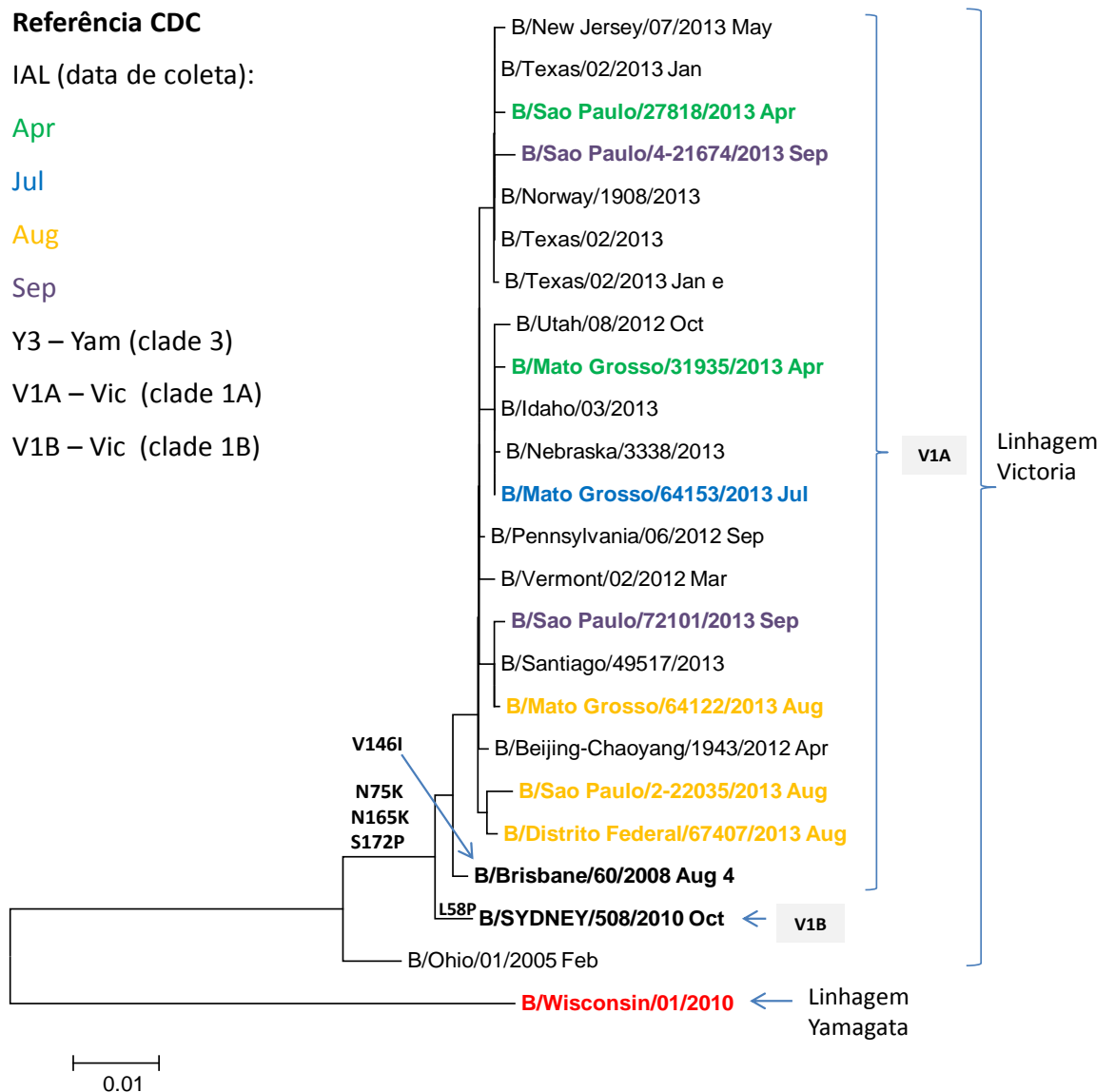


Figura 11. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza B coletados no ano de 2013. As mutações na linhagem Victoria estão relacionadas a estirpe vacinal B/Ohio/01/2005, anterior a B/Brisbane/60/2008.

5.2 Caracterização genética dos vírus da Influenza no ano de 2014

- Influenza A (H1N1)pdm09

Todos os vírus caracterizados estão incluídos no grupo genético 6B, de acordo com a análise filogenética do gene da hemaglutinina (Figura 12), os quais permanecem antigenicamente similares ao vírus da vacina A/California/7/2009. A substituição D222G no gene da hemaglutinina, associada à maior severidade da doença e óbito, não foi detectada.

- Influenza A H3N2

Os vírus da Influenza A (H3N2) que circularam em 2014 pertencem ao subgrupo genético 3C.3, predominantemente. No entanto, também há sequências do IAL incluídas no subgrupo genético 3C.2a (vírus referência: A/Nebraska/04/2014), o qual contém as seguintes substituições de aminoácidos, quando comparado com o vírus da vacina (A/Texas/50/2012) e com o vírus de referência (A/Victoria/361/2011): L3I, K160T, Q311H, D489N (Figura 13).

- Influenza B

Entre os vírus da Influenza B caracterizados, incluem-se sequências das linhagens Victoria e Yamagata (Figura 14). Todos os vírus incluídos na linhagem Yamagata pertencem ao grupo genético 3 (vírus referência: B/Wisconsin/01/2010).

Os vírus pertencentes à linhagem Victoria estão incluídos no grupo genético 1A.

Árvore filogenética Influenza A (H1N1)pdm09
Hemaglutinina (HA)
2014

Vacina 2014
Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (data de coleta):

Jan/Fev

Mar/Apr

May/Jun

Jul/Aug

Sep/Oct

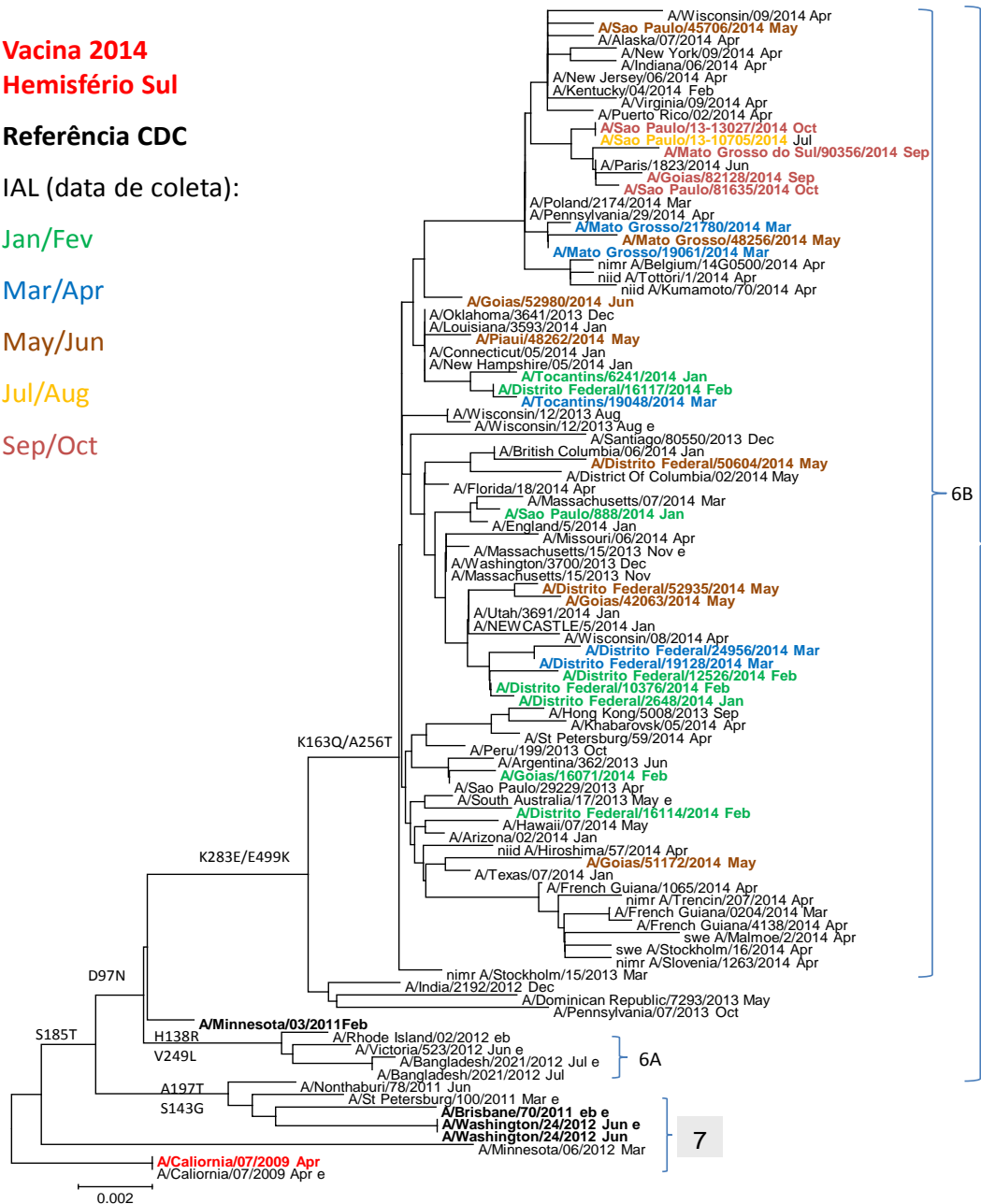


Figura 12. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 coletados no ano de 2014. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal.

Árvore filogenética Influenza A (H3N2)
Hemaglutinina (HA)
2014

Vacina 2014
Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (data de coleta):

Jan/Feb

Mar/Apr

May/Jun

Jul/Aug

Sep/Oct

Nov/Dec

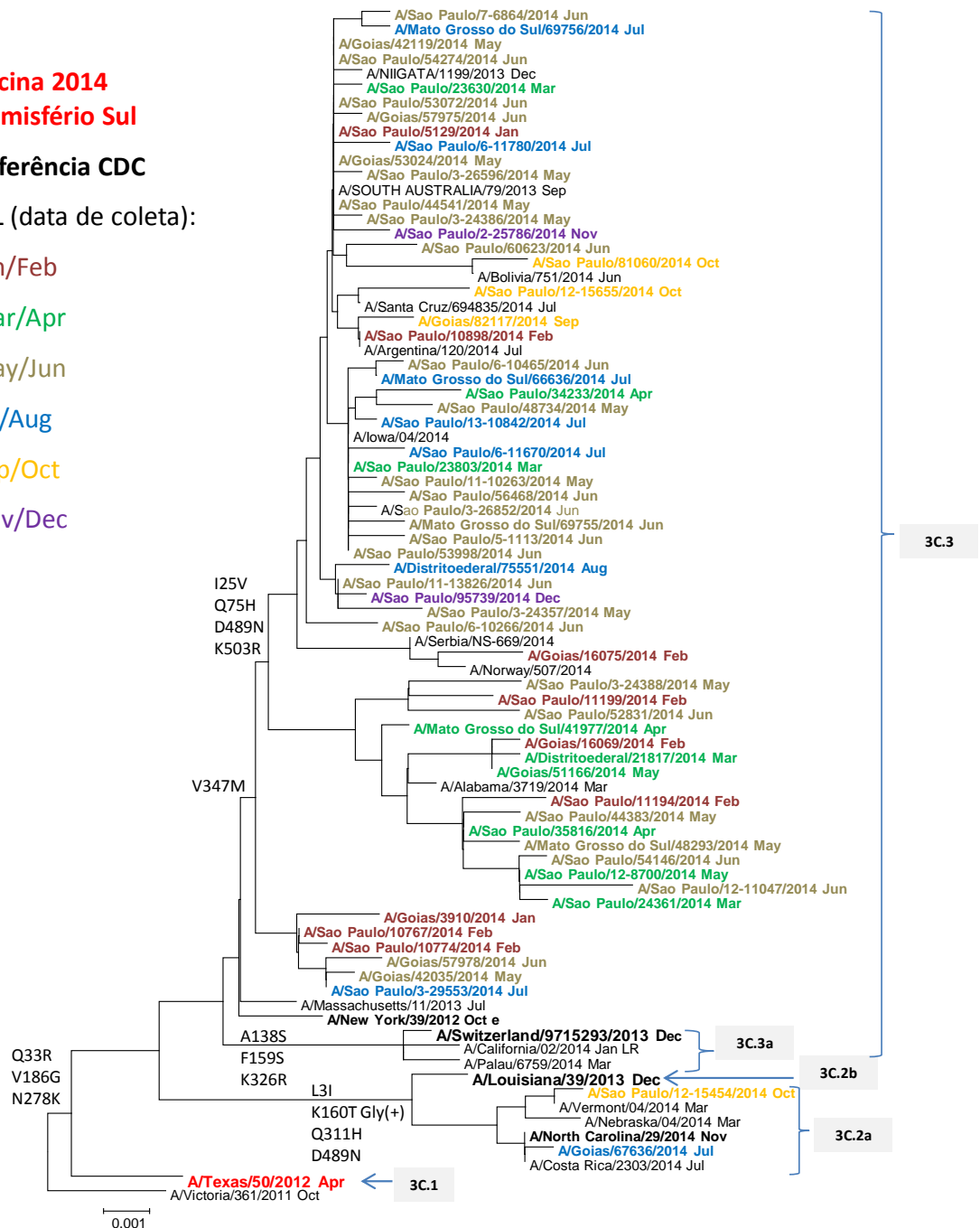


Figura 13. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H3N2) coletados no ano de 2014. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal A/Victoria/361/2011.

Árvore filogenética Influenza B
Hemaglutinina (HA)
2014

Vacina 2014 Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (data de coleta):

Jan/Feb/Apr

May/Jun

Jul/Aug

Sep/Oct

Nov/Dec

Y2 – Yam (clade 2)

Y3 – Yam (clade 3)

V1A – Vic (clade 1A)

V1B – Vic (clade 1B)

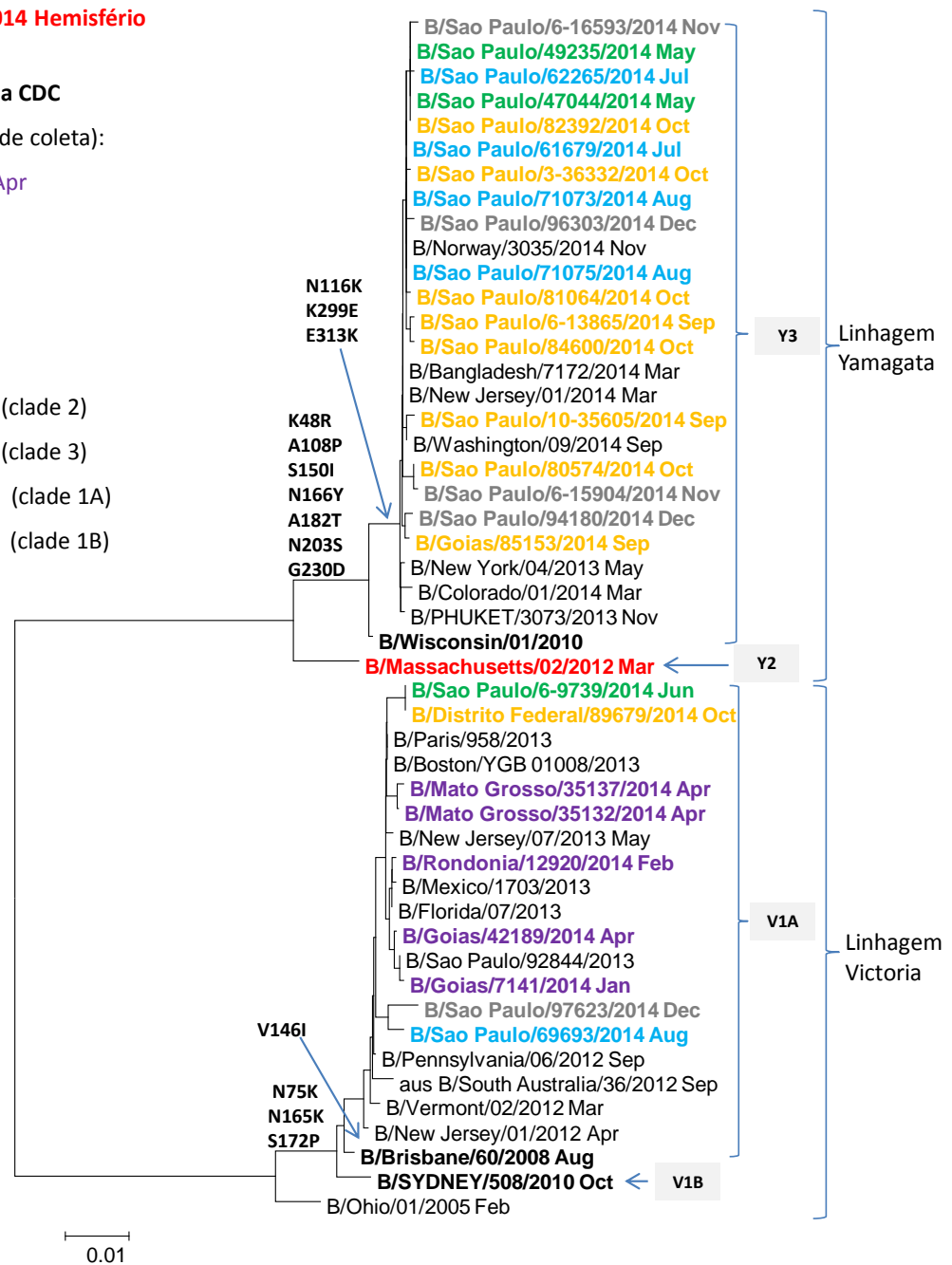


Figura 14. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza B coletados no ano de 2014. As mutações na linhagem Yamagata estão relacionadas à estirpe vacinal B/Massachusetts/02/2012. As mutações na linhagem Victoria estão relacionadas a estirpe vacinal B/Ohio/01/2005.

5.3 Caracterização genética dos vírus da Influenza no ano de 2015

- Influenza A (H1N1)pdm09

Todos os vírus caracterizados estão incluídos no grupo genético 6B, de acordo com a análise filogenética do gene da hemaglutinina (Figura 15), os quais permanecem antigenicamente similares ao vírus da vacina (A/California/7/2009). Este grupo genético contém as seguintes substituições de aminoácidos: P83S, D97N, K163Q, S185T, S203T, A256T, K283E, E374K, S451N e E499K quando comparados com A/California/7/2009. Outras mutações podem ser observadas, tais como: N129D, E491G, E506D, I510V, incluindo R205K, a qual ocorre em um sítio antigênico. A substituição D222G no gene da hemaglutinina, associada à maior severidade da doença e óbito, não foi detectada.

- Influenza A (H3N2)

Baseado na caracterização genética da hemaglutinina no período de 2015, os vírus da Influenza A (H3N2) pertencem a quatro subgrupos genéticos: 3C.3, 3C.2a, 3C.3a e 3C.3b (Figura 16).

Os vírus pertencentes ao subgrupo genético 3C.3a (vírus referência: A/Switzerland/9715293/2013) foram coletados em São Paulo. Este subgrupo genético contém as seguintes mutações, quando comparado com o vírus de referência A/Victoria/361/2011: T128A, A138S, N145S.

No subgrupo genético 3C.3b, há apenas uma sequência, do Distrito Federal. As seguintes substituições de aminoácidos são observadas neste subgrupo: E62K, K83R, N122D, N128A, R142G, N145S, L157S, P198S, R261Q, V347K. Os vírus incluídos neste subgrupo são antigenicamente similares ao vírus de referência (A/Texas/50/2012), assim como os vírus incluídos no subgrupo genético 3C.3.

No subgrupo genético 3C.2a, as seguintes substituições de aminoácidos são observadas: L3I, F159Y, K160T, Q311H, D489N. A maioria

dos vírus pertencentes a este subgrupo genético é similar antígenicamente ao vírus da vacina (A/Switzerland/9715293/2013).

- Influenza B

Entre os vírus Influenza B, a linhagem Yamagata predominou. De acordo com as alterações de aminoácidos no gene da hemaglutinina, todos pertencem ao grupo genético 3 (Figura 17). São, portanto, antígenicamente similares a B/Phuket/3073/2013, o atual componente da vacina para o Hemisfério Sul.

Os vírus pertencentes à linhagem Victoria estão incluídos no grupo genético 1A.

Árvore filogenética Influenza A (H1N1)pdm09
Hemaglutinina (HA)
2015

Vacina 2015
Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (data de coleta):

Jan

Feb

Mar

Apr

Sep

Dec

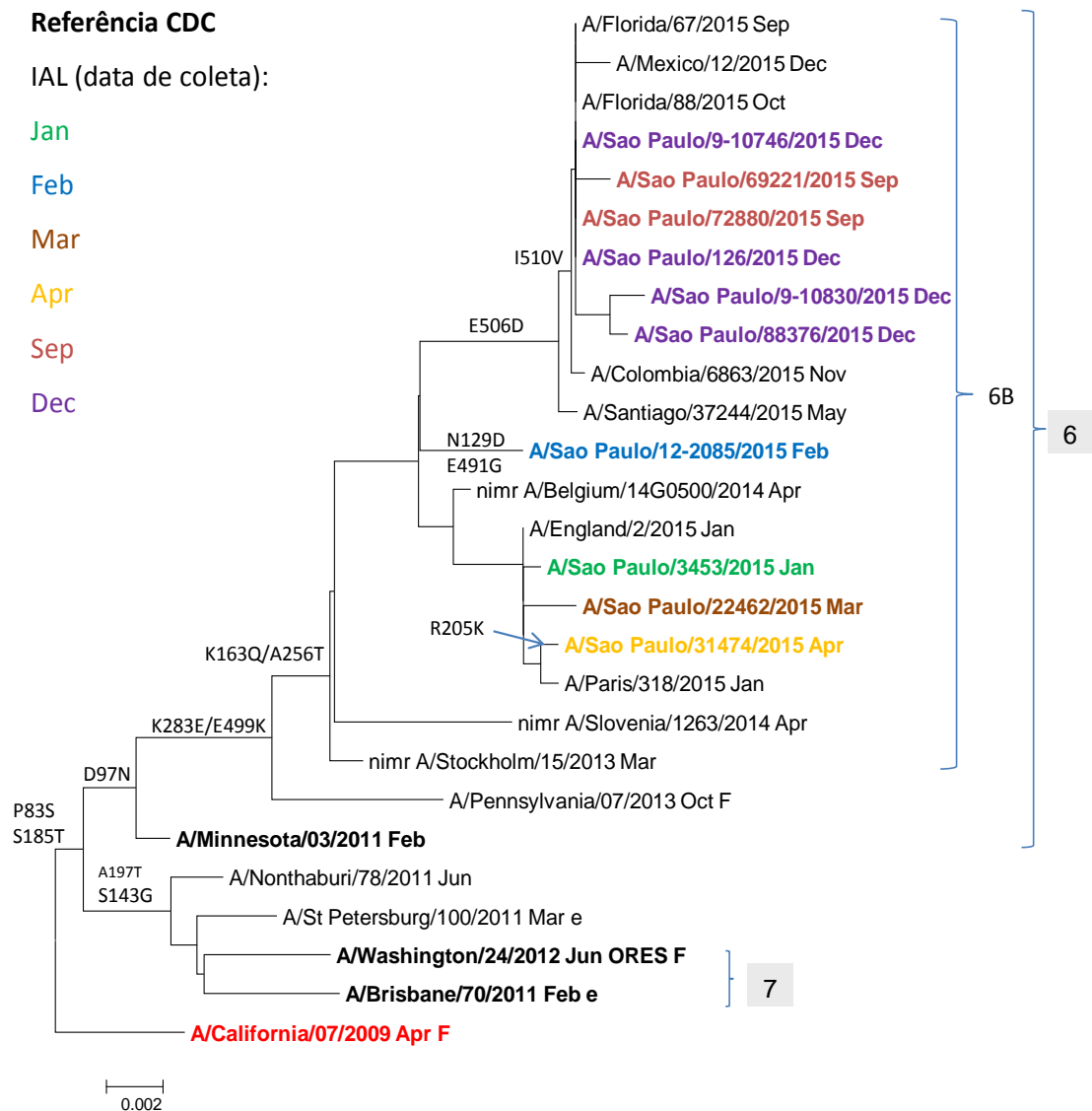


Figura 15. . Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 coletados no ano de 2015. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal A/California/07/2009.

Árvore filogenética Influenza A (H3N2)
Hemaglutinina (HA)
2015

Vacina 2015
Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (data de coleta):

Jan
Fev
Mar
Abr
May

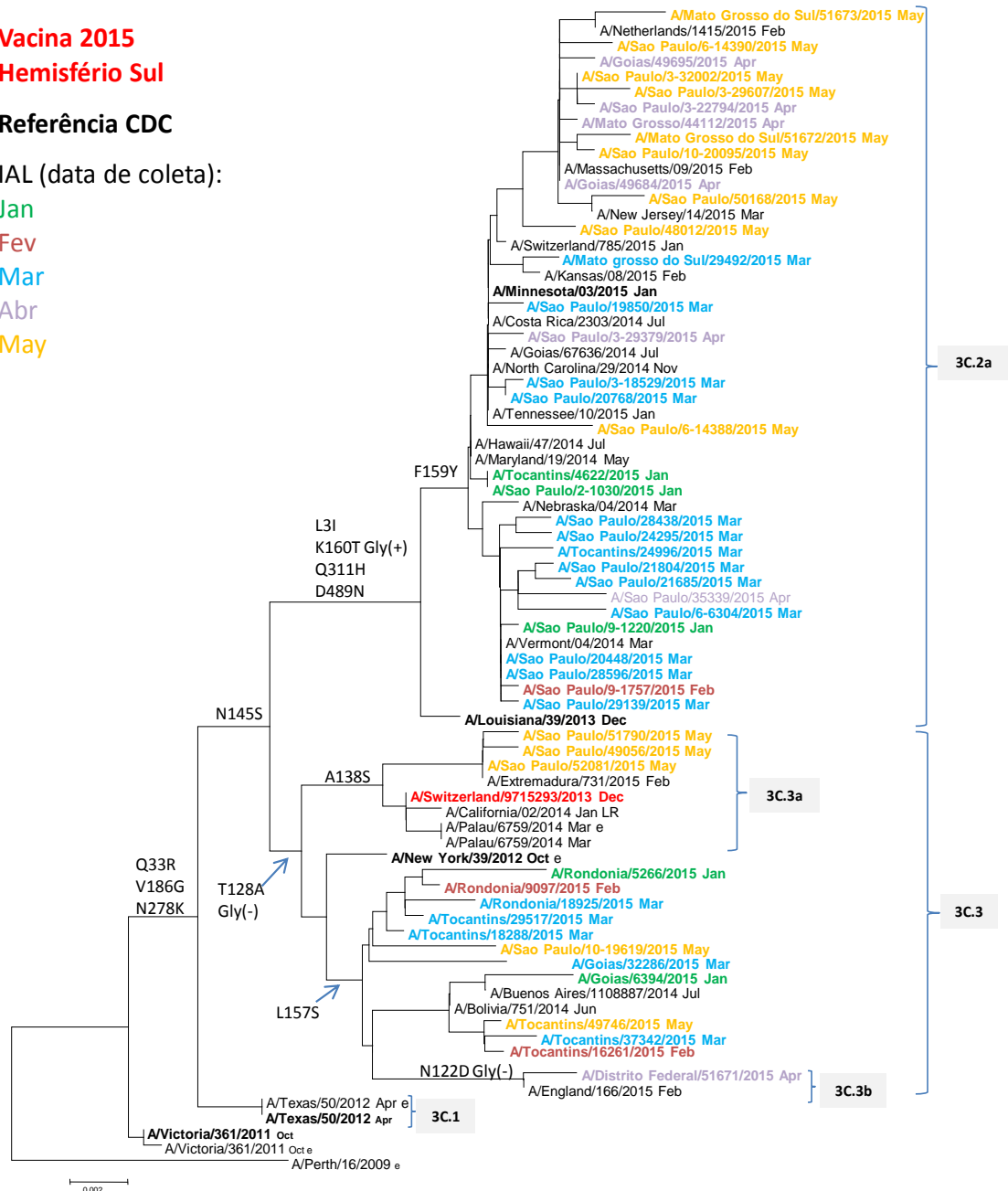


Figura 16. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H3N2) coletados no ano de 2015. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal A/Victoria/361/2011.

Árvore filogenética Influenza B
Hemaglutinina (HA)
2015

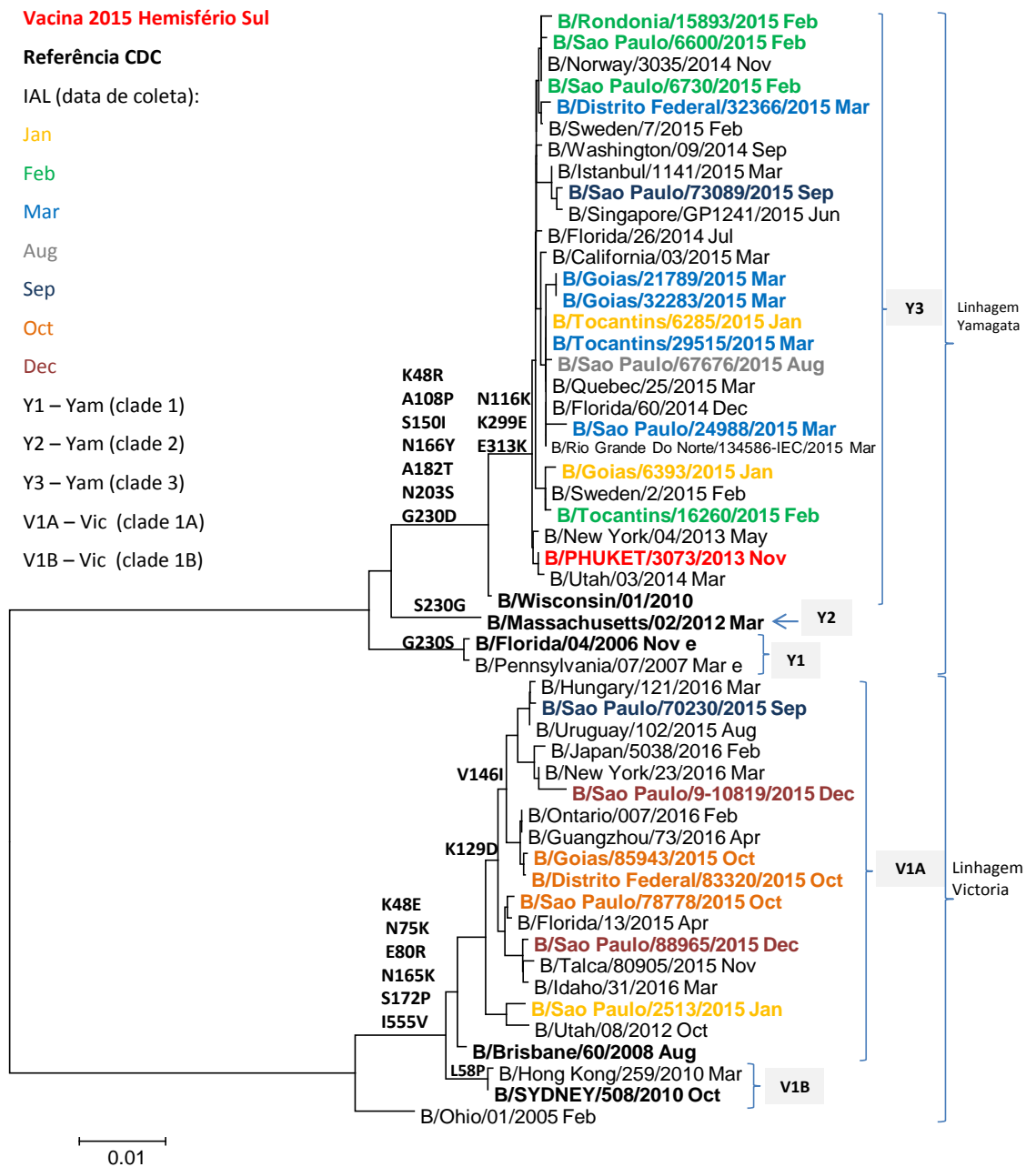


Figura 17. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza B coletados no ano de 2015. As mutações na linhagem Yamagata estão relacionadas à estirpe vacinal B/Massachusetts/02/2012. As mutações na linhagem Victoria estão relacionadas a estirpe vacinal B/Ohio/01/2005.

5.4 Árvores filogenéticas dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) e dos vírus da Influenza B, no período de 2013 a 2015

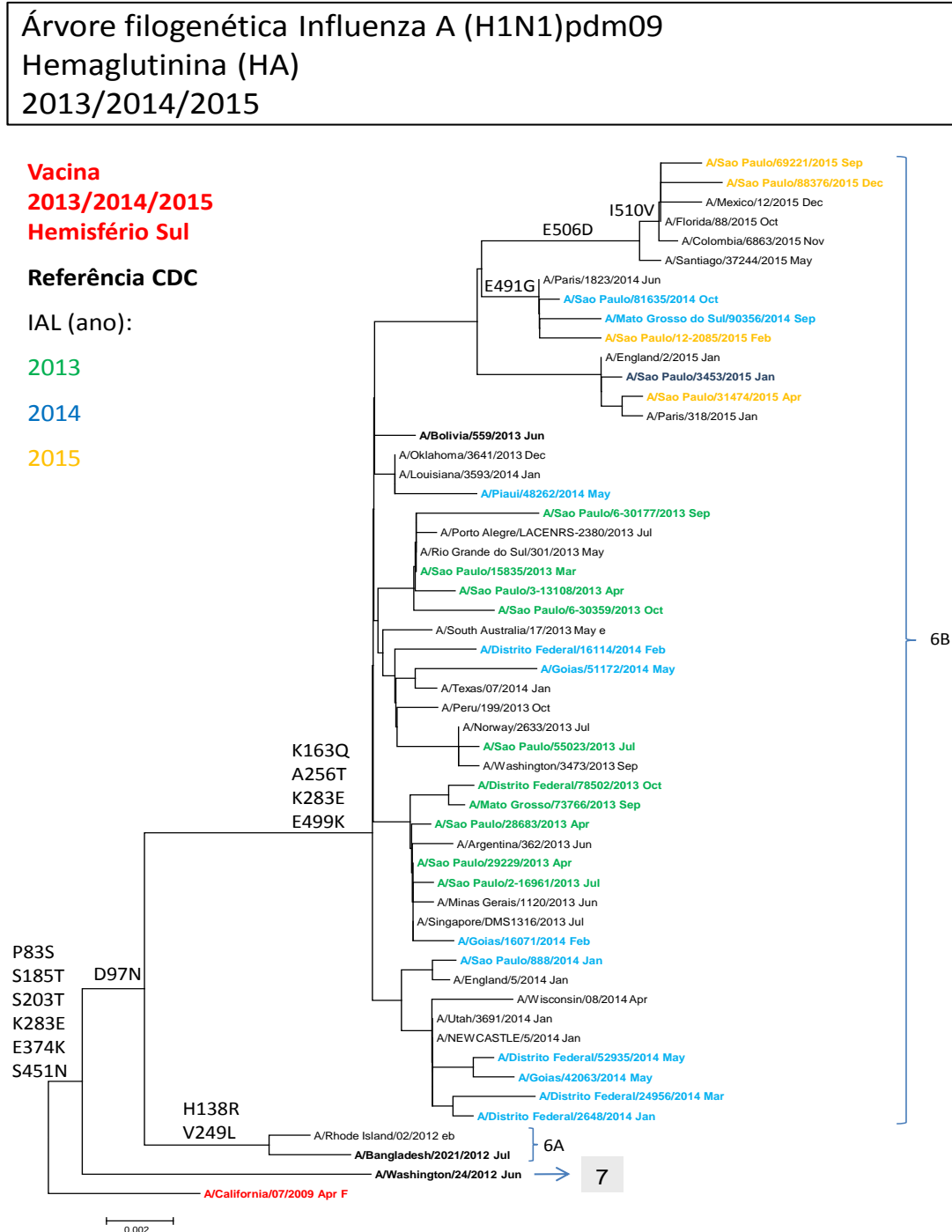


Figura 18. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 coletados no período de 2013 a 2015. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal A/California/07/2009.

Árvore filogenética Influenza A (H3N2)
Hemaglutinina (HA)
2013/2014/2015

Vacinas
2013/2014/2015
Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (ano):

2013

2014

2015

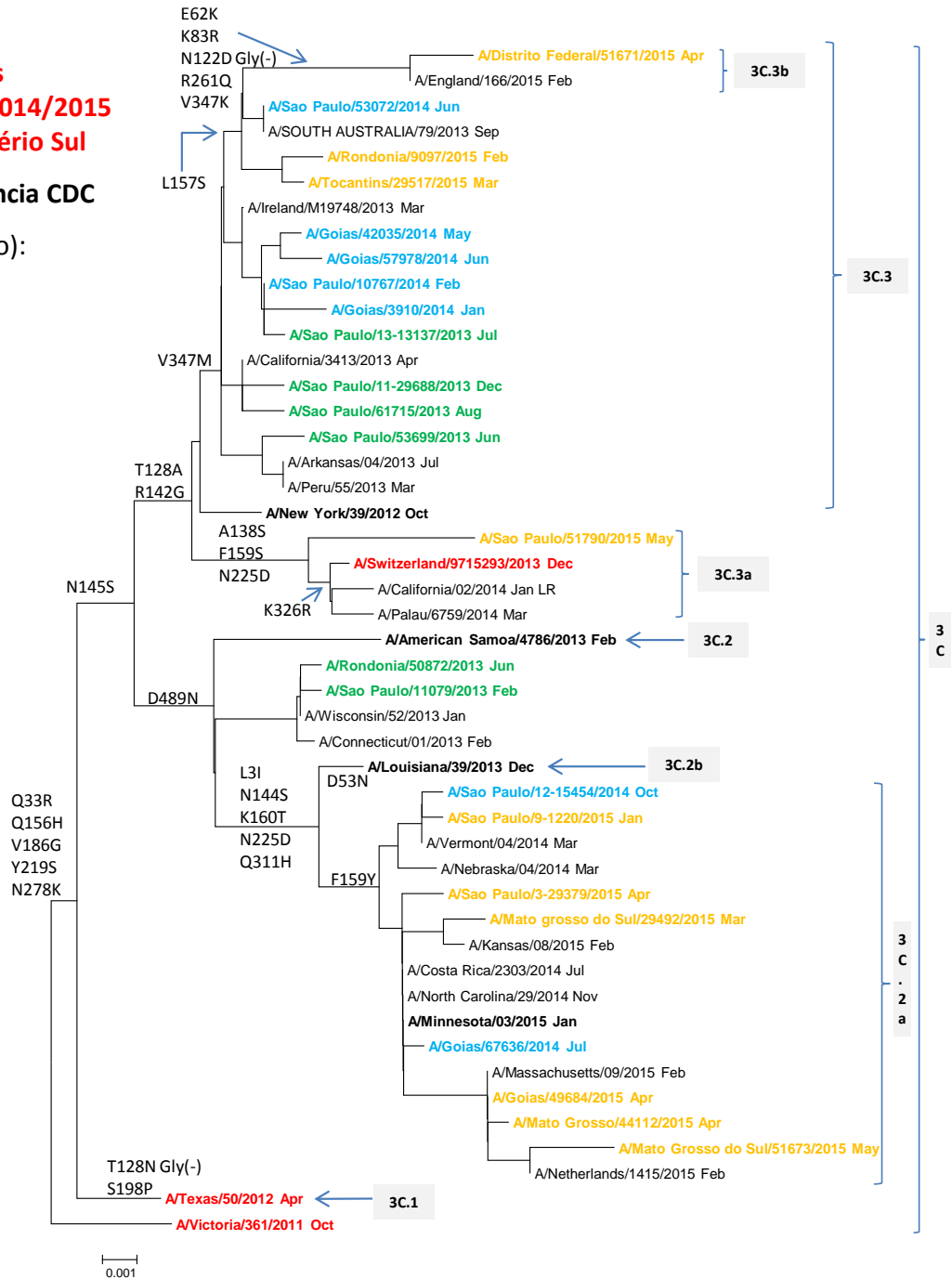


Figura 19. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza A(H3N2) coletados no período de 2013 a 2015. As mutações estão relacionadas à estirpe vacinal A/Victoria/361/2011.

Árvore filogenética Influenza B Hemaglutinina (HA) 2013/2014/2015

Vacina 2013/2014/2015

Hemisfério Sul

Referência CDC

IAL (ano):

2013

2014

2015

Y2 – Yam (clade 2)

Y3 – Yam (clade 3)

V1A – Vic (clade 1A)

V1B – Vic (clade 1B)

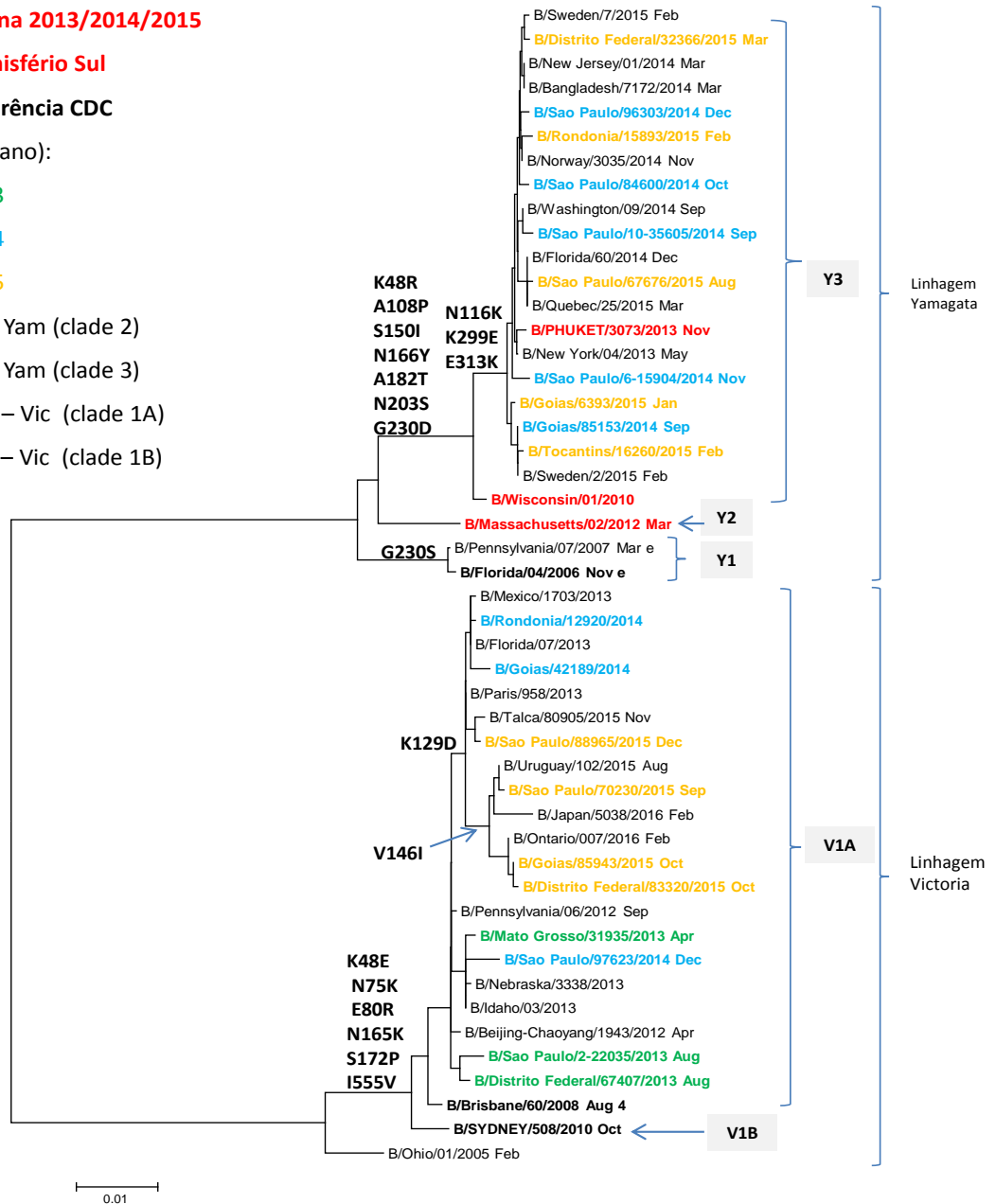


Figura 20. Árvore filogenética do gene da hemaglutinina dos vírus da Influenza B coletados no período de 2013 a 2015. As mutações na linhagem Yamagata estão relacionadas à estirpe vacinal B/Massachusetts/02/2012. As mutações na linhagem Victoria estão relacionadas a estirpe vacinal B/Ohio/01/2005.

5.5 Mutações em sítios antigênicos

Na tabela 4 estão destacadas as mutações em sítios antigênicos, as quais podem impactar na eficácia da vacina.

Tabela 4. Substituições de aminoácidos na HA dos vírus da Influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B(linhagem Victoria) e B(linhagem Yamagata), analisados filogeneticamente, na região de abrangência do IAL, no período de 2013 a 2015, comparados com a estirpe vacinal A/California/7/2009, A/Victoria/361/2011, B/Ohio/01/2005 e B/Massachusetts/02/2012, respectivamente, empregadas no mesmo período.

Substituições de aminoácidos na HA			
A(H1N1)pdm09	A(H3N2)	B (Linhagem Victoria)	B (Linhagem Yamagata)
P83S	L3I	K48E	K48R
D97N	Q33R	N75K	A108P
K163Q Sa	T128A A	E80R	N116K 120-loop
S185T Sb	R142G A	I117V 120-loop	S150I 150-loop
S203T Ca1	N144S A	K129D/N 120-loop	N166Y 160-loop
D222G	N145S A	V146I 150-loop	L173Q
A256T	F159Y B	N165K 160-loop	A182T
D274N	K160T B	S172P	N203S
K283E	N225D D	I555V	G230D
I321V	N278K		K299E
E374K	Q311H		E313K
S451N	V347M/K		
E499K	D489N		
	D493N		

Somente as substituições de aminoácidos encontradas em duas ou mais sequências estão apresentadas nesta tabela.

Substituições em sítios antigênicos estão destacadas em cinza; sítios antigênicos estão identificados em negrito.

6. Discussão

Os estudos filogenéticos do vírus da Influenza contribuem para o conhecimento do padrão de circulação dos vírus mundialmente, bem como para o estudo da gênese e disseminação das variantes virais. As mutações genéticas em sítios antigênicos da hemaglutinina podem impactar na eficácia da vacina anual e gerar mecanismo de evasão do vírus frente à resposta imune⁹⁵.

No período de 2013 a 2015, as análises filogenéticas da hemaglutinina dos vírus da Influenza identificadas nos estados de abrangência do Instituto Adolfo Lutz (IAL), evidenciaram a evolução constante destes vírus.

Os vírus da Influenza A (H1N1)pdm09, circulantes nos anos de 2013, 2014 e 2015, permaneceram similares ao vírus da vacina (A/California/7/2009), quando caracterizados antigenicamente com antissoro de furão, porém com diversas mutações genéticas, entre as quais a mutação K163Q. Esta mutação no principal sítio antigênico da HA (Sa) ocorreu em estirpes epidêmicas, as quais apresentavam resistência a anticorpos neutralizantes humanos que reconhecem esta região^{95,96,97}. Após o ano de 2013, os vírus da Influenza A (H1N1)pdm09 que foram classificados no grupo genético (clado) 6B continham, então, a mutação K163Q, responsável por *drift* antigênico^{96,98}. Em outro sítio antigênico da HA (Sb), foi observada a mutação S185T, a partir de 2013. Trata-se de uma substituição localizada próxima ao sítio de ligação a receptores celulares^{31,43}. A substituição D222G, associada à maior severidade da doença e óbito, foi detectada somente em 2013, em casos de síndrome respiratória aguda grave (SRAG), porém sem ocorrência de óbito.

Os vírus da Influenza A (H3N2), desde 2013, apresentaram mutações responsáveis por sua inclusão em diferentes subgrupos do grupo genético 3C. As mutações R142G e N145S, observadas em 2013, localizam-se no sítio antigênico A. A mutação K160T localiza-se no sítio antigênico B, resulta no ganho de um sítio de glicosilação e foi observada a partir de 2014,

ano em que também ocorreu a mutação F159Y, no sítio antigênico B. A mutação na posição 159, compartilhada pelos subgrupos genéticos 3C.2a (F159Y) e 3C.3a (F159S) foi associada à diminuição na resposta a anticorpos produzidos pela vacina (A/Texas/50/2012)⁹⁹. Houve uma estirpe vacinal diferente para cada ano, no Hemisfério Sul. Em 2013 e 2015 os vírus circulantes foram antigenicamente similares à vacina anual. No entanto, em 2014, os vírus que circularam nas regiões de abrangência do IAL corresponderam a grupos genéticos diferentes da vacina (A/Texas/50/2012).

A co-circulação das linhagens B/Yamagata e B/Victoria, as quais são antigenicamente distintas, ocorreu em 2014 e 2015, embora os vírus predominantes em ambos os períodos correspondessem à linhagem vacinal. Ao contrário do observado em 2013, quando os vírus circulantes (linhagem Victoria) não apresentaram similaridade com o vírus da vacina (linhagem Yamagata)¹⁰⁰.

Como observado por Langat et al.(2017)⁵³, há divergências genéticas claras entre os grupos genéticos (clados) da HA dos vírus da Influenza B da linhagem Victoria, embora eles sejam antigenicamente semelhantes. Por outro lado, os grupos genéticos da HA da linhagem Yamagata são divergentes genética e antigenicamente. Isto pôde ser observado no período estudado, quando ocorreram diversas mutações no grupo genético 3 da linhagem Yamagata, resultando em *drift* antigênico e seleção de nova estirpe vacinal em 2015.

Desde 2014 as seguintes mutações, correspondentes ao grupo genético 3 (clado 3), foram observadas: N116K (no sítio antigênico 120 loop), S150I (no sítio antigênico 150 loop) e N166Y (no sítio antigênico 160 loop). Tanto em 2014 quanto em 2015, o grupo genético 3 predominou na linhagem Yamagata e incluiu a nova estirpe vacinal B/Phuket/3073/2013, no ano de 2015.

Os vírus da Influenza A (H1N1)pdm09 foram o subtipo mundialmente predominante em 2013, seguidos por Influenza A (H3N2) e Influenza B (anexo 4)¹⁰¹.

No Brasil, no ano de 2013, houve maior circulação dos vírus Influenza A (H1N1)pdm09, embora com aumento na circulação dos vírus Influenza B e Influenza A (H3N2) a partir da SE (semana epidemiológica) 20 (12/05 a 18/05) (anexo 5). A região sudeste registrou o maior número de casos de SRAG confirmados por Influenza, representando 58,7% (3.482/5.935) do total de casos notificados no país, com destaque para o estado de São Paulo, onde predominaram os casos de Influenza A (H1N1)pdm09 (anexo 6)^{100,101}, os quais continham a mutação K163Q, quando caracterizados geneticamente. Ainda em São Paulo, a partir da SE 17 (21/04 a 27/04), uma semana após o início da campanha de vacinação, observou-se um aumento na circulação dos vírus da Influenza B, cuja estirpe vacinal era de linhagem diferente (Yamagata) (anexo 6)¹⁰².

Em 2014, os vírus da Influenza A (H3N2) predominaram mundialmente, com aumento de circulação no final deste ano no hemisfério norte (anexo 4)¹⁰³. A maioria dos vírus da Influenza A (H3N2) foi caracterizada antígenicamente diferente dos vírus da vacina para o hemisfério norte 2014-2015 (A/Texas/50/2012)¹⁰⁴. Esta alteração antigênica, relacionada a mutações no gene da hemaglutinina foi associada à redução na eficácia da vacina⁹⁹.

A região sudeste do Brasil, em 2014, registrou o maior número de casos e óbitos por Influenza, com predomínio do vírus da Influenza A (H3N2) (anexos 5 e 7) e destaque para o estado de São Paulo (644/849 casos de SRAG confirmados por Influenza)¹⁰². Também houve grande número de notificações na região sul, principalmente de SRAG por vírus da Influenza A (H3N2)¹⁰⁵.

No ano de 2015, continuou o predomínio da circulação dos vírus da Influenza A (H3N2) no hemisfério norte (anexo 4), com divergência entre os vírus circulantes e os vírus contemplados na vacina da temporada 2014-15 no hemisfério norte (A/Texas/50/2012)¹⁰⁶. Entretanto, no hemisfério sul, a composição da vacina em 2015 (A/Switzerland/9715293/2013) já correspondia à maioria dos recentes vírus da Influenza A (H3N2) circulantes, os quais foram classificados nos grupos genéticos 3C.2a e 3C.3a¹⁰⁷.

Para os vírus da influenza B, a linhagem Yamagata predominou mundialmente em 2015 e a composição da vacina também foi alterada para o hemisfério sul (B/Phuket/3073/2013) neste ano. Desta forma, os vírus da vacina, assim como os vírus da Influenza B prevalentes estavam incluídos no grupo genético 3 ¹⁰⁷.

Na maior parte do Brasil predominou os vírus da Influenza A (H3N2) no ano de 2015 (anexos 5 e 8), assim como no ano anterior, com destaque para as regiões Sul e Sudeste. O estado com o maior número de óbitos por Influenza foi São Paulo, totalizando 37,1% (65/175) do país. Após a SE 22 (31/05 a 06/06), houve aumento da circulação dos vírus da Influenza B e Influenza A (H1N1)pdm09 ¹⁰⁸. Nos últimos meses deste ano observou-se um aumento na circulação da linhagem Victoria dos vírus da Influenza B circulantes nas regiões de abrangência do IAL, os quais passaram a co-circular com a linhagem predominante, Yamagata ¹⁰².

7. Conclusão

Diante da diversidade genética dos vírus da Influenza e de sua evolução temporal, cujo presente estudo pôde demonstrar, o monitoramento constante faz-se necessário para detecção de novas estirpes virais, para atualização da vacina anual e para detecção de marcadores de virulência e transmissibilidade viral.

Em um período de 3 anos (2013 a 2015) a variabilidade genética da hemaglutinina foi observada para os dois subtipos de Influenza A e para as duas linhagens de Influenza B.

Os vírus da Influenza A(H1N1)pdm09 permaneceram similares ao vírus da vacina (A/California/7/2009), quando caracterizados antigenicamente com antissoro de furão, porém, desde 2013, já continham mutações responsáveis por *drift* antigênico e incluíam-se no grupo genético 6B. A mutação D222G, associada a maior severidade da doença e óbito foi observada 2 vezes em 2013, no estado de São Paulo. Foi o subtipo predominante mundialmente em 2013.

Diversos subgrupos genéticos do grupo 3C dos vírus da Influenza A(H3N2) circularam desde 2013, com substituições de aminoácidos em sítios antigênicos e conseqüente alterações de estirpe vacinal. O hemisfério sul teve uma estirpe de vacina para Influenza A(H3N2) diferente para cada ano. Houve predomínio deste subtipo nos anos de 2014 e 2015 nos dois hemisférios.

A composição da vacina para Influenza B também foi diferente para cada um dos 3 anos, porém com a mesma linhagem, Yamagata. A co-circulação das linhagens Victoria e Yamagata ocorreu em 2014 e 2015 e em 2013 houve divergência entre a linhagem dos vírus circulantes e a linhagem da vacina. Substituições de aminoácidos em sítios antigênicos correspondentes ao grupo genético 3 da linhagem Yamagata, resultou em alteração na estirpe da vacina para o ano de 2015, embora os vírus da Influenza B circulantes em 2014 já pertencessem a este grupo,

antigenicamente diferente do grupo genético da vacina B/Massachusetts/02/2012 (grupo 2).

Dessa forma, compreender o processo evolutivo dos vírus da Influenza A e B por meio da caracterização genética e da análise filogenética da hemaglutinina demonstra-se necessário, pois agrega informações importantes à vigilância destes vírus, à prevenção da doença humana, às epidemias, às pandemias e à reformulação anual das vacinas.

8. Referências bibliográficas

1. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Media Centre. [acesso em 04 jan 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
2. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Vaccines [acesso em 31 jul 2016]. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/vaccines/en/>
3. Zambon M. Influenza and other emerging respiratory viruses. *Medicine*. 2014; 42(1):45 – 51.
4. Toniolo Neto J. A História da Gripe – A influenza em todos os tempos e agora. São Paulo: Dezembro Editorial; 2001.
5. Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ. *Textbook of Influenza*. Oxford: Blackwell Science; 1998.
6. Bertolli Filho C. A gripe espanhola em São Paulo; 1918: epidemia e sociedade. São Paulo: Paz e Terra; 2003.
7. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. *Lancet*. 1933; 222(5732): 66-68.
8. Francis T Jr. A new type of virus from epidemic influenza. *Science*. 1940; 92(2392): 405-408.
9. Taylor RM. A further note on 1233 influenza C virus. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1951; 4(4): 485-500.
10. Barberis I, Myles P, Ault SK, Bragazzi NL, Martini M. History and evolution of influenza control through vaccination: from the first monovalent vaccine to universal vaccines. *J Prev Med Hyg*. 2016; 57(3): E115-E120.
11. Hannoun C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2013; 12(9): 1085-94.

12. Payne AM. The influenza programme of WHO. Bull World Health Organ. 1953; 8(5-6): 755-792.
13. Garten RJ, Davis CT, Russel AC, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of the early isolates of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science. 2009; 325(5937): 197-201.
14. Rota PA, Wallis T, Harmon M, Rota J, Kendal A, Nerone K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. Virology. 1990; 175(1): 59 – 68.
15. Rota PA, Hemphill ML, Whistler T, Regnery HL, Kendal AP. Antigenic and genetic characterization of the haemagglutinin of recent co circulating strains of influenza B virus. J. Gen Virol. 1992; 73(Pt 10): 2737 – 42.
16. Kanegae Y, Sugita S, Endo A, Ishida M, Senya S, Osako K, et al. Evolutionary Pattern of the Hemagglutinin Gene of Influenza B Viruses Isolated in Japan: Cocirculating Lineages in the Same Epidemic Season. J Virol. 1990; 64(6): 2860-5.
17. Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. Nature. 2009; 459(7250): 1122-5.
18. CDC [homepage na internet]. Influenza (Flu) – Types of Influenza Viruses [acesso em 06 mar 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
19. ICTV [homepage na internet]. New Species [acesso em 13 ago 2018]. Disponível em: <http://talk.ictvonline.org/ICTV/proposal/2014.009a-dM.A.v2.InfluenzavirusD.pdf>
20. ScienceDaily [homepage na internet]. New virus gets official name, influenza D [acesso em 03 mar 2017]. Disponível em: www.sciencedaily.com/releases/2016/09/160901140433.htm

21. Swine Health Information Center [homepage na internet]. Influenza C and D viruses [acesso em 06 mar 2017]. Disponível em: .
<http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-influenza-cd>
22. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. (2013) New world bats harbor diverse influenza A viruses. *Plos Pathog.* 2013; 9(10): e1003657.
23. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4(1): 3.
24. Kuchipudi SV, Nissly RH. Novel Flu Viruses in Bats and Cattle: “Pushing the Envelope” of Influenza Infection. *Vet Sci.* 2018; 5(3).pii: E71.
25. CDC [homepage na internet]. Influenza Type A Viruses [acesso em 08 mar 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm>
26. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ.* 1980;58 (4):585-91.
27. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol Rev.* 1992; 56(1):152-79.
28. Schrauwen EJ, Graaf M, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(4):479-90.
29. Derek J. Smith et al. Mapping the Antigenic and Genetic Evolution of Influenza Virus. *Science* 2004; 305 (5682):371-76.
30. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008; 26(Suppl 4):D49–D53.

31. Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012; 88(6): 226-249.
32. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's *Medical Microbiology*. 26 ed. New York: McGraw-Hill; 2012.
33. Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. *Introdução à Virologia Humana*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
34. Influenza Report 2006 [acesso em 06 set 2016]. Disponível em: <http://www.influenzareport.com/influenzareport.pdf>
35. Nicholls JM, Chan RW, Russell RJ, Air GM, Peiris JS. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol.* 2008;16(4):149-57.
36. Gambotto A, Barratt-Boyes SM, de Jong MD, Neumann G, Kawaoka Y. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet.* 2008; 371(9622):1464-75.
37. Breitling J, Aebi M. N-Linked Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(8): a013359.
38. Kim P, Jang YH, Kwon SB, Lee CM, Han G, Seong BL. Glycosylation of Hemagglutinin and Neuraminidase of Influenza A Virus as Signature for Ecological Spillover and Adaptation among Influenza Reservoirs. *Viruses* 2018; 10(4).pii: E183.
39. Kim JI, Park MS. N-Linked Glycosylation in the Hemagglutinin of Influenza A Viruses. *Yonsei Med J.* 2012; 53(5): 886-893.
40. Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 365–394.

41. Wilson IA, Cox N. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 737–771.
42. Lubeck MD, Gerhard, W. Topological Mapping of Antigenic Sites on the Influenza A/PR/8/34 Virus Hemagglutinin Using Monoclonal Antibodies. *Virology* 1981; 113(1): 64-72.
43. Korsun N, Angelova S, Gregory V, Daniels R, Georgieva I, McCauley J. Antigenic and genetic characterization of influenza viruses circulating in Bulgaria during the 2015/2016 season. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 49: 241-250.
44. Wang Q, Cheng F, Lu M, Tian X, Ma J. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J Virol*. 2008; 82(6): 3011-20.
45. Santos Filho OA, Alencastro RB. Modelagem de proteínas por homologia. *Quim Nova*. 2002; 26(2): 253-259.
46. Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *The Lancet*. 1999; 354: 1277-82.
47. Savy V, Ciapponi A, Bardach A, Glujovsky D, Aruj P, Mazzoni A, et al. Burden of influenza in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013; 7(6):1017 – 32.
48. de Barros ENC, Cintra O, Rossetto R. Patterns of influenza B circulation in Brazil and its relevance to seasonal vaccine composition. *Braz J Infect Dis*. 2016; 20(1):81-90.
49. Cox NJ, Bender CA. The molecular epidemiology of influenza viruses. *Seminars in virology*. 1995; 6(6): 359 - 370.
50. Arlant LHF, Bricks LF. Influenza B burden in Latin America and potential benefits of the new quadrivalent vaccines. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2016; 5(1): 1-2.
51. Paiva TM, Benega MA, Silva DB, Santos KC, Cruz AS, Hortenci MF, Barbieri MT, Monteiro MM, Barbosa HA, Carvalhanas TR. Evolutionary

pattern of reemerging influenza B/Victoria lineage viruses in São Paulo, Brazil, 1996-2012: Implications for vaccine composition strategy. *J Med Virol.* 2013; 85(11):1983-9.

52. Reed C, Meltzer MI, Finelli L, Fiore A. Public Health impact of including two lineages of influenza B in a quadrivalent seasonal influenza vaccine. *Vaccine.* 2012; 30: 1993 – 8.

53. Langat P, Raghwani J, Dudas G, Bowden TA, Edwards S, Gall A, et al. Genome-wide evolutionary dynamics of influenza B viruses on a global scale. *Plos Pathog.* 2017; 13(12): e1006749.

54. Informe Técnico: 19o Campanha de Vacinação contra a Influenza [acesso em 17 abr 2017]. Disponível em: http://pni.datasus.gov.br/sipni/03%2003%202017%20Informe_Cp_Influenza%20_%20final.pdf

55. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) [acesso em 30 jul 2018]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en

56. Guia para a rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil [acesso em 27 jul 2018]. Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_laboratorial_influenza_vigilancia_influenza_brasil.pdf

57. Plano de Preparação para a pandemia de influenza do estado de São Paulo – Diretrizes Gerais [acesso em 27 jul 2018]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/publicacoes-ccd/manuais-normas-e-documentos-tecnicos/manuaisnormaseddocumentostecnicos5_-_plano_de_preparacao_pandemia-2005.pdf

58. Protocolo de tratamento de influenza do Ministério da Saúde 2017 [acesso em 26 jul 2018]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/19/protocolo-influenza-2017.pdf>

59. Bricks LF, Domingues CMAS, Carvalhanas TRMP, Pereira SF, Moraes JC. Influenza em crianças: o que há de novo? *J. Health Biol Sci.* 2014;2(3):125-34.
60. Lennette EH, Schmidt NJ. Diagnostic procedures for viral and Rickettsial diseases. 4 ed. New York: APHA; 1969.
61. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Microbiologia Médica.* 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1974.
62. Dimmock NJ, Easton AJ, Leppard KN. *Introduction to Modern Virology.* 7 ed. Coventry: Wiley Blackwell; 2016.
63. Falchi A, Amoros JP, Arena C, Arrighi J, Casabianca F, Andreoletti L, et al. Genetic Structure of human A/H1N1 and A/H3N2 influenza virus on Corsica Island: phylogenetic analysis and vaccine strain match, 2006 – 2010. *PLoS One.* 2011; 6(9): e24471.
64. Tewawong N, Prachayangprecha S, Vichiwattana P, Korkong S, Klinfueng S, Vongpunsawad S, et al. Assessing antigenic drift of seasonal influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 viruses. *PLoS One.* 2015; 10(10):e0139958.
65. Pan D, Xue W, Wang X, Guo J, Liu H, Yao X. Molecular mechanism of the enhanced virulence of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus from D222G mutation in the hemagglutinin: a molecular study. *J Mol Model.* 2012; 18(9): 4355-66.
66. Ferreira JL, Borborema SE, Brígido LF, Oliveira MI, Paiva TM, Santos CL. Sequence analysis of the 2009 pandemic influenza A H1N1 virus haemagglutinin gene from 2009-2010 Brazilian clinical samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(5): 613-6.
67. Influenza Virus Genome Sequencing and Genetic Characterization [acesso em 14 jun 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/laboratory/genetic-characterization.htm>

68. GenBank [homepage na internet]. GenBank Overview [acesso em 05 ago 2018]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
69. GISAID [homepage na internet]. Enabling Rapid and Open Access to Influenza Virus Data [acesso em 05 ago 2018]. Disponível em: <http://www.gisaid.org/about-us/mission/>
70. Lam TT, Hon CC, Tang JW. Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2010; 47(1): 5-49.
71. Agor JK, Ozaltin OY. Models for predicting the evolution of influenza to inform vaccine strain selection. *Hum Vaccin Immunother.* 2018; 14(3): 678-683.
72. International Code of Phylogenetic Nomenclature [acesso em 17 jul 2018]. Disponível em: <http://www.ohio.edu/phylocode/PhyloCode4c.pdf>
73. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Influenza vaccine viruses and reagentes [acesso em 18 jul 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/en>
74. Russel CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, et al. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine.* 2008; 26 Suppl 4: D31-4.
75. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Influenza position paper [acesso em 18 jul 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2012/wer8747.pdf>
76. Houser K, Subbarao K. Influenza Vaccines: Challenges and Solutions. *Cell Host Microbe.* 2015; 17(3): 295-300.
77. Subbarao K, Matsuoka Y. The prospect and challenges of universal vaccines for influenza. *Trends Microbiol.* 2013; 21(7): 350-8.

78. Lee YT, Kim KH, Ko EJ, Lee YN, Kim YM, Cho MK, et al. New vaccines against influenza vírus. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014; 3(1): 12-28.
79. Costa LMC, Merchan-Hamann E. Pandemias de influenza e a estrutura sanitária brasileira: breve histórico e caracterização dos cenários. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2016; 7(1): 11-25.
80. Kisiellius J, Ueda M. Celebridade mal conhecida. *Rev Pesquisa FAPESP [homepage na internet]* . 2009 [acesso em 30 jul 2018]; 160 ed: 56-57.
81. Real-time PCR handbook [acesso em 10/10/2018]. Disponível em: find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf
82. CDC Laboratory Support for Influenza Surveillance (CLSIS) SharePoint Site [acesso em 11/10/2018]. Disponível em: www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/CDC_Laboratory_Support_for_Influenza_Surveillance_Info_Sheet_Aug2017.pdf
83. Barros FR, Daufenbach LZ, Vicente MG, Soares MS, Siqueira M, Carmo EH. O desafio da influenza: Epidemiologia e Organização da Vigilância no Brasil. *Boletim Eletrônico Epidemiológico – Ano 04 – nº 01 -02/ 02/02/2004.* www.saude.gov.br/svs.
84. WHO surveillance case definitions for ILI and SARI. http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/ili_sari_surveillance_case_definitions/en (January 2014).
85. Protocolo laboratorial para a coleta de amostras biológicas para a investigação dos vírus respiratórios. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/pdf/IAL14_PROTOCOLO_LAB_VIRUS_RESP.pdf (revisado em 10 de junho de 2014).
86. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. CDC protocolo of real time RTPCR for influenza A(H1N1) [acesso em 09 out 2018]. Disponível em:

http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf.

87. Fusakawa LO, Silva DB, Santos FCP, Oba IT, Caterino de Araujo A, Gisele MG, et al. Implantação e otimização da PCR em tempo real para o diagnóstico da influenza A (H1N1) pandêmica no Instituto Adolfo Lutz e perspectivas para 2010. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2010; 69(1): 131-135.

88. Shu B, Kai-Hui Wu KH, Emery S, Villanueva J, Johnson R, Guthrie E, Berman L, Warnes C, Barnes N, Klimov A, Lindstrom S. Design and performance of the CDC swine flu for detection of 2009 A (H1N1). *J Clin Microbiol*. 2011; 49(7): 2614–2619.

89. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Sequencing primers and protocol [acesso em 09 out 2018]. Disponível em: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/GenomePrimers_20090512.pdf

90. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011; 28(10): 2731-9.

91. Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; 4(4): 406-25.

92. Choo KH, Tan TW, Ranganathan S. A comprehensive assessment of N-terminal signal peptides prediction methods. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10(Suppl 15): S2.

93. Burke DF, Smith DJ. A Recommended Numbering Scheme for Influenza A HA Subtypes. *PLoS One*. 2014; 9(11): e112302.

94. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Influenza Vaccine in Tropics and Subtropics [acesso em 09 out 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/vaccines/tropics/en/>
95. Petrie JG, Gordon A. Epidemiological Studies to Support the Development of Next Generation Influenza Vaccines. *Vaccines*. 2018; 6(2).pii: E17.
96. Yasuhara A, Yamayoshi S, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, et al. Diversity of antigenic mutants of influenza A(H1N1)pdm09 virus escaped from human monoclonal antibodies. *Scientific Reports*. 2017; 7: 1-9.
97. Tharakaraman K, Sasisekharan R. Influenza surveillance: 2014-2015 H1N1 “swine”-derived influenza viruses from India. *Cell Host Microbe*. 2015; 17(3): 279-282.
98. Linderman SL, Chambers BS, Zost SJ, Parkhouse K, Li Y, Herrmann C, et al. Potential antigenic explanation for atypical H1N1 infections among middle-aged adults during the 2013-2014 influenza season. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(44): 15798-803.
99. Flannery B, Zimmerman RK, Gubareva LV, Garten RJ, Chung JR, Nowalk MP. Enhanced genetic characterization of influenza A(H3N2) viruses and vaccine effectiveness by genetic group, 2014-2015. *J Infect Dis*. 2016; 214(7): 1010-1019.
100. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde [homepage na internet]. Boletim Epidemiológico – Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2013 [acesso em 05 jul 2018]. Disponível em: <portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/22/boletim-influenza-se52de2013-22052014.pdf>
101. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Influenza [acesso em 05 jul 2018]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/summaryreport_20131209/en/

102. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Influenza - FluNet [acesso em 31 jul 2018]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/en/
103. Xie H, Wan XF, Ye Z, Plant EP, Zhao Y, Xu Y, et al. H3N2 Mismatch of 2014–15 Northern Hemisphere Influenza Vaccines and Head-to-head Comparison between Human and Ferret Antisera derived Antigenic Maps. *Sci Rep.* 2015; 5: 15279.
104. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Influenza [acesso em 05 jul 2018]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2014_12_23_update_GIP_surveillance/en/
105. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde [homepage na internet]. Boletim Epidemiológico – Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2014 [acesso em 06 jul 2018]. Disponível em: portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/23/Boletim-Epidemiologico-Influenza-SE52-2014.pdf
106. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Influenza [acesso em 05 jul 2018]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2015_12_28_update_GIP_surveillance/en/
107. World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Influenza [acesso em 06 jul 2018]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201409_recommendation.pdf?ua=1
108. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde [homepage na internet]. Boletim Epidemiológico – Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2015 [acesso em 10 jul 2018]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/04/Boletim-Epidemiologico-Influenza-SE52-2015-completo.pdf>

Anexos

Anexo 1. Números de acesso das sequências genéticas da HA dos vírus da Influenza, submetidas aos bancos de dados pelo IAL e incluídas nas árvores filogenéticas, ano de 2013.

Tipo de Influenza	Identificação da amostra	Nº de acesso	Banco de dados
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/15835/2013</i>	KF142475	GenBank
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/3-13108/2013</i>	KF151218	GenBank
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/28683/2013</i>	KF151219	GenBank
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/29229/2013</i>	KF151220	GenBank
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/12-7118/2013</i>	KF151221	GenBank
A (H1N1)pdm09	<i>A/São Paulo/55023/2013</i>	EPI475776	GISAID
A (H1N1)pdm09	<i>A/São Paulo/60067/2013</i>	EPI476714	GISAID
A (H1N1)pdm09	<i>A/São Paulo/3-25376/2013</i>	EPI484738	GISAID
A (H1N1)pdm09	<i>A/São Paulo/2-16961/2013</i>	EPI484740	GISAID
A (H1N1)pdm09	<i>A/São Paulo/28500/2013</i>	EPI484744	GISAID
A (H1N1)pdm09	<i>A/São Paulo/5-25179/2013</i>	EPI484745	GISAID
A (H1N1)pdm09	<i>A/Distrito Federal/78502/2013</i>	EPI484747	GISAID
A (H1N1)pdm09	<i>A/São Paulo/6-30177/2013</i>	EPI484748	GISAID
A (H1N1)pdm09	<i>A/São Paulo/6-30359/2013</i>	EPI484749	GISAID
A (H1N1)pdm09	<i>A/Mato Grosso/73766/2013</i>	EPI484750	GISAID
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/11079/2013</i>	AGO02698	GenBank
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/53699/2013</i>	EPI476983	GISAID
A (H3N2)	<i>A/Rondonia/50872/2013</i>	EPI476986	GISAID
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/13-13137/2013</i>	EPI476947	GISAID
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/53873/2013</i>	EPI476971	GISAID
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/61715/2013</i>	EPI476984	GISAID
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/11-29688/2013</i>	EPI500269	GISAID
B	<i>B/Mato Grosso/31935/2013</i>	EPI476989	GISAID

B	B/São Paulo/2-22035/2013	EPI476991	GISAID
B	B/São Paulo/4-21674/2013	EPI476992	GISAID
B	B/São Paulo/27818/2013	EPI476993	GISAID
B	B/Mato Grosso/64153/2013	EPI477000	GISAID
B	B/Mato Grosso/64122/2013	EPI477001	GISAID
B	B/Distrito Federal/67407/2013	EPI477052	GISAID
B	B/São Paulo/72101/2013	EPI477053	GISAID

Anexo 2. Números de acesso das sequências genéticas da HA dos vírus da Influenza, submetidas aos bancos de dados pelo IAL e incluídas nas árvores filogenéticas, ano de 2014.

Tipo de Influenza	Identificação da amostra	Nº de acesso
A (H1N1)pdm09	A/São Paulo/888/2014	EPI508728
A (H1N1)pdm09	A/Distrito Federal/2648/2014	EPI508729
A (H1N1)pdm09	A/Tocantins/6241/2014	EPI508730
A (H1N1)pdm09	A/Distrito Federal/10376/2014	EPI510620
A (H1N1)pdm09	A/Distrito Federal/12526/2014	EPI510936
A (H1N1)pdm09	A/Goias/16071/2014	EPI516476
A (H1N1)pdm09	A/Distrito Federal/16114/2014	EPI516478
A (H1N1)pdm09	A/Distrito Federal/16117/2014	EPI516479
A (H1N1)pdm09	A/Tocantins/19048/2014	EPI516480
A (H1N1)pdm09	A/Mato Grosso/19061/2014	EPI516481
A (H1N1)pdm09	A/Distrito Federal/19128/2014	EPI516485
A (H1N1)pdm09	A/Mato Grosso/21780/2014	EPI516486
A (H1N1)pdm09	A/Distrito Federal/24956/2014	EPI531127
A (H1N1)pdm09	A/Goias/42063/2014	EPI531128
A (H1N1)pdm09	A/São Paulo/45706/2014	EPI532803

A (H1N1)pdm09	<i>A/Mato Grosso/48256/2014</i>	<i>EPI532804</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Piaui/48262/2014</i>	<i>EPI532805</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Goias/51172/2014</i>	<i>EPI532849</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Distrito Federal/50604/2014</i>	<i>EPI532884</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Goias/52980/2014</i>	<i>EPI533625</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Distrito Federal/52935/2014</i>	<i>EPI533628</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/13-10705/2014</i>	<i>EPI539394</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/São Paulo/13-13027/2014</i>	<i>EPI551155</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/81635/2014</i>	<i>EPI551165</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Goias/82128/2014</i>	<i>EPI551169</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Mato Grosso do Sul/90356/2014</i>	<i>EPI551171</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/5129/2014</i>	<i>EPI508868</i>
A (H3N2)	<i>A/Goias/3910/2014</i>	<i>EPI508870</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/10767/2014</i>	<i>EPI510941</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/10774/2014</i>	<i>EPI510944</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/11199/2014</i>	<i>EPI510946</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/11194/2014</i>	<i>EPI510968</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/10898/2014</i>	<i>EPI510973</i>
A (H3N2)	<i>A/Goias/16069/2014</i>	<i>EPI516491</i>
A (H3N2)	<i>A/Goias/16075/2014</i>	<i>EPI516492</i>
A (H3N2)	<i>A/Distrito Federal/21817/2014</i>	<i>EPI516562</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/23630/2014</i>	<i>EPI531129</i>
A (H3N2)	<i>A/Mato Grosso do Sul/41977/2014</i>	<i>EPI531131</i>
A (H3N2)	<i>A/Goias/42035/2014</i>	<i>EPI531132</i>
A (H3N2)	<i>A/Goias/42119/2014</i>	<i>EPI531133</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/23803/2014</i>	<i>EPI531178</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/24361/2014</i>	<i>EPI531179</i>

A (H3N2)	<i>A/São Paulo/34233/2014</i>	<i>EPI531182</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/44383/2014</i>	<i>EPI532886</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/11-10263/2014</i>	<i>EPI532887</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/12-8700/2014</i>	<i>EPI532888</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/48734/2014</i>	<i>EPI532889</i>
A (H3N2)	<i>A/Goiias/51166/2014</i>	<i>EPI532890</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/3-24386/2014</i>	<i>EPI532893</i>
A (H3N2)	<i>A/Mato Grosso do Sul/48293/2014</i>	<i>EPI532894</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/3-26596/2014</i>	<i>EPI533630</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/52831/2014</i>	<i>EPI533671</i>
A (H3N2)	<i>A/Goiias/53024/2014</i>	<i>EPI533675</i>
A (H3N2)	<i>A/São Paulo/35816/2014</i>	<i>EPI536200</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/44541/2014</i>	<i>EPI536201</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/53072/2014</i>	<i>EPI536203</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/53998/2014</i>	<i>EPI536205</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/3-26852/2014</i>	<i>EPI536206</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/5-1113/2014</i>	<i>EPI536207</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/11-13826/2014</i>	<i>EPI537486</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/6-10465/2014</i>	<i>EPI537488</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/54146/2014</i>	<i>EPI537492</i>
A (H3N2)	<i>A/Goiias/57978/2014</i>	<i>EPI537540</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/6-10266/2014</i>	<i>EPI537541</i>
A (H3N2)	<i>A/Goiias/57975/2014</i>	<i>EPI537493</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/54274/2014</i>	<i>EPI537876</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/56468/2014</i>	<i>EPI537877</i>
A (H3N2)	<i>A/Mato Grosso do Sul/66636/2014</i>	<i>EPI537990</i>
A (H3N2)	<i>A/Sao Paulo/6-11670/2014</i>	<i>EPI537994</i>

A (H3N2)	A/Sao Paulo/12-11047/2014	EPI537997
A (H3N2)	A/Sao Paulo/7-6468/2014	EPI537998
A (H3N2)	A/Sao Paulo/3-24357/2014	EPI537993
A (H3N2)	A/Sao Paulo/6-11780/2014	EPI539400
A (H3N2)	A/Sao Paulo/3-29553/2014	EPI539401
A (H3N2)	A/Sao Paulo/13-10842/2014	EPI539402
A (H3N2)	A/Sao Paulo/60623/2014	EPI539404
A (H3N2)	A/Sao Paulo/3-24388/2014	EPI539406
A (H3N2)	A/Mato Grosso do Sul/69756/2014	EPI539407
A (H3N2)	A/Mato Grosso do Sul/69755/2014	EPI539408
A (H3N2)	A/Distrito Federal/75551/2014	EPI541980
A (H3N2)	A/Sao Paulo/81060/2014	EPI545188
A (H3N2)	A/Sao Paulo/12-154545/2014	EPI551172
A (H3N2)	A/Sao Paulo/12-15655/2014	EPI551173
A (H3N2)	A/Goias/67636/2014	EPI551175
A (H3N2)	A/Goias/82117/2014	EPI551176
A (H3N2)	A/Sao Paulo/2-25786/2014	EPI554591
A (H3N2)	A/Sao Paulo/95739/2014	EPI554592
B	B/Goias/7141/2014	EPI508874
B	B/Rondonia/12920/2014	EPI510572
B	B/Mato Grosso/35132/2014	EPI531134
B	B/Mato Grosso/35137/2014	EPI531135
B	B/Sao Paulo/49235/2014	EPI532895
B	B/Goias/42189/2014	EPI532896
B	B/Sao Paulo/6-9739/2014	EPI536209
B	B/Sao Paulo/61679/2014	EPI537815
B	B/Sao Paulo/62265/2014	EPI537819

B	B/Sao Paulo/47044/2014	EPI538002
B	B/Sao Paulo/71073/2014	EPI541077
B	B/Sao Paulo/71075/2014	EPI541078
B	B/Sao Paulo/69693/2014	EPI541120
B	B/São Paulo/6-13865/2014	EPI541984
B	B/Goiás/85153/2014	EPI545189
B	B/Sao Paulo/10-35605/2014	EPI545192
B	B/Sao Paulo/3-36332/2014	EPI551908
B	B/Sao Paulo/6-15904/2014	EPI552060
B	B/Distrito Federal/89679/2014	EPI552061
B	B/Sao Paulo/84600/2014	EPI552063
B	B/Sao Paulo/82392/2014	EPI552065
B	B/Sao Paulo/81064/2014	EPI552070
B	B/Sao Paulo/80574/2014	EPI552071
B	B/Sao Paulo/96303/2014	EPI554593
B	B/Sao Paulo/94180/2014	EPI554594
B	B/Sao Paulo/6-16593/2014	EPI554595
B	B/Sao Paulo/97623/2014	EPI554596

Anexo 3. Números de acesso das sequências genéticas da HA dos vírus da Influenza, submetidas aos bancos de dados pelo IAL e incluídas nas árvores filogenéticas, ano de 2015.

Tipo de Influenza	Identificação da amostra	Nº de acesso
A (H1N1)pdm09	A/Sao Paulo/12-2085/2015	EPI579953
A (H1N1)pdm09	A/Sao Paulo/22462/2015	EPI585071
A (H1N1)pdm09	A/Sao Paulo/31474/2015	EPI585072
A (H1N1)pdm09	A/Sao Paulo/3453/2015	EPI628000

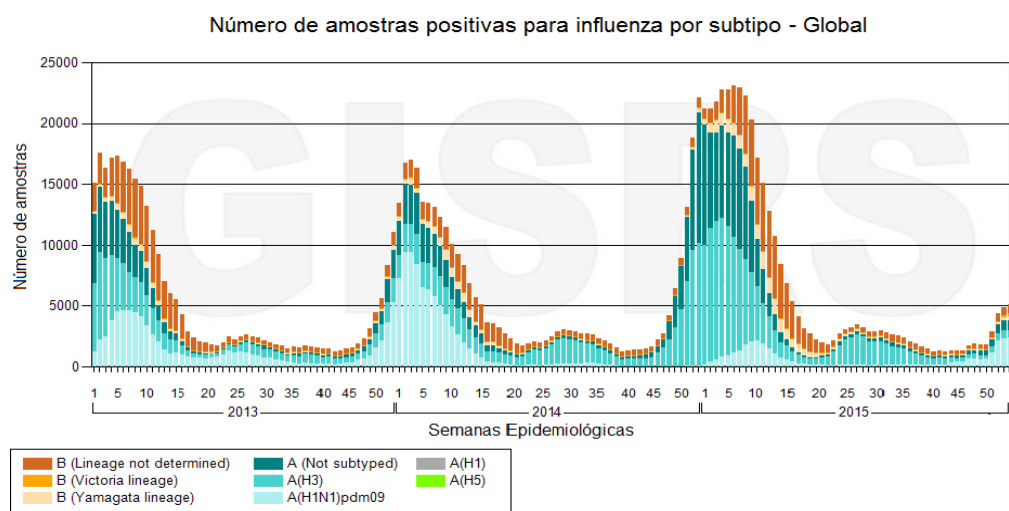
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/88376/2015</i>	<i>EPI687387</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/9-10830/2015</i>	<i>EPI704003</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/126/2015</i>	<i>EPI704025</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/69221/2015</i>	<i>EPI712971</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/72880/2015</i>	<i>EPI712972</i>
A (H1N1)pdm09	<i>A/Sao Paulo/9-10746/2015</i>	<i>EPI713786</i>
A(H3N2)	<i>A/Tocantins/4622/2015</i>	<i>EPI573567</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/2-1030/2015</i>	<i>EPI573568</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/9-1220/2015</i>	<i>EPI573605</i>
A(H3N2)	<i>A/Rondonia/5266/2015</i>	<i>EPI573606</i>
A(H3N2)	<i>A/Goiias/6394/2015</i>	<i>EPI573607</i>
A(H3N2)	<i>A/Rondonia/9097/2015</i>	<i>EPI573608</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/9-1757/2015</i>	<i>EPI573609</i>
A(H3N2)	<i>A/Tocantins/16261/2015</i>	<i>EPI579956</i>
A(H3N2)	<i>A//Sao Paulo/6-6304/2015</i>	<i>EPI579959</i>
A(H3N2)	<i>A/Tocantins/18288/2015</i>	<i>EPI579960</i>
A(H3N2)	<i>A/Rondonia/18925/2015</i>	<i>EPI579961</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/19850/2015</i>	<i>EPI579964</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/20448/2015</i>	<i>EPI579997</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/20768/2015</i>	<i>EPI580027</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/21685/2015</i>	<i>EPI580028</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/21804/2015</i>	<i>EPI580029</i>
A(H3N2)	<i>A/Tocantins/24996/2015</i>	<i>EPI585073</i>
A(H3N2)	<i>A/Mato Grosso do Sul/29492/2015</i>	<i>EPI585074</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/24295/2015</i>	<i>EPI585075</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/28596/2015</i>	<i>EPI585076</i>
A(H3N2)	<i>A/Tocantins/29517/2015</i>	<i>EPI585077</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/29139/2015</i>	<i>EPI585078</i>
A(H3N2)	<i>A/Sao Paulo/3-18529/2015</i>	<i>EPI586264</i>

A(H3N2)	A/Sao Paulo/28438/2015	EPI586265
A(H3N2)	A/Goias/32286/2015	EPI586266
A(H3N2)	A/Tocantins/37342/2015	EPI590424
A(H3N2)	A/Sao Paulo/35339/2015	EPI590426
A(H3N2)	A/Sao Paulo/3-22794/2015	EPI590428
A(H3N2)	A/Mato Grosso/44112/2015	EPI610988
A(H3N2)	A/Sao Paulo/48012/2015	EPI610989
A(H3N2)	A/Sao Paulo/3-29379/2015	EPI610990
A(H3N2)	A/Sao Paulo/49056/2015	EPI610991
A(H3N2)	A/Sao Paulo/3-29607/2015	EPI610992
A(H3N2)	A/Goias/49684/2015	EPI611177
A(H3N2)	A/Goias/49695/2015	EPI611178
A(H3N2)	A/Distrito Federal/51671/2015	EPI611179
A(H3N2)	A/Mato Grosso do Sul/51672/2015	EPI611180
A(H3N2)	A/Mato Grosso do Sul/51673/2015	EPI611181
A(H3N2)	A/Tocantins/49746/2015	EPI621005
A(H3N2)	A/Sao Paulo/3-32002/2015	EPI621006
A(H3N2)	A/Sao Paulo/50168/2015	EPI621068
A(H3N2)	A/Sao Paulo/51790/2015	EPI621069
A(H3N2)	A/Sao Paulo/10-20095/2015	EPI621070
A(H3N2)	A/Sao Paulo/10-19619/2015	EPI621071
A(H3N2)	A/Sao Paulo/6-14388/2015	EPI621072
A(H3N2)	A/Sao Paulo/6-14390/2015	EPI621401
A(H3N2)	A/Sao Paulo/52081/2015	EPI621404
B	B/Sao Paulo/2513/2015	EPI562797
B	B/Tocantins/6285/2015	EPI573610
B	B/Sao Paulo/6730/2015	EPI573624
B	B/Sao Paulo/6600/2015	EPI573625
B	B/Goias/6393/2015	EPI573626

B	B/Rondonia/15893/2015	EPI573627
B	B/Tocantins/16260/2015	EPI578995
B	B/Goias/21789/2015	EPI578996
B	B/Tocantins/29515/2015	EPI586474
B	B/Sao Paulo/24988/2015	EPI586475
B	B/Distrito Federal/32366/2015	EPI586476
B	B/Goias/32283/2015	EPI586477

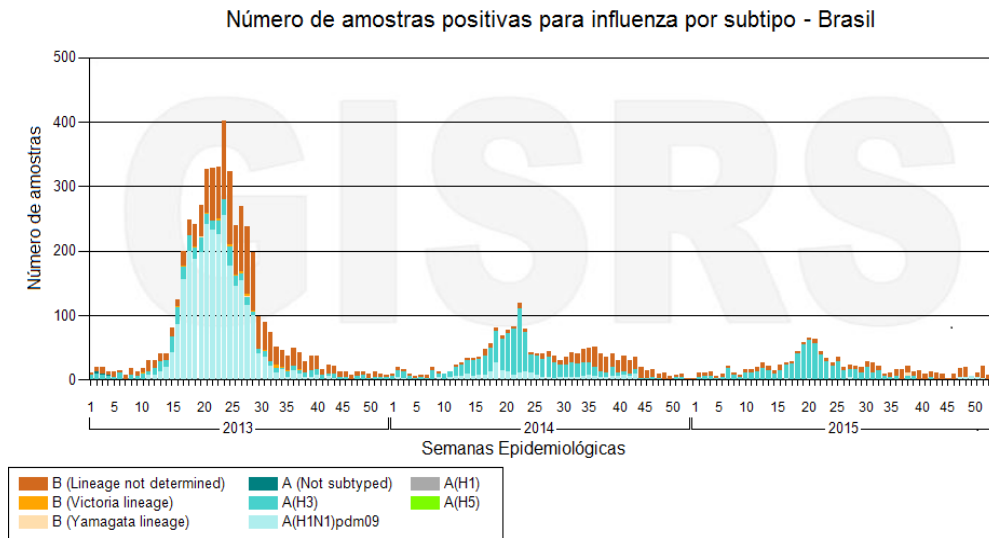
Anexo 4. Distribuição de casos positivos para Influenza, segundo subtipo e semana epidemiológica, global, no período de 2013 a 2015.

Fonte: FluNet/OMS ¹⁰²



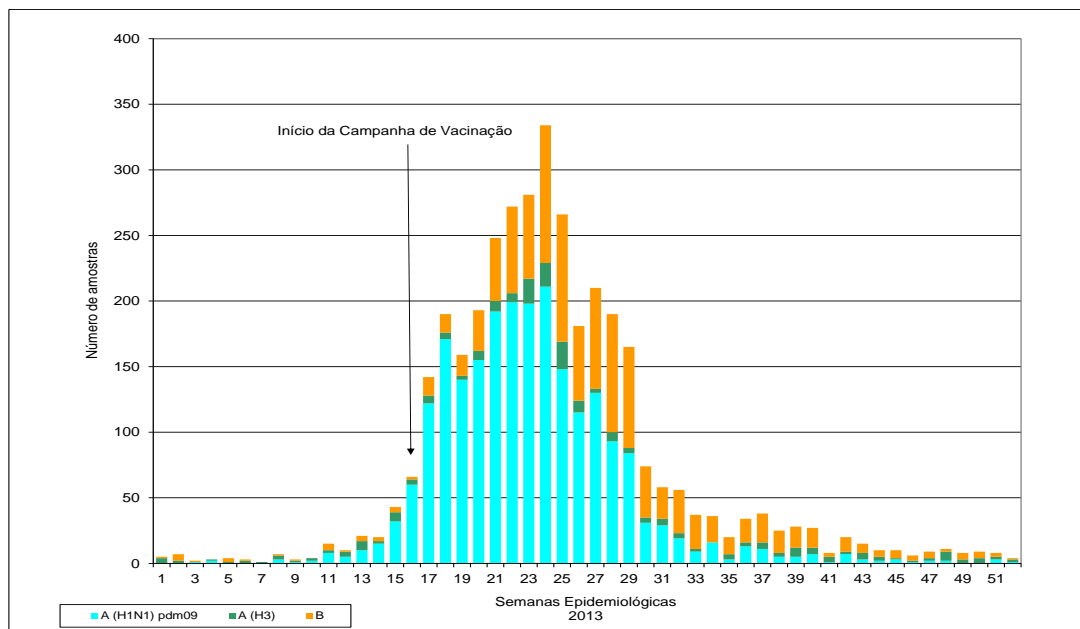
Anexo 5. Distribuição de casos positivos para Influenza, segundo subtipo e semana epidemiológica, no Brasil, no período de 2013 a 2015.

Fonte: FluNet/OMS ¹⁰²

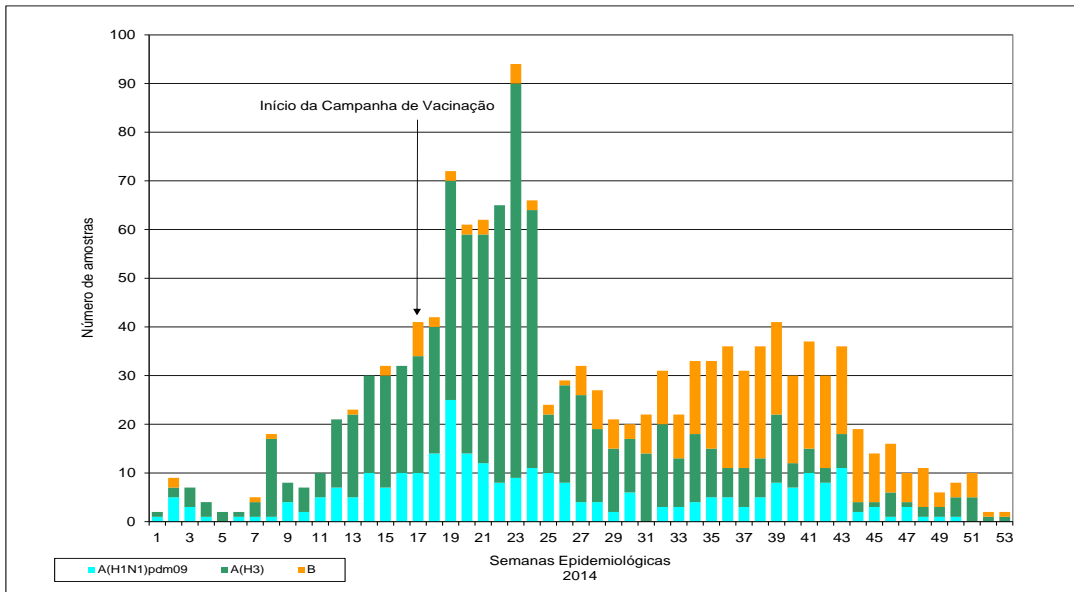


Anexo 6. Distribuição de casos positivos para Influenza, segundo subtipo e semana epidemiológica, das amostras identificadas no IAL, no ano de 2013.

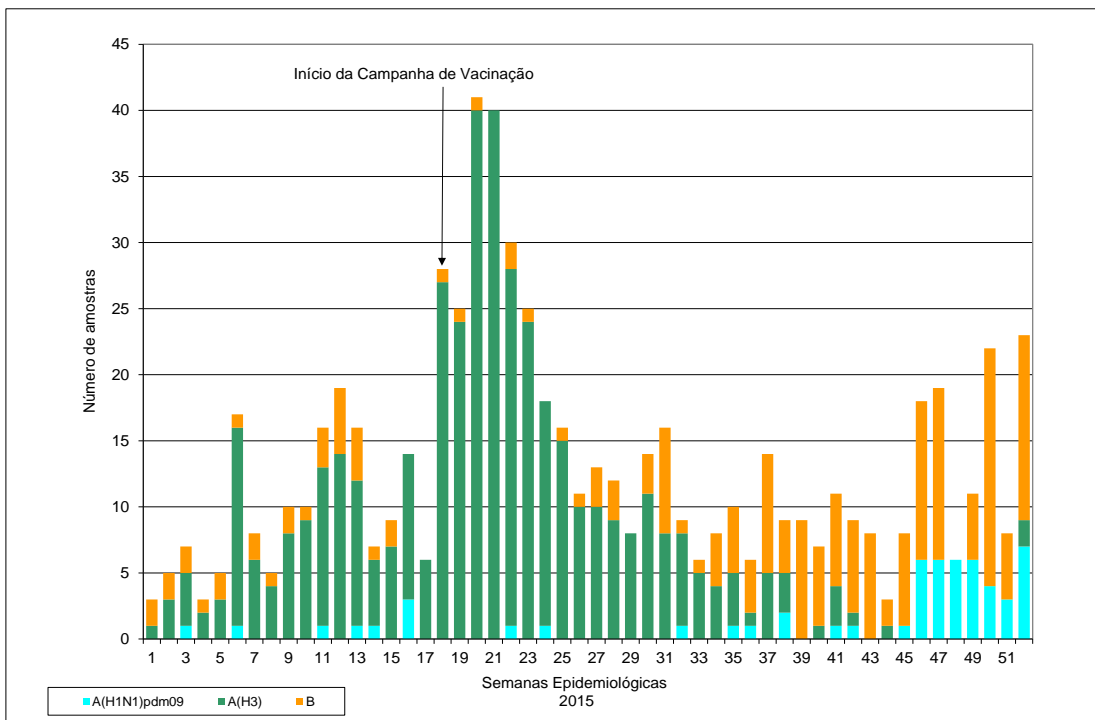
Fonte: FluNet/OMS ¹⁰²



Anexo 7. Distribuição de casos positivos para Influenza, segundo subtipo e semana epidemiológica, das amostras identificadas no IAL, no ano de 2014.
 Fonte: FluNet/OMS ¹⁰²



Anexo 8. Distribuição de casos positivos para Influenza, segundo subtipo e semana epidemiológica, das amostras identificadas no IAL, no ano de 2015.
 Fonte: FluNet/OMS ¹⁰²



Anexo 9. Parecer consubstanciado do CEP

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia molecular dos vírus da influenza tipos A e B, nas regiões de abrangência do Instituto Adolfo Lutz, no período de 2013 - 2015.

Pesquisador: Terezinha Maria de Paiva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63089116.4.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.051.157

Apresentação do Projeto:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 13/02/2017.

Objetivo da Pesquisa:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 13/02/2017.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

A pesquisadora continuou tendo um entendimento equivocado quanto aos riscos dos participantes da pesquisa, quando informa que o caráter confidencial das informações estaria assegurado pelo termo de confidencialidade assinado pelos membros da equipe de pesquisa. A par dessa colocação vale esclarecer que o risco aos participantes é mínimo pelo fato de ter seus dados utilizados na pesquisa, mesmo que não divulgados.

Quanto aos benefícios, idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 13/02/2017.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem ao parecer consubstanciado do CEPIAL de 13/02/2017.

Continuação do Parecer: 2.051.157

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme documentos apresentados pela pesquisadora o primeiro projeto teve início em 1995 isto é antes da Resolução 196/96 que trata da Ética na pesquisa com seres humanos. A CONEP em seu parecer 135/2002 coloca que a pesquisa foi aprovada pelo CEP do ICB-USP em 9 de agosto de 2001 sendo considerado "não haver necessidade do termo de consentimento dado que a pesquisa estar em andamento há muitos anos" e a pesquisadora utilizaria na época dados já coletados e que a mesma apresentaria riscos mínimos por utilizar dados secundários.

A pesquisadora informou que a partir de 2000 o Ministério da Saúde implantou uma Rede Nacional de Vigilância do Vírus da Influenza em todo o território Nacional e desde então todas as amostras são encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) para o sequenciamento genético. O Ministério da Saúde após identificar o paciente com Síndrome gripal cadastra no SIVEP-GRIPE os dados do paciente, após consentimento verbal e que o presente projeto utilizará amostras recebidas no período de 2013 a 2015 dos estados de abrangência do IAL com o objetivo de analisar o padrão genético do segmento genômico que codifica a hemaglutinina (HA) dos vírus da influenza do tipo A subtipos H1 e H3, e das linhagens do vírus da influenza do tipo B: Yamagata e Vitória. A análise molecular do segmento 4 (HA) do RNA viral é uma ferramenta aliada à vigilância das alterações genéticas, no domínio HA1, durante a sazonalidade do vírus, uma vez que permite revelar as mutações envolvidas nos sítios antigênicos que conferem proteção à infecção, com implicações na formulação de vacinas. As constantes mutações do vírus da influenza requer o acompanhamento contínuo de sua evolução e circulação com vistas à composição anual da vacina para o Hemisfério Sul.

As amostras estão retidas no Centro de Virologia do IAL.

A pesquisadora informou que serão utilizados dados secundários e esclareceu que a informação do óbito é formalizado no SIVEP-SRAG CID J11.

Foram apresentados conforme solicitado:

- Normas de biorrepositório ou equivalente.
- Autorização do Centro de Virologia para uso das amostras armazenadas.
- Ciência da Portaria DG/IAL 16/2010 sobre Normas de temporalidade das mostras biológicas e dos produtos armazenados no IAL.
- Anuência da equipe, cronograma e documentos complementares.

Recomendações: Nada a recomendar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pelo exposto, considera-se as pendências esclarecidas e o projeto aprovado sob o ponto de vista ético a luz da Resolução 466/12.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi analisado em reunião ordinária de 16 de março de 2017, com situação do parecer "Aprovado".

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
- b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_820915.pdf	13/03/2017 18:28:36		Aceito

Continuação do Parecer: 2.051.157

Outros	Portaria_DG_IAL_16_2010.pdf	13/03/2017 18:27:53	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
Outros	Carta_resposta_1918520.pdf	13/03/2017 17:47:29	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Projeto_1995_IAL_PMSV.pdf	08/03/2017 11:14:46	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Projeto_1995.pdf	08/03/2017 11:04:57	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Esclarecimento_TCLE.pdf	07/03/2017 19:00:15	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
Cronograma	Cronograma_2016.pdf	07/03/2017 14:56:33	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
Outros	Anuencia_Equipe.pdf	07/03/2017 11:53:59	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Biorrepositorio.pdf	06/03/2017 18:50:44	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
Outros	Autorizacao_06032017.pdf	06/03/2017 18:47:30	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
Outros	Aprovacao_CTC_Katia.pdf	16/12/2016 12:29:36	Deolinda Valéria Martins Pereira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Katia_Brasil_13_12_2016.docx	14/12/2016 13:53:40	Terezinha Maria de Paiva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_01_2016.pdf	14/12/2016 13:49:08	Terezinha Maria de Paiva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



Continuação do Parecer: 2.051.157

SAO PAULO, 08 de Maio de 2017

Assinado por:
Maria de Fátima Costa Pires
(Coordenador)