

DANILA VEDOVELLO

**Diversidade genética dos vírus influenza A
detectados em crianças de São Paulo**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.**

**São Paulo
2011**

DANILA VEDOVELLO

**Diversidade genética dos vírus influenza A
detectados em crianças de São Paulo**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia**

**Área de Concentração:
Biotecnologia**

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso

**Versão corrigida. Versão original se encontra arquivada no
Serviço de Comunicação do ICB**

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Vedovello, Danila.

Diversidade genética dos vírus influenza A, detectados em crianças de São Paulo. / Danila Vedovello. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Profª Dra. Viviane Fongaro Botosso.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Virologia Molecular.

Versão do título para o inglês: Genetic diversity of influenza virus A detected in children of São Paulo.

Descritores: 1. Influenza 2. Virologia Molecular 3. *Orthomyxoviridae* 4. Genomas 5. Sequenciamento genético 6. Evolução Molecular I. Botosso, Profª Dra. Viviane Fongaro II. Universidade de São Paulo. Instituto de ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. III. Título.

ICB/SBIB027/2011

UNIVERSIDADE DA SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas
Tecnológicas

Candidato(a): Danila Vedovello

Título da Tese: Diversidade Genética dos Vírus Influenza A, detectados em
crianças de São Paulo.

Orientador(a): Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado. Em
sessão pública realizada a//, considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:.....

AGRADECIMENTOS

“Brindo à casa, brindo á vida, meus amores, minha família...”

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar à minha Orientadora Doutora Viviane Fongaro Botosso. Agradeço por sua imensa ajuda e por seu otimismo sem fim. Muito Obrigada, Vivi: Obrigada pela paciência em esperar minha fase ruim terminar e por manter a porta aberta até eu conseguir retornar. Obrigada pela cumplicidade, pela amizade e por toda a sua dedicação. Eu nunca vou me esquecer de você e de tudo o que você fez por mim, simplesmente porque nada teria saído dessa forma se não fosse por você... Muitíssimo obrigada, pra sempre!

“Atirei-me ao mar. Mar de gente onde eu mergulho sem receio...”

À minha família, minha prioridade. Obrigada por entenderem minhas ausências nas festas, nos encontros, nas tardes de café com leite e broinha de milho na casa da vó Nena Obrigada minha mãe, por agüentar meus momentos de chatice e introspecção e por me dar suporte pra seguir minha escolha, você é muito forte eu te amo muito. Obrigada ao meu pai que eu amo demais e sempre me ajudou a levantar e sempre me ensinou a não desistir nunca. Agradeço à minha irmã, Danielle, pelos conselhos e por me mostrar que existe sempre uma outra forma de ver as coisas. Eu sei que tudo o que você me fala é para o meu bem e eu agradeço muito. A Larinha, que acabou de chegar e me derreteu. Obrigada linda da titia, pela presença e pela companhia nesses últimos dias de escrita da tese, comigo sentada no computador e você na minha cama, escutando Saltimbancos e tocando meu pandeiro meia lua, ai que fofa que você é! Obrigada também aos meus primos e primas, Ju, Lê, Flá, Van, Dri, Cintia, Fabio, Pedro, Thur, Naná, Lívia, Laura e Luiza, (que na verdade são irmãos), meu cunhado Rô, minhas tias e tios, Lídia, Márcia, Sonia, Décio, Paulinho, Sergio, Sonia, minha avó querida, Nena, que eu sinto tanto orgulho e quero tanto ser igual quando envelhecer. Agradeço a todos pela compreensão e pela força que sempre me deram. Família amada que eu não sou nada sem, Ararráka pra todos nós!

“Mar de gente onde eu me sinto por inteiro...”

Agradeço muito toda ajuda das meninas, amigas e irmãs, do laboratório da Vivi: Pri Comone, Pri Perini, Pat Sacramento e Mary Durigan. Não existe melhor lugar no mundo para trabalhar do que do lado de vocês. Não existe, estou certa disso. Amo demais cada uma de vocês, amigas mesmo. Amei demais cada momento, cada conversa e cada presença. Vou amar pra sempre cada lembrança e cada saudade que vai ficar. Amo demais vocês, do fundo meu do coração.

Às amigas Adelya Catarino (Lya), Ariane Lins (Ari), Maria Paula Valadares (Misa), Carolina Ferreira (Carolzinha), Siusi Ferreira, Regiane Nigro, Karine Teixeira (irmã de alma), Talyta Mafra e Adriana Ferraz. Eu agradeço tanto por todas conversas de apoio, por tantos e tantos “colos” e por tantos conselhos. Obrigada por sempre me incentivarem e por sempre se mostrarem orgulhosas de mim mesmo quando nem eu me achava capaz. Eu amo demais vocês, amigas. Ninguém chega a lugar nenhum sem amigos, ninguém chega a lugar nenhum sem apoio, ninguém é coisa nenhuma sem o tipo de carinho que vocês me deram. Obrigada! Muito Obrigada!!

“Eu acordo com uma ressada guerra, explode na cabeça...”

“... E eu me rendo, a mais um milagroso dia.”

Agradeço aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia: Fabia, Elaine e Marcos. Vocês são demais e nem sei como agradecer toda a ajuda. Obrigada mesmo!

Aos queridíssimos do lab do prof Edison, no ICB. Os doutores, mestres ou futuros, Luc Thomazelli, Felipation, Maués, Jansen, Tati, Angel, Gus, Dani, César, Teca, Laris, Dy, Crau, Jô, Renata, Ithi #MP, Atila, Luis, Camila, Priscila, Raquel... Eu adoro vocês. Muito obrigada por todos os momentos que passaram e por todas as lembranças ficaram.

As “meninas” da Hepatite: Camila, Carla, Denise, Bruninha, Patrícia, Miriam, Bete e Cosue. Vou sentir falta de vocês.

Quero agradecer ao professor Edison Durigon, pela oportunidade, ajuda, pelo empréstimo de equipamentos, pelas amostras, reagentes, tempo, disposição... Aos funcionários do ICB, Alice, Naide, Aninha e Zé, obrigada. a todos.

“Essa é a luz que eu preciso”

Agradeço aos trabalhadores do centro Espírita Irmão X, que sempre me receberam de braços abertos e me ajudaram muito.

“Luz que ilumina, cria e nos dá juízo”

Agradeço a Deus, que até hoje não descobri quem ou o que é, mas que me proporcionou essa conquista. Que eu não sei dizer se é algo interno, uma força minha, que eu mesma produzo, ou uma força externa, do universo, que me alimenta e me move. Agradeço a Deus, que eu ainda não tive capacidade de compreender, de definir, mas que me permitiu andar por esse caminho e chegar ao fim.

“Voltar com a maré, sem se distrair, tristeza e pesar, me entregar... Mal, mal vai passar, mal vou me abalar...”

“...Tristeza e pesar, sem se entregar”

Agradeço a CAPES, minha salvadora, única que me concedeu uma bolsa, depois de tanto, tanto tentar em outras agências de fomento... Depois de tanto, tanto esperar... OBRIGADA do fundo do meu coração!

“Esperando verdades de criança, um momento bom como, voltar com a maré, sem se distrair...”

“Navegar é preciso senão, a rotina te cansa.”

Aos “nerds” criadores do “Deus” Google (e da vertente Google Scholar) e de softwares tão necessários para trabalho e distração... Aos “nerds” criadores dos joguinhos Zinga, Blitz, PlayFish, PlayFirst, Youda que me ajudaram a esvaziar a mente quando necessário... Aos “nerds” criadores das redes sociais que integram ao mundo nós, os seres esquecidos dentro dos laboratórios... Aos artistas como Vanessa da Mata, Jack Johnson, Joss Stone, o pessoal Cordel do Fogo Encantado, do Teatro Mágico, do Rappa, Dave Matthes Band, e tantos outros que embalsamaram meus experimentos, me fizeram companhia na solidão do lab e me acalmaram nas horas complicadas.

“ Uma onda segue a outra, assim o mar olha pro mundo... Assim o mar olha pro mundo”

Obrigada!

Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as tuas rosas.
O resto é a sombra
De árvores alheias.

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

RESUMO

VEDOVELLO, D. **Diversidade Genética dos Vírus Influenza A, detectados em crianças de São Paulo.** 2011. 168 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantan – Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os vírus Influenza A infectam um largo espectro de hospedeiros e causam epidemias anuais. São vírus com alta variabilidade genética e RNA segmentado, que podem sofrer rearranjos entre os genes de diferentes vírus. Em 2006, foram analisadas 521 amostras de crianças menores de 5 anos atendidas no HU-USP e 25 foram positivas para Influenza A, sendo H3N2 o mais prevalente (68%). Cinco genes de 18 amostras foram seqüenciados e obtivemos 13 sequencias de HA, 12 da NP, 12 de NA, 14 da M e 10 da NS. Verificou-se a presença de várias mutações, especialmente na HA e NA, que favoreceram a substituição da cepa vacinal naquele ano. Todas as amostras H3N2 apresentaram sítios de resistências aos inibidores da M2. Diferentes linhagens circularam no mesmo ano, tanto de H1 como de H3, favorecendo rearranjos entre elas. Foram verificados, também rearranjos envolvendo os genes da HA e NP, indicando o complexo mecanismo de evolução desses vírus e enfatizando a necessidade de monitoramento da circulação e caracterização de seus genes.

Palavras-chave: Influenza. Orthomixoviridae. Virologia Molecular. Sequenciamento Genético. Evolução Molecular. Genoma.

ABSTRACT

VEDOVELLO, D. Genetic Diversity of Influenza Virus A detected in children of São Paulo. 2011. 168 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) - Instituto Butantan – Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Influenza A virus infects a wide range of hosts and cause annual outbreaks. RNA segmented virus has high genetic variability and may have rearrangements between the genes of different viruses. In 2006, 521 samples of children younger than 5 years were analyzed and 25 tested positive for Influenza A virus, of which the subtype H3N2 is the most prevalent (68%). Five genes of 18 samples were sequenced and 13 sequences of HA, 12 of NP, 14 of M and 10 of NS obtained were. The presence of this several mutations, especially in the HA and NA genes probably helped the replacement of the vaccine strain in that year. All H3N2 subtype samples showed points of resistance to M2 inhibitors. The phylogenetic analysis revealed the circulation of different lineages in the same year, for both H1 and H3, and the presence of two rearrangements involving the HA and NP genes. These results indicate the influence of rearrangements in the evolution of the virus and emphasize the need for monitoring of circulation and characterization of genes.

Keywords: Influenza. Orthomixoviridae. Molecular Virology. Genome. Genetic Sequence. Molecular Evolution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Reservatório do vírus Influenza A.....	18
Figura 2 - Diagrama da partícula do vírus Influenza A.....	20
Figura 3 - Complexo Ribonucléico dos vírus Influenza.....	20
Figura 4 - Estrutura do genoma dos vírus Influenza A.....	22
Figura 5 - Estrutura molecular da hemaglutinina do vírus da gripe Espanhola.....	26
Figura 6 - Ciclo replicativo do Vírus Influenza A.....	29
Figura 7 - Influência dos vírus Influenza nas taxas de hospitalização.....	32
Figura 8 - Comparação dos genótipos H1N1 suíno em casos recentes nos.....	36
Figura 9 - Modelo de vírus Influenza A e os efeitos da <i>Amantadina</i> e <i>Rimantadina</i>	40
Figura 10 - Modelo de vírus Influenza A e os efeitos do <i>Zanamivir</i> e <i>Oseltamivir</i>	41
Figura 11 - Fluxograma de trabalho.....	46
Figura 12 - <i>Primers</i> utilizados na Duplex-RT-PCR.....	50
Figura 13 - <i>Primers</i> utilizados na Multiplex-PCR.....	51
Figura 14 - <i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene da NA, subtipo N1.....	55
Figura 15 - <i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene da NA, subtipo N2.....	56
Figura 16 - <i>Primers</i> utilizados nas duas PCRs para amplificação do gene da Matriz.....	57
Figura 17 - <i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene da HA, subtipo H1.....	60
Figura 18 - <i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene da HA, subtipo H3.....	60
Figura 19 - <i>Primers</i> utilizados na PCR para amplificar o gene da Nucleoproteína.....	62
Figura 20 - <i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene da Proteína Não Estrutural.....	64
Figura 21 - Eletroforese dos produtos da <i>duplex</i> RT-PCR.....	70
Figura 22 - Circulação mês a mês dos vírus Influenza A e B durante o ano de 2006.....	71
Figura 23 - Eletroforese dos produtos da <i>Multiplex</i> RT-PCR.....	72
Figura 24 - Eletroforese dos produtos da <i>Semi-Nested</i> PCR.....	73
Figura 25 - Eletroforese dos produtos da <i>Semi-nested</i> ou <i>Nested</i>	73
Figura 26 - Eletroforese dos produtos da <i>Semi-nested</i> ou <i>Nested</i>	74
Figura 27 - Eletroforese dos produtos amplificados da Neuraminidase.....	76
Figura 28 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da NA.....	77
Figura 29 - Resumo dos fragmentos do gene da NA seqüenciados.....	77

Figura 30 - Eletroforese dos produtos da Matriz M.....	85
Figura 31 - Eletroforese dos produtos amplificados da Matriz.....	86
Figura 32 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da M.....	87
Figura 33 - Resumo dos fragmentos do gene da M.....	87
Figura 34 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da <i>nested</i> PCR da Hemaglutinina.....	88
Figura 35 - Eletroforese dos produtos da Hemaglutinina.....	90
Figura 36 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da Hemaglutinina.....	92
Figura 37 - Resumo dos fragmentos do gene da Hemaglutinina.....	92
Figura 38 - Eletroforese dos produtos amplificados da Nucleoproteína.....	93
Figura 39 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da Nucleoproteína.....	95
Figura 40 - Resumo dos fragmentos sequenciados do gene da Nucleoproteína.....	95
Figura 41 - Eletroforese dos produtos amplificados da Não estrutural.....	96
Figura 42 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da proteína Não estrutural.....	98
Figura 43 - Resumo de todos os produtos sequenciados da Não estrutural.....	98
Figura 44 - Fragmentos seqüenciados dos cinco genes dos vírus influenza A.....	99
Figura 45 - Representação do alinhamento de aminoácidos da Hemaglutinina H1N1.....	106
Figura 46 - Representação do alinhamento de Hemaglutinina H3N2.....	107
Figura 47 - Representação do alinhamento de aminoácidos Neuraminidase H1N1.....	109
Figura 48 - Representação do alinhamento de aminoácidos da Neuraminidase H3N2.....	111
Figura 49 - Representação do alinhamento de aminoácidos da Matriz (M2) H1N1.....	113
Figura 50 - Representação do alinhamento de aminoácidos da Matriz (M2) H3N2.....	114
Figura 51 - Representação do alinhamento de aminoácidos da Nucleoproteína H1N1.....	115
Figura 52 - Representação do alinhamento de aminoácidos da Nucleoproteína H3N2.....	116
Figura 53 - Representação do alinhamento de Não estrutural (NS1) H1N1.....	117
Figura 54 - Representação do alinhamento de aminoácidos da Não estrutural (NS1) H3N2.....	118
Figura 55 - Topologia das árvores das seqüências da Hemaglutinina.....	122
Figura 56 - Topologia das árvores das seqüências da Neuraminidase.....	124
Figura 56 - Topologia das árvores das seqüências da Proteína da Matriz.....	125
Figura 58-- Topologia das árvores das seqüências da Proteína Nucleoproteína.....	127
Figura 59 - Topologia das árvores das seqüências da Proteína Não Estrutural.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Organização Genômica Vírus Influenza.....	22
Tabela 2 - Relação dos <i>primers</i> utilizados para a DUPLEX-RT-PCR.....	53
Tabela 3 - Relação de <i>primers</i> utilizados na MULTIPLEX-RT-PCR.....	55
Tabela 4 - Relação de <i>primers</i> utilizados na Amplificação do gene da Neuraminidase.....	59
Tabela 5 - Relação de <i>primers</i> utilizados na Amplificação do gene da Matriz.....	62
Tabela 6 - Relação de <i>primers</i> utilizados na Amplificação do gene Hemaglutinina.....	65
Tabela 7 - Relação de <i>primers</i> utilizados na Amplificação do gene da Nucleoproteína.....	68
Tabela 8 - Relação de <i>primers</i> utilizados na Amplificação dos genes da Não Estrutural.....	70
Tabela 9 - Relação das cepas <i>Influenzavirus</i> A H3N2 e H1N1 recomendadas pela OMS.....	74
Tabela 10 - Relação do total de amostras analisadas e positivas para <i>Influenzavirus</i> A e B... 76	
Tabela 11 - Relação do total de amostras analisadas e positivas para H1N1 e H3N2.....	78
Tabela 12 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da Neuraminidase.....	81
Tabela 13 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da Neuraminidase.....	82
Tabela 14 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da Matriz.....	85
Tabela 15 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da Matriz.....	86
Tabela 16 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da Hemaglutinina.....	89
Tabela 17 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da Hemaglutinina.....	91
Tabela 18 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da Nucleoproteína.....	94
Tabela 19 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da NS.....	97
Tabela 20 - Relação das substituições de aminoácidos das cepas brasileiras.....	101

LISTA DE SÍMBOLOS

AMINOÁCIDOS

Nome	Abreviação
Glicina ou Glicocola	G
Alanina	A
Leucina	L
Valina	V
Isoleucina	I
Prolina	P
Fenilalanina	F
Serina	S
Treonina	T
Cisteina	C
Tirosina	Y
Asparagina	N
Glutamina	Q
Aspartato ou Ácido aspártico	D
Glutamato ou Ácido glutâmico	E
Arginina	R
Lisina	K
Histidina	H
Triptofano	W
Metionina	M

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Nome	Abreviação
Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Histórico.....	16
1.2 Classificação.....	17
1.3 Estrutura e Organização Genômica.....	20
1.4 Ciclo Replicativo.....	26
1.5 Aspectos Clínicos.....	29
1.6 Epidemiologia.....	30
1.7 Diagnóstico Laboratorial.....	36
1.8 Prevenção e Tratamento.....	39
2 OBJETIVOS.....	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Casuística – Amostras de coleção.....	48
3.2 Colheita das amostras.....	48
3.3 Fluxograma de trabalho.....	49
3.4 Detecção dos Vírus Influenza A e B pela Duplex-RT-PCR.....	50
3.4.1 Extração do RNA.....	50
3.4.1.1 Padrões virais.....	50
3.4.2 Obtenção do cDNA.....	51
3.4.3 Duplex RT-PCR.....	52
3.5 Subtipagem dos vírus de Influenza A por Multiplex- RT-PCR.....	53
3.6 Amplificação dos genes da HA, NA, NP, NS e M, dos Vírus Influenza A.....	56
3.6.1 Amplificação do gene da Neuraminidase.....	56
3.6.2 Amplificação do gene da Matriz.....	60
3.6.3 Amplificação do Gene da Hemaglutinina HÁ.....	62
3.6.4 Amplificação dos genes da Neuraminidase, Hemaglutinina e Matriz.....	66
3.6.5 Amplificação do Gene da Nucleoproteína (NP).....	66
3.6.6 Amplificação do Gene da Proteína Não Estrutural (NS).....	68
3.7 Análise dos produtos amplificados.....	70
3.8 Purificação dos produtos Amplificados.....	70
3.9 Reação de Sequenciamento.....	71
3.10 Processamento e alinhamento das seqüências dos genes.....	72
3.11 Reconstrução filogenética.....	72

4 RESULTADOS.....	74
4.1 Detecção dos Vírus <i>Influenza</i> A e B pela Duplex-RT-PCR.....	75
4.2 Subtipagem dos Vírus <i>Influenza</i> A e B pela Multiplex-RT-PCR.....	76
4.3 Amplificação e sequenciamento dos genes do Vírus <i>Influenza</i> A.....	77
4.3.1 Sexto segmento: Gene da Neuraminidase NA.....	77
4.3.2 Sétimo segmento: Gene da Proteína da Matriz (M).....	83
4.3.3 Quarto segmento: Gene da Hemaglutinina HÁ.....	87
4.3.4 Quinto segmento: Gene da Nucleoproteína NP.....	92
4.3.5 Oitavo segmento: Gene da Proteína Não Estrutural (NS).....	95
4.4 Alinhamento dos genes.....	99
4.4.1 Gene da Hemaglutinina – HÁ.....	99
4.4.2 Gene da Neuraminidase – NA.....	100
4.4.3 Gene da Proteína da Matriz – M.....	101
4.4.4 Gene da Nucleoproteína – NP.....	102
4.4.5 Gene da Proteína Não Estrutural – NS.....	103
4.5 Reconstruções filogenéticas.....	117
4.5.1 Gene da Hemaglutinina – HÁ.....	118
4.5.2 Gene da Neuraminidase – NA.....	119
4.5.3 Gene da Proteína da Matriz – M.....	121
4.5.4 Gene da Nucleoproteína – NP.....	122
4.5.5 Gene da Proteína Não Estrutural – NS.....	123
5 DISCUSSÃO.....	129
6 CONCLUSÕES.....	136
REFERÊNCIAS.....	137
ANEXOS	
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	164
ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa, envolvendo Seres Humanos.....	166
ANEXO C – Lista de Amostras colhidas no Hospital Universitário, durante 2006.....	167
ANEXO D - Lista de Amostras utilizadas na comparação com as amostras Brasileiras.....	168

1 INTRODUÇÃO

A gripe é uma infecção viral aguda, que acomete o trato respiratório e afeta todas as faixas etárias, embora crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos, sejam considerados o grupo de maior risco, devido a probabilidade de desenvolvimento de complicações mais sérias como pneumonia, podendo ser fatal (MONTTO, 2002).

A influenza ocasiona epidemias anuais, principalmente durante o período de inverno e é um grave problema de saúde pública devido, principalmente, a alta morbidade, com diminuição da produtividade gerando consequentes perdas econômicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009a). Estima-se que, anualmente, cerca de 10% da população mundial apresente um episódio de Influenza (NETO et al., 2003), sendo a doença responsável, portanto, por 3 a 5 milhões de casos e pela morte de 250.000 a 500.000 pessoas no mundo todo (WHO, 2003).

1.1 Histórico

A síndrome gripal é descrita em seres humanos desde épocas antigas e é conhecida por ocasionar surtos desde 2000 a.C (NETO, 2001). Existem poucos relatos sobre epidemias de influenza na literatura antiga e estudiosos têm tentado identificá-las durante o período da história antiga. A primeira descrição científica sobre a doença, foi feita por Hipócrates, médico e filósofo grego, em 412 a.C., que relatou a presença de uma doença respiratória aguda que acometeu o exército ateniense e desapareceu subsequenteamente. O primeiro relato oficial de uma epidemia, na qual os sintomas foram, provavelmente, provocados pelos vírus Influenza, ocorreu em 1173 d.C. (POTTER, 2001).

Em 1580 houve o primeiro de relato de uma epidemia de doença respiratória aguda que apresentou as características típicas de propagação intercontinental, ou seja, de uma pandemia. Essa epidemia teve origem no continente asiático durante o verão de 1580 e alastrou-se para África, Europa e mais dois países da Ásia (PYLE, 1986). Toda a Europa foi atingida em um período de 6 meses, sendo também disseminada para a América. Mais de 8000 óbitos foram declarados em Roma e algumas cidades espanholas foram dizimadas (BEVERIDGE, 1991). O nome Influenza surgiu na Itália, nesse mesmo ano, para descrever que os aspectos clínicos de febre, de tosse e de calafrio da epidemia seriam

decorrentes de “influências planetárias” (MURPHY e WEBSTER, 1996; TALAVERA, 1999; VALDEZ, 2002).

Durante a Idade Média, nos séculos XIV e XV, sete epidemias foram relatadas, e o primeiro relato no continente americano ocorreu em Texcoco, no México (VALDEZ, 2002). Na idade Moderna, análises de episódios de surtos de influenza possibilitaram o conhecimento do seu comportamento cíclico e 3 grandes epidemias foram relatadas (FORLEO NETO, 2001). A maior de todas teve início na Rússia em 1729, e disseminou-se por toda a Europa em 6 meses (PYLE, 1986).

Na Idade Contemporânea, nos anos de 1781 a 1782, 30 mil pessoas foram infectadas em uma pandemia, que teve início na China e disseminou-se pela Europa em 8 meses, totalizando mais de 10 milhões de pessoas infectadas. Relatos da época descreveram que o público mais afetado consistiu de jovens adultos. Embora hajam numerosos episódios relacionados à doença no decorrer dos séculos, somente em 1933, durante uma epidemia na Inglaterra, o vírus foi isolado (POTTER, 2001).

1.2 Classificação e hospedeiros

A gripe é causada pelos vírus Influenza, que pertencem à família *Orthomyxoviridae*, constituída de cinco gêneros: *Influenzavirus A* (IA), *Influenzavirus B* (IB), *Influenzavirus C* (IC), *Thogotovirus* e *Isavirus* sendo que desses, somente os *Influenzavirus* apresentam relevância clínica em humanos, e apenas os *Influenzavirus A* e *B* são reconhecidos por causar epidemias (KAWAOKA et al., 2005).

O sistema de nomenclatura da Organização Mundial da Saúde (OMS) inclui o gênero, hospedeiro de origem (com exceção de hospedeiro humano), a localização geográfica, o número do isolado, e o ano de isolamento. A descrição antigênica da hemaglutinina e neuraminidase é dada entre parênteses, somente para o *Influenzavirus A* (WHO, 2009a). Apenas um tipo de hemaglutinina e um de neuraminidase são conhecidos para Influenza B (PALESE e SHAW, 2007).

Os *Influenzavirus A* são classificados de acordo com as características antigênicas das proteínas Hemaglutinina (16 tipos) e Neuraminidase (9 tipos) (FOUCHER et al., 2005). Os vírus Influenza apresentam um amplo espectro de hospedeiros incluindo seres

humanos, porcos, cavalos, mamíferos silvestres e aves (OLSEN et al., 2006). Todos os subtipos de HA e NA são encontrados em aves aquáticas e não causam doença aparente (PEIRIS et al., 2007). Estudos filogenéticos mostram que os subtipos da NA e da HA são mantidos em aves e isso reintera a hipótese de que todos os vírus Influenza A são originários das aves (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

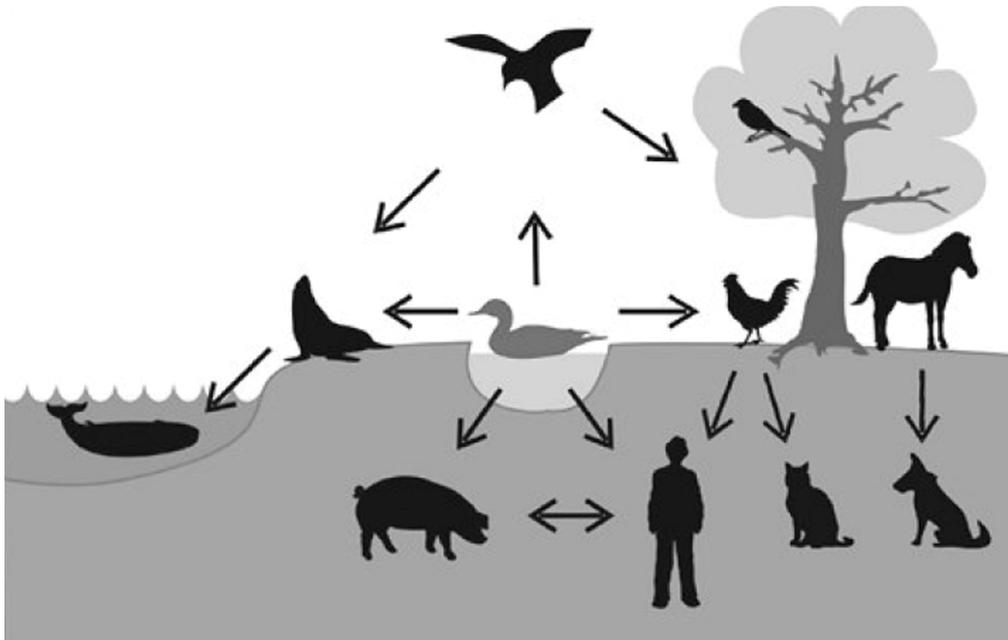


Figura 1 - Espectro de hospedeiros do vírus Influenza A. As aves selvagens aquáticas são os principais reservatórios de vírus influenza A. A transmissão tem sido relatada a partir de aves aquáticas selvagens para aves domésticas, mamíferos marinhos, porcos, cavalos e para seres humanos, bem como entre porcos e humanos, aves para seres humanos e, recentemente, foi relatada a transmissão da influenza equina para cães. Fonte: FIELDS (2007)

Os vírus de Influenza A podem infectar uma enorme variedade de espécies de aves aquáticas e migratórias, sendo estas, consideradas reservatório natural dos vírus Influenza A (BOYCE, 2009; MUNSTER et al., 2007; OLSEN et al., 2006). Entre essas populações, a transmissão faz-se por via fecal-oral (BOYCE et al., 2009; OLSEN et al., 2006), mecanismo esse extremamente eficaz devido à intensa excreção do vírus nas fezes (BROWN et al., 2009). Essas aves apresentam comumente infecções inaparentes, causadas por um ou mais subtipos simultaneamente, podendo eliminar vírus por longos períodos (OLIVEIRA Jr. et al., 2001). Os vírus são introduzidos nas populações de aves domésticas

através do contato direto com aves migratórias infectadas, ou indiretamente, por contaminação do alimento ou da água (ALEXANDER, 2007).

Alguns vírus da gripe aviária de baixa patogenicidade, do subtipo H1 ou H3, têm sido isolados ocasionalmente nos suínos, mas apenas três subtipos de vírus Influenza A (H1N1, H3N2 e H1N2) são endêmicos de suínos, sendo transmitidos entre os animais através de aerossóis e secreções respiratórias. A maior parte dos vírus Influenza A dos suínos são vírus recombinantes, contendo genes de origem Humana, Aviária e Suína (VAN REETH, 2007). Os suínos funcionariam como hospedeiros intermediários na transmissão do vírus ao Homem e são peças-chave para o surgimento de um estirpe recombinante com potencial pandêmico (BOYCE et al., 2009)

Apenas dois subtipos de Influenza A (H7N7 e H3N8) circulam na população equina, formando duas linhagens filogenéticas distintas (WRIGHT et al., 2007). Também foram detectados vírus Influenza A felídeos domésticos (THIRY et al., 2007) e selvagens (KEAWCHAROEN et al., 2004).

1.3 Estrutura e Organização Genômica

Os vírus Influenza são pleomórficos, as partículas virais, quando adaptadas em culturas celulares, geralmente são esféricas, apresentando um diâmetro de 80-120 nm. O capsídeo apresenta simetria helicoidal e é englobado por uma dupla camada lipídica, derivada da membrana plasmática da célula hospedeira. As partículas dos vírus Influenza se caracterizam pela presença de espículas, formadas pelas proteínas Neuraminidase e Hemaglutinina, que apresentam comprimentos de 10 a 14 nm, com uma proporção aproximada de quatro HAs para uma NA (CHU et al., 1949). Nessa membrana está também inserida a proteína M2 (SCHANELL e CHOU, 2008). A proteína da Matriz (M1) encontra-se logo abaixo do envelope e no seu interior está o complexo ribonucleoproteína (RNP), formado pelos segmentos de RNA envolvidos independentemente pela nucleoproteína (NP) e pelas três polimerases: Polimerase básica 1 (PB1), Polimerase básica 2 (PB2) e Polimerase ácida (PA), que são responsáveis pela transcrição e replicação do RNA (MURPHY e WEBSTER, 1996; NEUMANN et al., 2000, BOUVIER; PALESE, 2008) (Figuras 2 e 3).

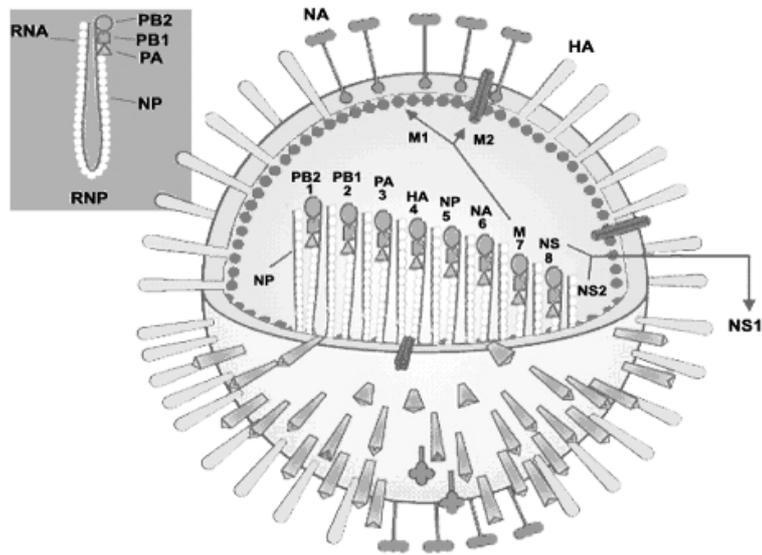


Figura 2 - Diagrama da partícula do vírus Influenza A. A Hemaglutinina, a Neuraminidase e a proteína da Matriz M2, são inseridas ao envelope lipídico. A Matriz (M1) encontra-se subjacente ao envelope e a proteína não estrutural NS2 (NEP), também encontra-se associada ao vírus. Os segmentos de RNA viral são revestidos com a nucleoproteína e estão vinculados ao complexo das polimerases.

Fonte: FIELDS (2007)

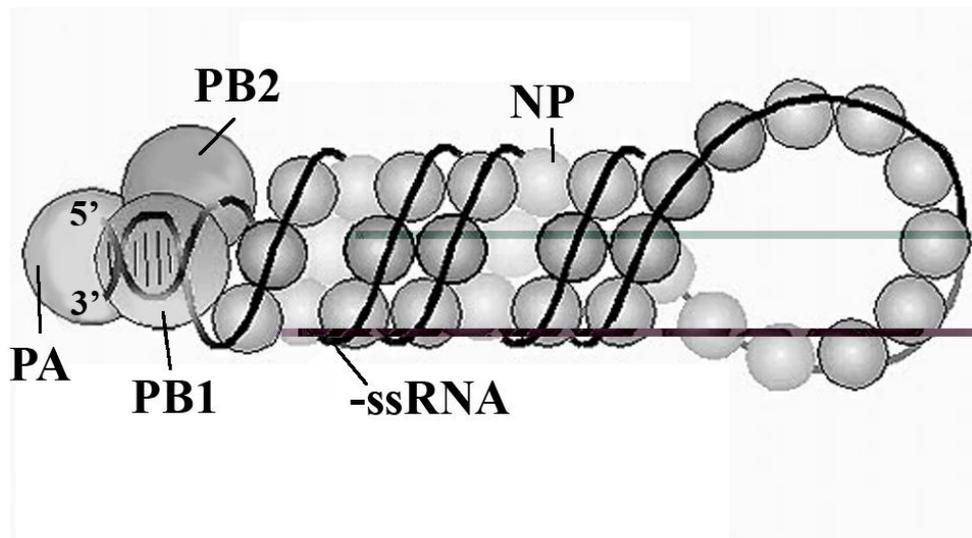


Figura 3 - Complexo Ribonucléico dos vírus Influenza. Os segmentos do genoma são englobados pela Nucleoproteína ligada ao RNA. Cada Complexo ribonuocleico contém três polipeptídeos (PA, PB1 e PB2).

Fonte: DIGARD (2002)

O genoma é segmentado, composto por ssRNA (fita única), com polaridade negativa. Os Vírus A e B apresentam 8 segmentos, que codificam 11 proteínas (CHEN et al., 2001; PORTELA e DIGARD, 2002; PALESE e SHAW, 2006) e o vírus C apresenta 7 segmentos, que codificam 9 proteínas (NEUMANN et al., 2000; KENDAL et al., 1985). Cada segmento possui regiões não codificadoras localizadas nas extremidades 3' e 5' que flanqueiam as regiões codificadoras. No geral essas extremidades são conservadas em todos os segmentos dos vírus Influenza (JAWETZ et al., 2000). Os três primeiros segmentos dos *Influenzavirus* A e B codificam as polimerases, o quarto codifica a HA, quinto a NP, o sexto a NA, o sétimo codifica a M1 e a M2 e oitavo as proteínas NEP e NS2 (Tabela 1, Figura 4). Os *Influenzavirus* C possuem um segmento a menos, que corresponde ao gene NA.

Tabela 1 - Organização Genômica dos Vírus Influenza.

Segmento	Tamanho*		Poli-peptídios Codificados		
	RNAviral	RNAm	Influenza A	Influenza B	Influenza C
1	2341	2320	PB2	PB1	P1
2	2341	2320	PB1, PB1-F2	PB2	P2
3	2233	2210	PA	PA	P3
4	1778	1756	HA	HA	HEF
5	1565	1539	NP	NP	NP
6	1413	1391	NA	NA, NB	M1, CM2
7	1027	1004, 314, 275	M1, M2	M1, BM2	NS1, NS2
8	890	868, 396	NS1, NS2	NS1, NS2	-

* O Tamanho dos RNAs é baseado em sequências do Vírus Influenza A, podendo variar entre os outros tipos e subtipos, especialmente os segmentos 4, 6 e 8. (Fonte: Fields, 2007)

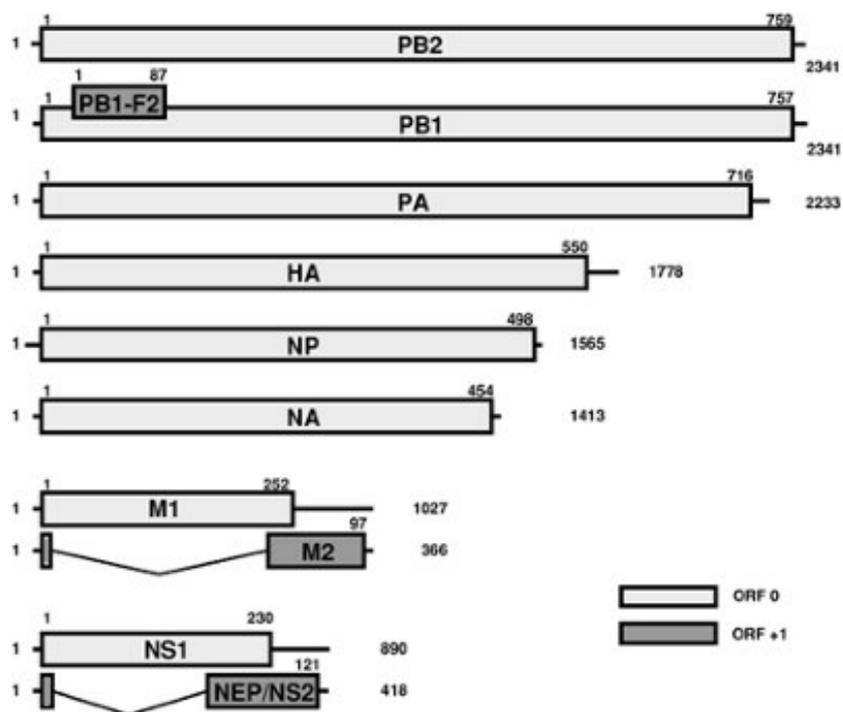


Figura 4 - Estrutura do genoma dos vírus Influenza A, usando como modelo o vírus influenza A/PuertoRico/8/34. São mostrados os oito segmentos do RNA e as proteínas codificadas por cada um deles. O segmento PB1 contém uma segunda ORF que resulta na proteína PB1-F2. A M2 e a NS2 (NEP) são codificadas pelo RNAm e os introns estão indicados pelas linhas em forma de V.
Fonte: FIELDS (2007)

A proteína Polimerase Básica 2 (PB2), com peso molecular de 87 KDa, formada por 759 resíduos de aminoácidos, é codificada pelo primeiro segmento do vírus, com 2341 nucleotídeos (PALESE e SHAW, 2007). A PB2 está envolvida na replicação viral (GASTAMINZA et al., 2003) e é responsável pela ligação do *cap* nas moléculas de pré-RNAm (BLAAS et al., 1982). O sítio onde é estabelecida essa ligação ainda não foi totalmente esclarecido, sendo, no entanto, descrito o envolvimento dos aminoácidos 533 a 564 (LI et al., 2001) e de outros dois domínios, compreendendo os resíduos 242 a 282 e 538 a 577 (HONDA et al., 1999). A forma com que o complexo da polimerase muda para adaptar-se a novos hospedeiros não é bem definida. No entanto, diversos autores relataram que a alteração de um único aminoácido da PB2 pode estar relacionada à adaptação de vírus aviários aos mamíferos, como verificada em um caso fatal de infecção pelo H7N7 em humanos em 2003 na Holanda e em recentes casos isolados de H5N1 humano no Vietnã e Tailândia (FOUCHIER et al., 2004; NAFFAKH et al., 2000; SHINYA et al., 2004;

TAUBENBERGER et al., 2005). Dessa maneira, a habilidade de se replicar em células de mamíferos foi relacionada ao aminoácido presente na posição 627 do gene (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

A proteína Polimerase básica 1 (PB1), com peso molecular de 96 KDa formada por 757 aminoácidos é codificada pelo segmento 2, que contém 2341 nucleotídeos (LAMB e CHOPPIN, 1976). A PB1 tem a função de adicionar os nucleotídeos durante o alongamento do RNA. Ela apresenta regiões conservadas características da RNA-polimerase/RNA-dependente (BISWAS e NAYAK, 1994) e também é responsável pela ligação nas extremidades terminais do RNA viral (RNAv) e do RNA complementar (RNAc) para iniciar a transcrição e a replicação, respectivamente (GONZALEZ e ORTIN, 1999; LI et al., 2001).

Um peptídeo adicional, denominado PB1-F2, contendo 87 aminoácidos é encontrado na maioria dos vírus Influenza A. Esse peptídeo parece causar alterações morfológicas e destruição da membrana mitocondrial da célula hospedeira, provocando a morte celular (CHEN et al., 2001). A proteína PB1-F2 apresenta diferentes comprimentos, sequências de aminoácidos, localização celular e funções que são características de cada cepa, estando relacionadas com a eficiência da replicação do vírus e, podem ou não, influenciar na sua patogenicidade (CHEN et al., 2010; McAULEY et al., 2010)

O terceiro segmento dos vírus Influenza, que possui 2233 nt, codifica a terceira Polimerase do vírus, a Polimerase ácida (PA), com peso molecular 85 KDa e 716 aa (PALESE e SHAW, 2007). Nenhuma função específica tem sido atribuída à proteína PA, mas a ocorrência de mutações que afetam tanto o mecanismo de transcrição quanto o de replicação têm sido descritas, indicando que essa proteína possui um papel em ambos os processos (FODOR et al., 2002; SONG et al., 2010; WANITCHANG et al., 2011). Existem fortes evidências que também relacionaram esta proteína ao aumento da virulência das cepas de H5N1 em patos (SONG et al., 2010).

A nucleoproteína (NP) é a maior proteína estrutural, com peso molecular de 56 KDa, e 498 aa, é rica no aminoácido arginina, e é codificada pelo quinto segmento (1565 nt) (PALESE e SHAW, 2007). A NP tem muitas funções diferentes e pode interagir com uma variedade de proteínas virais e celulares (PORTELA e DIGARD, 2002) É o principal alvo de reação cruzada dos linfócitos T citotóxicos gerados após infecção por todos os

subtipos de influenza (YEWEDELL e HACKETT, 1989). Em conjunto com a RNA-Polimerase/RNA-Dependente atua na transcrição e replicação do genoma viral (JACKSON et al., 1982). As diferenças na composição antigênica da NP permitem a classificação nos três gêneros: *Influenzavirus A, B e C* (MARTINS, 2001).

O sétimo segmento do vírus Influenza A codifica duas proteínas, a Matriz protéica M1 e a Matriz M2. A proteína da matriz M1 e a proteína de membrana M2 possuem 252 aa e 97 aa respectivamente (LAMB et al., 1994). Os genes das proteínas M1 e M2 são codificados por quadros de leitura sobrepostos, no mesmo segmento, e sofrem pressões seletivas diferentes. Para a proteína M1, 96% das mudanças são silenciosas, em contraste com apenas 66% para a proteína M2 (WEBSTER et al., 1992; STOUFFER et al., 2008).

A M1 é a proteína mais abundante no virion e encontra-se logo abaixo do envelope lipídico, fazendo o contato com as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas e com as RNPs, formando uma ponte entre os componentes do interior do vírus e as proteínas de membrana (NAYAK et al., 2004; SCHMITT e LAMB, 2005). A M1 está envolvida diretamente com a exportação nuclear das RNPs (CROS e PALESE, 2003). A interação da M1 com domínios das proteínas HA, NA e M2 sinaliza o processo de brotamento do vírus (HILLEMANN, 2002).

A M2 é uma proteína transmembrana expressa em larga escala na superfície do vírus formando canais iônicos que facilitam a passagem de íons de sódio através das membranas das células (SCHROEDER et al., 1994). Acredita-se que o principal papel da M2 é conduzir prótons do endossomo acidificado para o interior do vírus, facilitando a dissociação do complexo RNP do restante dos componentes virais, finalizando, assim, o processo de desnudamento durante a replicação viral (HAY, 1992). Também tem a função de equilibrar o pH na membrana do complexo de golgi das células infectadas durante o processo de maturação viral (PIELAK et al., 2011). As proteínas M1 e M2 estão aparentemente envolvidas na modulação entre a morfologia da partícula, de esférica para filamentosa (BAEK et al., 2009).

As proteínas NA e M2 são essenciais para a replicação do vírus, além de serem os principais alvos para a ação das drogas anti-virais.

O Oitavo segmento, formado de 890 nt, codifica as proteínas NS1 e NS2, duas proteínas não estruturais. Dependendo do tipo de vírus, a proteína NS1 é formada por de

202 a 238 aminoácidos. A NS1 é uma proteína dímera, nuclear, altamente expressa em células infectadas (HATADA e FUKUDA, 1992; NEMEROFF et al., 1995), que está associada ao processo de tradução do RNAm (EGOROV et al., 1998), inibindo a exportação nuclear do RNAm (KAWAOKA et al., 1998). A NS2, também conhecida como NEP (*nuclear export protein*), está envolvida no direcionamento da exportação nuclear das RNPs para o citoplasma, juntamente com a M1 (CROS e PALESE, 2003).

A hemaglutinina (HA) é a maior glicoproteína de superfície e é codificada pelo quarto segmento. Essa proteína apresenta importância fundamental na interação do virion com a célula hospedeira e recebeu esse nome por sua capacidade de aglutinar eritrócitos (HIRST, 1942).

A proteína é responsável pela adsorção do vírus aos receptores de ácido siálico, presentes na superfície celular, através da porção HA1 e pela fusão da partícula viral endocitada com a membrana endossomal que permite seu acesso ao citoplasma (MAGNER et al., 2000; MURPHY e WEBSTER, 2001).

É sintetizada inicialmente como o precursor denominado H₀, formado por 562 a 566 resíduos de aminoácidos. Após a tradução do precursor, ocorre o processamento da proteína que envolve mecanismos de glicosilação, adição de ácidos graxos e clivagem proteolítica, que são essenciais para a função da molécula. Essa clivagem resulta em duas subunidades, HA1 (PM \cong 47.000) e HA2 (PM \cong 29.000) que permanecem unidas por ligações dissulfeto (HULSE et al., 2004; LEE e CHEN, 2004; SAKAI et al., 2002). A subunidade HA1, com 319 a 326 aminoácidos, corresponde à porção animoterminal da proteína e se encontra externamente à membrana lipídica e a subunidade HA2, com 221 a 222 aminoácidos, permanece ancorada na membrana lipídica. Dependendo do subtipo da hemaglutinina, o número de resíduos de aminoácidos perdidos durante a clivagem proteolítica pode variar de 1 a 6 (LEE e CHEN, 2004; MURPHY e WEBSTER, 2001). A Hemaglutinina de vírus de alta patogenicidade, H5 e H7, contém múltiplos aminoácidos básicos nos sítios de clivagem (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

A análises de variantes de influenza A revelaram a presença sítios antigênicos, envolvidos na neutralização viral pelos anticorpos. Estes sítios estão presentes na parte globular da proteína que corresponde a subunidade HA1 da hemaglutinina. Para o subtipo H3 os sítios foram nomeados pelas letras A até E e para o H1 os sítios foram denominados

Ca1, Ca2, Cb, Sa e Sb (SKEHEL e WILEY, 2000; MURPHY e WEBSTER, 2001). Essas regiões são passíveis de sofrer mutações e por essa razão são as regiões de maior variabilidade da HA. Alterações em um dos sítios antigênicos ou em regiões próximas a eles, especialmente nos sítios A e B, são suficientes para determinar uma variação antigênica (WILEY; WILSON; SKEHEL, 1981) (Figura 5). Os demais sítios de HA1 são mais conservados, condição necessária para manter a estrutura e função da molécula (MURPHY e WEBSTER, 2001; WILEY et al., 1981).

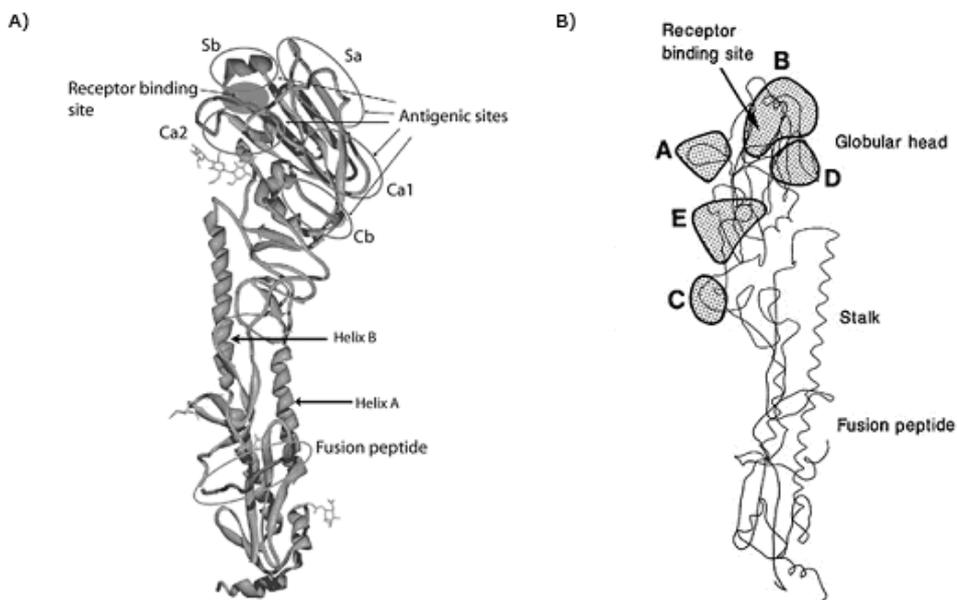


Figura 5 - **A:** Estrutura molecular da hemaglutinina. **A.** Vírus da gripe Espanhola (H1N1), de 1918. Estão indicados os cinco sítios antigênicos (Ca2, Sb, Sa, CA1 e Cb) que cercam os receptores de ligação dos ácidos siálicos. Próximo à membrana está indicado o peptídeo de fusão, e acima as hélices A e B. **B.** Vírus de Influenza A subtipo H3N2. Estão indicados os 5 sítios antigênicos (A a E) que cercam os receptores de ligação aos ácidos siálicos. Próximo à membrana está indicado o peptídeo de fusão
 Fonte: FIELDS (2007)

A neuraminidase (NA), segunda maior glicoproteína de superfície dos *Influenzavirus A*, codificada pelo sexto segmento, é um tetrâmero com formato de cogumelo. Ela é formada por um polipeptídeo de 469 resíduos de aminoácidos e a porção N-terminal se encontra voltada para o interior do vírus caracterizando-a como uma proteína de membrana integral tipo II

(LAVIER, 2002; XU et al., 1996).

A NA é responsável pela clivagem do ácido siálico dos receptores celulares, sendo de extrema importância para a infecção viral, pois permite que os novos vírus formados sejam liberados e consigam infectar novas células (MOSCONA, 2005). A NA também previne que os novos virions formados liguem-se uns aos outros, assegurando que os vírus não se agreguem (COLMAN, 1999; ENGLUND, 2002; GUBAREVA et al., 2000; STIVER, 2003).

Os sítios antigênicos desta proteína foram mapeados pela seleção de variantes pelo uso de anticorpos monoclonais. Analisando amostras de *Influenzavirus A* durante um período de 10 anos. Webster et al. (1980) definiram quatro regiões antigênicas diferentes, sendo que a região 1, sítio ativo, apresenta-se conservada entre as cepas de *Influenzavirus A* e B, enquanto as demais (2, 3 e 4) apresentaram variações antigênicas ao longo dos anos. A frequência de substituições de nucleotídeos para o gene inteiro é estimada em 2.28×10^{-3} /sítios/ano, com 42% de mutações não silenciosas e 35% dessas substituições localizadas em importantes epítomos da proteína (XU et al., 1996). Como a HA, as moléculas de NA são imunogênicas e variantes são selecionadas na natureza, sendo que a proteção contra os vírus Influenza está intimamente relacionada aos níveis de anticorpos anti-HA e anti-NA (KILBOURNE et al., 2004).

1.4 Ciclo replicativo

O processo de replicação dos vírus Influenza envolve várias etapas: em primeiro lugar, a ligação do vírus com a célula hospedeira, em seguida a produção de cópias do RNA e a de proteínas e, finalmente, a montagem e saída da célula (BOUVIER e PALESE, 2008).

A ligação do vírus com a célula ocorre devido à interação da Hemaglutinina aos ácidos siálicos presentes na superfície das células hospedeiras. As hemaglutininas dos vírus influenza que se replicam em diferentes espécies apresentam diferente especificidade com o ácido siálico, dependendo do tipo de ligação dos mesmos com a galactose. Os vírus influenza humanos ligam-se, preferencialmente, aos receptores presentes no ácido N-acetilneuramínico ligado à penúltima galactose por meio da ligação α 2,6 (o carbono 6 da galactose liga-se ao carbono 2 do ácido siálico), enquanto que os vírus influenza aviários, tem maior afinidade pelos ácidos siálicos que fazem a ligação α 2,3 (IBRICEVIC et al.,

2006; NICHOLLS et al., 2007; SHINYA et al., 2006). Ambos os receptores estão presentes em porcos. A especificidade da hemaglutinina pelos diferentes receptores está relacionada a presença de aminoácidos específicos no local de ligação. A presença de glutamina na posição 226 da hemaglutinina, subtipo H3, acomoda preferencialmente ácido siálico de ligação 2,3, enquanto que a presença de Leucina acomoda preferencialmente o ácido de ligação 2,6 (SHAW e PALESE, 2007).

Após a ligação da HA com os ácidos siálicos, o vírus entra na célula por endocitose. A endocitose, mediada pela clatrina (proteína que forma vesículas), tradicionalmente tem sido o modelo para a entrada do vírus da gripe (SHAW e PALESE, 2007).

O endossoma é então acidificado, até pH 5,0, provocando a clivagem da HA em dois polipeptídeos HA1 e HA2 (SKEHEL e WILEY, 2000; STEGMANN, 2000). Uma vez no ambiente ácido do endossomo, a molécula de HA clivada sofre uma mudança conformacional que expõe o peptídeo de fusão na extremidade N-terminal da subunidade HA2, permitindo que ele interaja com a membrana do endossomo (SHAW e PALESE, 2007).

Após a fusão da HA com a membrana do endossomo, simultaneamente, na presença da proteína M2, ocorre uma acidificação que ativa canais iônicos que permitem a entrada de íons H⁺ do endossomo para a partícula do vírus, resultando na liberação da RNP livre da proteína M1 (SHAW e PALESE, 2007). Durante a infecção, a dissociação da M1 do RNP é necessária para a entrada no citoplasma da célula hospedeira (BUI et al., 1996).

No ciclo replicativo do vírus da gripe a transcrição ocorre no núcleo. Após liberadas, as RNPs migram para o núcleo (O'NEILL et al., 1995) pelos poros nucleares por um processo ativo envolvendo o Sinal de Localização Nuclear, presentes nas RNPs, principalmente na nucleoproteína, e a maquinaria de importação do núcleo (CROS e PALESE, 2003).

No núcleo da célula, a polimerase do vírus inicia a transcrição do RNAm. A replicação ocorre em duas etapas. Primeiramente é feita uma cópia positiva complementar, que será posteriormente usada como molde para a síntese do RNA genômico. Nesse processo, todas as reações são catalisadas pelo complexo de polimerases, que apresentam

funções distintas e são empregadas em diferentes passos (FODOR e BROWNLEE, 2002; NEUMANN et al., 2004; PORTELA e DIGARD, 2002).

Após o processo de replicação, o RNA é exportado para o citoplasma, com a ajuda da M1 e da NEP (CHEN e KRUG, 2002), onde será traduzido. As proteínas de membrana (HA, NA e M2) a Matriz M1 e as RNPS, são transportadas pelo complexo de golgi para o local de montagem (KASH; GOODMAN; KATZE, 2006).

O último passo na morfogênese viral envolve liberação do vírus em meio extracelular. O brotamento ocorre na membrana plasmática e é fortemente dependente da presença de lipídios. (SUOMALAINEN, 2002) (Figura 6).

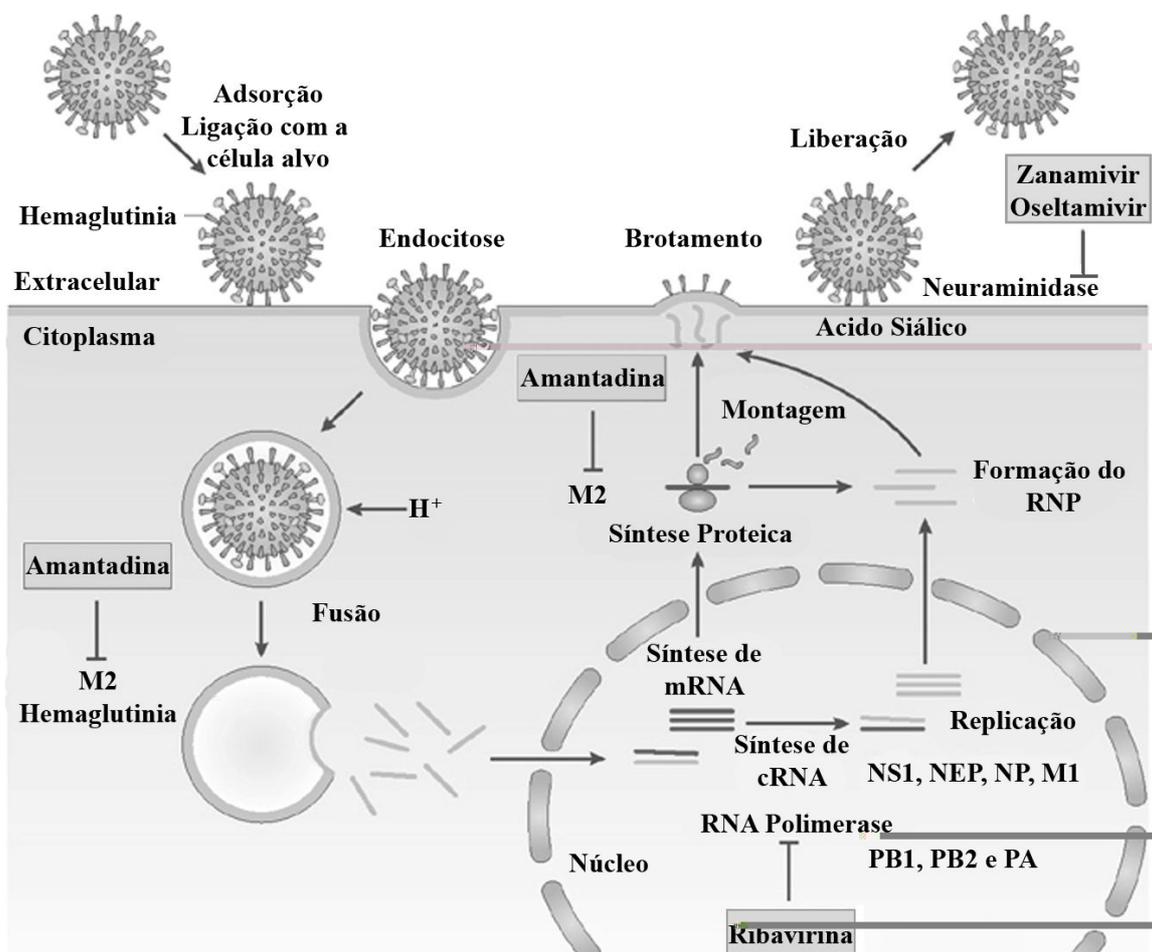


Figura 6 - Ciclo replicativo do Vírus Influenza A exibindo as etapas e proteínas envolvidas no processo.

Fonte: VON ITZTEIN (2007)

1.5 Aspectos clínicos

Os sintomas da infecção por Influenza, mais freqüentemente associados, são febre de 38 °C a 40 °C, com duração de aproximadamente 1 a 3 dias e pico nas primeiras 24 horas, dor de cabeça, dor de garganta, congestão nasal, mialgia, anorexia e fadiga. Com menor frequência podem ser observados, náusea, dor abdominal, diarreia e fotofobia (GAVIN e THOMSON, 2003).

Os vírus replicam-se nas células epiteliais colunares do trato respiratório, misturam-se às secreções respiratórias e são liberados pelo ato de espirrar, tossir ou falar (HILLEMANN, 2002). A viremia não é usual em infecções por influenza. O vírus é liberado a partir da superfície apical da célula, que podem limitar a propagação sistêmica, mas podem facilitar o acúmulo dos vírus no lúmen do trato respiratório e facilitar a transmissão para o próximo hospedeiro (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007). Em aves aquáticas a replicação ocorre no trato gastrointestinal, sendo o vírus eliminado pelas fezes.

O período de incubação varia de 1 a 4 dias e a transmissão inicia-se 24 horas antes do início dos sintomas, e prolonga-se até sete dias após (KENDAL et al., 1985). Crianças podem transmitir o vírus por período mais prolongado que se estende até 10 dias após o início dos sintomas (RENNELS, 2002).

Doenças crônicas, como as cardíacas, pulmonares, diabetes, doença renal, doenças reumatológicas e acidentes vasculares cerebrais, estão entre os fatores de risco para complicações da gripe e, independentemente da idade, a presença de um fator de risco pode gerar um aumento na possibilidade de hospitalização e risco de morte (IZURIETA et al., 2000). Outros grupos de risco para complicações clínicas ocasionadas pela gripe incluem grávidas e pacientes imunodeprimidos. Comparado com as mulheres não-grávidas, mulheres grávidas, especialmente durante o terceiro trimestre de gravidez, apresentam mais eventos cardiopulmonares durante as epidemias de influenza (NEUZIL et al., 1998).

Complicações resultantes de infecções por influenza envolvem diversos órgãos do corpo. As mais sérias e freqüentes são as pulmonares, que podem ser de três categorias: pneumonia primária por influenza, pneumonia secundária bacteriana, e exacerbações de doenças pulmonares crônicas (ROTHBERG et al., 2008). Em crianças, o vírus influenza

pode provocar, além dos sintomas respiratórios, complicações como a otite média aguda (HEIKKINEN, 2000).

As complicações neurológicas da gripe incluem encefalopatia (Síndrome de Reye), encefalomielite, mielite transversal, meningite asséptica, distúrbios neurológicos focais e síndrome de Guillain-Barré. O envolvimento do sistema nervoso é mais comum em crianças (STUDAHL, 2003).

As manifestações clínicas das crianças infectadas pelo Influenza A (H1N1), pandêmico, foram semelhantes às verificadas na gripe sazonal, com a ocorrência de febre, tosse, rinorréia, vômito, inflamação da garganta, dor abdominal, chiado e, mais raramente, alterações neurológicas e de comportamento, diarreia e mialgia. Os casos geralmente são autolimitados, entretanto foram descritas complicações incluindo pneumonia levando a insuficiência respiratória, complicações neurológicas (como encefalopatias) e miocardite (VERRASTRO et al., 2009; ZHENG et al., 2010).

1.6 Epidemiologia

A influenza ocorre de forma epidêmica e ocasionalmente pandêmica. Uma pandemia ocorre quando um vírus novo acomete a população, a qual não tem nenhuma imunidade contra ele, resultando em severas e simultâneas epidemias envolvendo extensos contingentes populacionais. As pandemias têm ocorrido de forma irregular, geralmente com 30 a 40 anos de intervalo (COX e SUBBARAO, 2000).

As epidemias de influenza tendem a ser sazonais, com pico de incidência ocorrendo geralmente nos meses de inverno em países de clima temperado, tanto no Hemisfério Norte, com surtos entre os meses de novembro e março, como no Hemisfério Sul, com pico do mês de maio a setembro (FINKELMAN et al., 2007). Por outro lado, nos países de clima tropical a atividade da influenza tende a ser mais esporádica, com a ocorrência de casos no decorrer do ano inteiro ou em pequenos surtos, esparsos e irregulares (LOWEN e PALESE, 2007).

A transmissão do vírus pode ocorrer tanto via aerossol como por contato com fômites contaminados e a eficiência de cada mecanismo está relacionada a vários fatores,

dentre os quais as condições ambientais, como temperatura e umidade (BRANKSTON et al., 2007). Lowen et al. (2009) sugeriram que a transmissão via aerossol pode ser bloqueada com umidade relativa do ar em torno de 80% e temperatura em torno de 30 °C, enquanto que a transmissão por contato não é afetada por esses fatores ambientais. Portanto, a transmissão direta de hospedeiro para hospedeiro, via aerossol, é mais eficiente a 5 °C e com baixa umidade relativa em torno de 20 a 35%, condições estas, verificadas durante o inverno nos países de clima temperado. Sendo assim, foi sugerido que a via predominante de transmissão em países de clima tropical é por contato e em países de clima temperado é por aerossóis. Além disso, o clima pode influenciar a susceptibilidade do hospedeiro e proporcionar a aglomeração da população facilitando a disseminação do vírus (ALONSO et al., 2007; KAMPS et al., 2006; WRIGHT et al., 2007).

No Brasil, a circulação ocorre de maneira similar a uma “onda” anual, com início da circulação nas zonas equatoriais, estendendo-se progressivamente para as zonas tropicais e subtropicais, com um intervalo de aproximadamente três meses entre o pico das regiões Norte e Sul do país (ALONSO et al., 2007).

As epidemias de influenza estão associadas a altas taxas de hospitalização e de mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca, doença pulmonar crônica, crianças menores de 2 anos de idade e idosos. Em idosos a taxa de hospitalização pode atingir de 1/270 em pacientes maiores de 65 anos de idade comparado com 1 a cada 2900 para pessoas em idade de 44 anos (CHIEN e JOHNSON, 2000, GUAN et al., 2002; CHIEN, 2002) e a taxa de hospitalização em crianças menores, hípidas, com idade inferior a 1 ano, é semelhante aos idosos e adultos portadores de doenças crônicas (Figura 7) (MUNOZ, 2003).

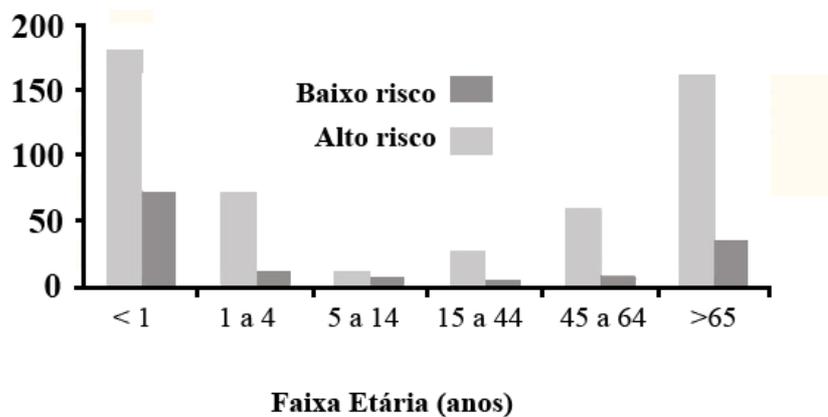


Figura 7 - Influência dos vírus Influenza nas taxa de hospitalização por 10.000 habitantes, por faixa etária.
 Fonte: NEUZIL et al. (2002)

As variações antigênicas do vírus Influenza ocorrem por dois mecanismos denominadas *drift* e *shift* antigênicos:

Os *drifts* antigênicos são mudanças menores que ocorrem pelo acúmulo de mutações pontuais, principalmente nos genes da HA e/ou NA, resultando em substituições de aminoácidos e permitindo, muitas vezes, o escape de anticorpos neutralizantes.

Os *shifts* antigênicos são mudanças maiores, específicas para o vírus Influenza A, no qual ocorrem rearranjos entre os segmentos do genoma viral de dois ou mais vírus que infectam uma mesma célula. Esse mecanismo pode gerar um vírus novo, facilmente disseminado pela população que ainda não apresenta imunidade, atingindo uma grande região geográfica, como por exemplo, um continente, ou até mesmo todo o planeta, ocasionando as pandemias (TONIOLLO NETO et al., 2003), bem como ocorrer entre as cepas sazonais circulantes, sem grande impacto epidemiológico. HOLMES e colaboradores, 2005, em um estudo realizado com 413 seqüências completas do genoma do vírus Influenza A, durante 7 anos consecutivos, encontraram 14 eventos de rearranjo entre as proteínas HA e NA e proteínas internas do vírus, que não causaram, porém, impacto epidemiológico pois os rearranjos ocorreram em vírus adaptados à circulação em humanos, subtipos H1N1 e H3N2. Esses estudos comprovam a importância de obter métodos mais sofisticados para a análise dos rearranjos em todos os segmentos do vírus Influenza (MACKEN et al., 2006).

Nos séculos XIX e XX ocorreram 5 pandemias. A pandemia de 1830, que teve início no inverno deste ano na China, espalhou-se pelo mar até Filipinas, Índia, Indonésia e em toda a Rússia e Europa, atingindo a América do Norte, retornando para a Europa em 1831. Em termos de gravidade, compara-se a pandemia de 1918, a maior e mais grave descrita até o momento (POTTER, 2001). Ainda no Século XIX, em 1889, ocorreu a primeira pandemia verdadeiramente global, com início na Rússia, se espalhando para África, Américas, China, Índia, Austrália e Nova Zelândia, totalizando aproximadamente 300 mil mortos (FORLEO NETO, 2001)

Um dos eventos médicos mais dramáticos da história, sendo considerado o maior holocausto médico, foi a pandemia de gripe de 1918 (POTTER, 2001). A gripe espanhola, como foi nomeada, foi ocasionada pela transmissão direta do vírus H1N1 para humanos (TAUBENBERGER et al., 2005). Manifestando-se em três ondas, essa pandemia espalhou-se rapidamente pelo mundo, infectando cerca de 50% da população mundial, com a manifestação dos sintomas em 25%. Embora os dados não sejam precisos, a mortalidade descrita foi superior a 20 milhões de pessoas (GHENDON, 1994). Estima-se que somente na cidade de São Paulo, a Gripe Espanhola infectou mais de 350 mil pessoas deixando 6891 mortos, a maioria em crianças menores de 4 anos, com 40,75% dos óbitos, 5,73% a mais do que entre as pessoas de 20 a 44 anos (BERTOLLI FILHO, 1989).

Em fevereiro de 1957, na China, teve início a circulação de um novo subtipo do vírus Influenza A, H2N2, denominada Gripe Asiática. Em 6 meses, essa epidemia alastrou-se para Cingapura, Taiwan e Japão depois para o resto do mundo, ocasionando a segunda pandemia do século XX. Mais de 40% da população foi infectada, mais de 25% apresentaram sintomas clínicos e foi relatado um total de 1 milhão de mortes (FORLEO NETO, 2001). Esse subtipo foi gerado pela incorporação dos genes codificadores da HA, NA e PB1 de vírus aviários nos vírus humanos circulantes (WEBSTER et al., 1992).

Finalmente, em 1968, tivemos a última grande pandemia do século ocasionada pelo subtipo H3N2, formado pela incorporação dos genes HA e PB1 do vírus aviário em vírus humanos circulantes (TAUBENBERGER et al., 2005). Essa gripe, denominada de Hong Kong, teve início em julho na China e somente nessa região, a nova variante do vírus Influenza A (H3N2), provocou 500 mil casos disseminando-se a seguir para Hong Kong e depois para o resto do mundo (FORLEO NETO, 2001).

No ano de 1977 houve o ressurgimento da linhagem H1N1 (gripe Russa) que apresentou mais de 50% dos casos em pessoas menores de 25 anos, sugerindo que indivíduos mais velhos estavam protegidos pela imunidade pré-existente (MURPHY e WEBSTER, 1996). A gripe teve início em 3 províncias chinesas e delas ocorreu a disseminação para os outros países. Em oito meses o subtipo já havia alcançado a América do Norte e em um ano a América do Sul (NETO, 2001). Desde essa época, os subtipos H3N2 e H1N1 vem circulando concomitantemente na população humana (KENDAL et al., 1985).

Em 1997, o subtipo H5N1 foi descrito em episódio fatal de influenza em uma criança com faringite, tosse seca e febre, sendo a seguir relatados 18 casos com 6 óbitos. Essa estirpe apresentava múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem da HA, caráter associado à alta patogenicidade em galinhas (SUBBARAO et al., 1998). O vírus foi transmitido de aves migratórias, patos, para aves domésticas e, posteriormente, ao homem tornando-se altamente patogênicos e causando uma grave epidemia na Ásia entre os anos de 2003 e 2005 (PUZELLI et al., 2005; UNGCHUSAK et al., 2005). Desde o início da epidemia, correram um total de 518 casos com 306 mortes, sendo os países que registraram o maior número de casos o Egito (121 casos confirmados e 40 mortes) e a Indonésia (171 casos e 141 mortes) (WHO, 2010f). Atualmente essa epidemia apresenta circulação restrita a Camboja, Indonésia, China, Vietnã e Egito, países nos quais o vírus ainda circula em aves domésticas. Não há evidência de transmissão sustentada entre humanos (WHO, 2010d)

Em março/abril de 2009, vírus de Influenza A foram isolados de dois pacientes com gripe no Estado da Califórnia, EUA, sem contato conhecido com suínos. Porém, não foi possível subtipar os vírus pelas metodologias rotineiramente utilizadas. Após análise do genoma viral verificou-se tratar-se de um novo vírus, do subtipo H1N1, cuja origem seria de suínos. Essa variante disseminou-se rapidamente pelo mundo e em junho de 2009 a OMS elevou o nível de alerta para 6, o que caracteriza uma pandemia (WHO, 2010d).

Dados epidemiológicos indicam que a pandemia de Influenza A(H1N1) começou na cidade de La Gloria, no México, em meados de fevereiro de 2009, e em abril essa mesma variante foi identificada no sul da Califórnia (WHO, 2009b). Após o isolamento, verificou-se que o vírus apresentava os genes: PB1, PB2, HA, NP, NS e NP similares ao vírus de Influenza suíno H1N1 norte americano e os genes NA e M mais intimamente relacionados

à linhagem suína na Eurásia. A cepa suína da América do Norte havia sofrido, anteriormente, uma tripla recombinação entre proteínas PB1 e NA oriundas da cepa humana H3N2, as proteínas PB2 e PA de uma cepa aviária e as proteínas HA, NP, M, NS de uma cepa suína Norte Americana H1N1 (ZELL et al., 2009; DAWOOD et al., 2009) (Figura 8).

Do início da pandemia até 6 de agosto de 2010, um total de 214 países relataram casos confirmados de Influenza A, H1N1 pandêmico, incluindo 18.449 mortes (WHO, 2009b). A atividade do influenza, pandêmico (H1N1) e sazonal (H1N1, H3N2 e B), em todo o mundo, durante os meses de fevereiro e setembro de 2010, foi considerada baixa em relação ao mesmo período de 2009. A circulação do Influenza A (H1N1) pandêmico decresceu durante esse período, levando a Organização Mundial da Saúde a decretar o fim da pandemia em 10 de agosto de 2010.

A maioria dos pacientes afetados com a Influenza A (H1N1) foi de adolescentes e jovens adultos, com taxas elevadas de hospitalização em crianças muito jovens. Em geral 7% a 10% dos pacientes internados foram mulheres grávidas, no segundo ou terceiro trimestre de gestação. As manifestações clínicas variaram desde infecção assintomática até doença fatal grave, com exacerbação de outras doenças e falência de múltiplos órgãos. Dos pacientes internados de 10% a 25% foram admitidos em UTI e 2% a 9% morreram. (WHO, 2009b).

Os últimos dados sobre a circulação do vírus influenza no Hemisfério Sul demonstram haver uma variabilidade em diferentes regiões, sendo o vírus Influenza A(H1N1) pandêmico o predominante em países como Austrália, Colômbia e Nova Zelândia, até o mês de julho de 2010. Enquanto que a Influenza sazonal (H3N2) e Influenza B predominaram na África e América do Sul, além de ocorrência de surto localizado na China. Os casos confirmados de Influenza A (H1N1) sazonal foram extremamente raros. No Hemisfério Norte a atividade da Influenza na Europa e América do Norte foi baixa em relação ao mesmo período do ano anterior. Por outro lado em países como Índia, Camboja, China e Malásia a epidemia no mesmo período foi mais disseminada.

No Estado de São Paulo (ESP), em 2009 foram confirmados 12.002 casos de Influenza Pandêmica com 578 óbitos (56 óbitos em gestantes). Em 2010 foram

confirmados 89 casos e 15 óbitos (um óbito em gestante) (SES, 2009). No Brasil, desde a declaração de transmissão sustentada do vírus de Influenza A (H1N1) Pandêmica, ocorrida em 16 de julho de 2009, somente os casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), que são caracterizados por febre, tosse e dispnéia, são de notificação compulsória imediata (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2009).

Em 10 de agosto de 2010 a OMS declarou que a Influenza A H1N1 Pandêmica passou para a fase pós – pandêmica, o que significa dizer atividade da doença em níveis sazonais. No início de 2010 foi encontrado, pela primeira vez, um vírus sazonal que sofreu rearranjo com genes do H1N1 pandêmico (VIJAYKRISHNA et al., 2010). Por essa ocasião foi recomendado o monitoramento contínuo de doenças respiratórias e a continuidade da vacinação para grupos de risco em países onde a vacina estiver disponível (PAHO, 2010). Somente no Brasil, a vacinação, utilizada como prevenção durante a pandemia de H1N1, atingiu um total de aproximadamente 9.999.880 doses aplicadas (PAHO, 2010).

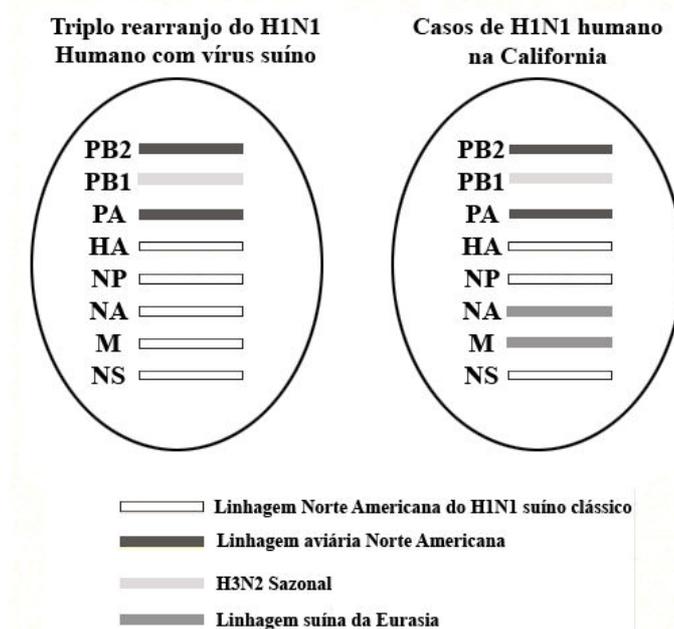


Figura 8 - Esquema do genoma dos vírus H1N1 suíno e o vírus H1N1, pandêmico. À esquerda está representada a cepa suína que sofreu triplo rearranjo (genes de vírus humano, suíno e aviário). À direita está representada cepa de H1N1 pandêmica, isolada em 2009, que mostra o rearranjo do vírus suíno americano com vírus de linhagem suína da Eurásia. As siglas identificam seus genes: HA – Hemaglutinina; M - Matriz, NA - Neuraminidase, NP - Nucleoproteína, NS – proteína Não Estrutural; PA, PB1 e PB2 – Complexo Polimerase.

1.7 Diagnóstico Laboratorial

A diferenciação das doenças provocadas pelo vírus da influenza e aquelas atribuídas a outros vírus respiratórios é difícil, quando baseada somente em sintomatologia clínica. O diagnóstico laboratorial é importante no controle de propagação do vírus, além de permitir a utilização de terapia antiviral específica e principalmente detectar os primeiros casos de influenza pandêmica (BESSELAAR et al., 2004; DWYER et al., 2006). Em adultos com síndrome gripal clássica, num período de epidemia, o diagnóstico clínico pode ter uma acurácia de 60 a 70%. Já em crianças e idosos, essa acurácia tende a ser menor (LYNCH e WALSH, 2007).

O diagnóstico de influenza é baseado na detecção do vírus, por isolamento em cultura de células ou ovos embrionados de galinha; na detecção dos antígenos virais, pela reação de hemaglutinação e inibição de hemaglutinação, imunofluorescência direta ou indireta (IFI) ou ensaio imunoenzimático (EIA) utilizando anticorpos específicos; ou através da detecção do ácido nucléico viral pela RT-PCR. Para um diagnóstico preciso a qualidade das amostras clínicas é essencial, devendo ser colhidas no período de excreção máxima do vírus, para evitar resultados falso negativos, que são verificados em todos os métodos diagnósticos utilizados (LANDRY, 2011; DWYER et al., 2006).

O método laboratorial padrão para o diagnóstico de Influenza é baseado no isolamento do vírus em cultura de células (HARMON, 1992). Este método, seguido da detecção dos antígenos virais utilizando anticorpos específicos, é uma metodologia sensível e específica, mas requer infra-estrutura e pessoal especializado, sendo também uma técnica demorada [cerca de 10 dias] (MURPHY & WEBSTER, 1996). Porém, outros métodos de detecção dos antígenos virais, diretamente das amostras clínicas, são utilizados: como ensaios de imunofluorescência (IFA) e imunoenzimático (ELISA) e reação de hemaglutinação (HERRMANN et al., 2001). Esta última permite a detecção e tipagem utilizando anticorpos específicos contra HA e NA (WRIGHT et al., 2001).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é um método alternativo, que permite a detecção do ácido nucléico viral, sendo mais rápido e sensível, que o método padrão (CHERIAN et al., 1994). A utilização da reação em cadeia pela polimerase após a transcrição reversa (RT-PCR) é descrita por vários autores para detecção, tipagem e

subtipagem dos vírus Influenza (BESSELAAR et al., 2004; STOCKTON et al., 1998; ELLIS et al., 1997). A *multiplex* PCR, com *primers* específicos para os genes da HA e/ou NA, é utilizada na detecção dos *Influenzavirus A, B, C* e na subtipagem do *Influenzavirus A* (BESSELAAR et al., 2004; PONTORIERO et al., 2003; PODDAR et al., 2002; CHOI et al., 2002; ELLIS et al., 1997). Atualmente, a *Real-Time PCR* é a técnica molecular mais aceita por apresentar maior rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e redução do risco de contaminação (MACKAY et al., 2002).

Com o advento da pandemia recente de H1N1 grandes esforços foram realizados no sentido de se obter um diagnóstico rápido, sensível e específico. O uso dos testes antigênicos rápidos e a imunofluorescência mostraram ser menos sensíveis para a detecção do H1N1 pandêmico em comparação com a influenza sazonal e, os resultados obtidos em diferentes grupos de pacientes e locais, divergiram muito. Desta forma, os testes moleculares ganharam espaço rapidamente, em um período curto de tempo, pois apresentavam muitas vantagens, como: alta sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e possibilidade de identificação do subtipo e verificação da carga viral (LANDRY et al., 2011).

Os métodos moleculares tendem a substituir os métodos de detecção do vírus ou de antígenos virais, principalmente para uma detecção rápida de vírus pandêmico, pois são mais sensíveis e específicos. Entretanto, a alta variabilidade genética e antigênica do vírus pode afetar a performance do diagnóstico por qualquer uma das metodologias descritas, sendo necessário uma reavaliação anual do método. Sendo assim, o isolamento do vírus ainda é a metodologia largamente utilizada para monitorar os novos vírus de influenza, para o desenvolvimento das vacinas realizadas pela rede de monitoramento de Influenza da Organização Mundial da Saúde e para o monitoramento do aparecimento de vírus com resistência aos anti-virais específicos (LANDRY et al., 2011; DWYER et al., 2006).

1.8 Prevenção e tratamento

Nas últimas décadas, a imunização anual com vacinas inativadas contra o vírus influenza tem sido a principal medida para a profilaxia da gripe, com a consequente

redução das taxas de morbidade e mortalidade relacionadas à doença (AMBROSCH e FEDSON, 2000). Os tipos de vacina mais utilizadas são as vacinas sub-unitárias, que contém apenas as proteínas de superfície Hemaglutinina e Neuraminidase, e a vacina tipo *split*, composta por vírus inativados pela exposição a detergentes e purificados de forma a conter os antígenos de algumas proteínas do vírus. Os dois tipos de vacina induzem resposta imunológica semelhante (BEYER et al., 1998).

Desde 1977, três cepas virais têm sido utilizadas: duas do *Influenzavirus A*, subtipos H1N1 e H3N2 e uma do *Influenzavirus B* (LEE e CHEN, 2004; ELLIS et al., 2003; WHO, 2009a). A recomendação das cepas do vírus Influenza a serem incluídas na composição da vacina, que será administrada na próxima temporada de gripe, é feita, anualmente, de acordo com os dados coletados ao redor do mundo por um comitê especializado. A eficiência da vacina está intimamente relacionada a similaridade entre as cepas vacinais e as cepas circulante na região (CARRAT e FLAHAULT, 2007).

A recomendação para vacinação de influenza sazonal é que seja administrada em idosos, pessoas com deficiência cardíaca, doença pulmonar e para imunodeprimidos. Para a temporada de 2011, no hemisfério sul, as cepas escolhidas foram: A/California/7/2009 (H1N1) similar antigêncica e geneticamente ao H1N1 pandêmico; A/Perth/16/2009 (H3N2)-like vírus e B/Brisbane/60/2008-like vírus (WHO, 2010g). Devido a baixa circulação do H1N1 sazonal não houve a recomendação de sua utilização na composição da vacina.

Uma nova vacina do contra o influenza A(H5N1) foi desenvolvida pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA). As seqüências da Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA) da variante A/Egypt/2321-NAMRU3/2007, amostra escolhida para ser usada para a confecção da vacina, estão disponíveis para consulta, no GenBank. Estudos sobre as propriedades antigênicas da vacina contra A (H5N1) continuam em andamento e a OMS tem acompanhado a evolução antigênica e genética dos vírus circulantes (WHO, 2009). A SAGE (*The Strategic Advisory Group of Experts*) recomenda a utilização da vacina contra Influenza A(H5N1) para pessoas que podem ter contato com animais infectados durante período interpandêmico e que, se existirem riscos para alguma comunidade, a recomendação dessa vacina deverá ser revisada (WHO, 2011a).

A pandemia de Influenza A(H1N1) ocorrida em 2009/2010 aumentou a corrida para produção de vacinas mais eficazes e mudou o perfil da vacinação contra influenza. Nas Américas, a partir de 16 abril de 2010, 49,4 milhões de doses foram administradas em 22 países da Região (PAHO, 2000).

O processo de produção da atual vacina contra influenza requer monitoramento mundial das variantes. Novas tecnologias visam o desenvolvimento de vacinas que possam ser empregadas para todos os subtipos virais (WANG e PALESE, 2009).. Por exemplo, SUI e colaboradores em 2009, desenvolveram uma vacina utilizando uma proteína purificada que induziu a síntese de anticorpos capazes de reconhecer oito dos 16 tipos de HA, incluindo o H1 e H5 e essa vacia poderia substituir a vacina atual, que requer monitoria constante das cepas circulantes.

Atualmente, são utilizadas duas classes de antivirais que proporcionam uma alternativa para o tratamento e/ou prevenção das infecções causadas pelo Influenza: os *clássicos*, inibidores da Matriz (M2), *Amantadine* e *Rimantadine* e os de *2º geração*, inibidores da Neuraminidase, *Zanamivir* e *Oseltamivir* (COEN e RICHMAN, 2007).

O mecanismo de ação dos inibidores da M2 está relacionado com o bloqueio da entrada de íons que acidificam o endossomo, bloqueando o processo de descapsidação do vírus e, conseqüentemente, sua replicação. Esses canais iônicos são o alvo dos compostos de adamantane, como a *Amantadine* e a *Rimantadine*, que foram as primeiras drogas licenciadas para o tratamento da influenza (BRIGHT et al., 2006) (Figura 9). Esses antivirais tem um espectro de ação restrito, sendo limitados aos vírus Influenza A e podem provocar efeitos colaterais neurológicos e gastrointestinais (CALFEE e HAYDEN, 1998; LAVER et al., 1999; OXFORD e LAMBKIN, 1998).

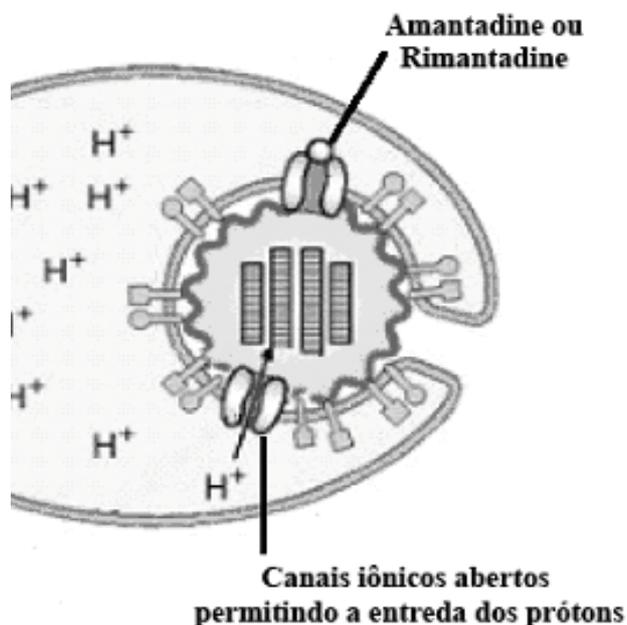


Figura 9 - Modelo de vírus Influenza A e os efeitos da *Amantadina* e *Rimantadina*. Os canais iônicos que permitem a entrada de prótons são bloqueados pela molécula das drogas.

Fonte: FIELDS (2007)

Nos últimos anos, o vírus influenza vem demonstrando uma resistência aos inibidores dos canais M2 em todo o mundo, com um aumento da taxa de resistência de 1,9% para 12,3%, inclusive em países da América do Sul, nos quais os medicamentos não são utilizados rotineiramente (CDC, 2006).

A partir de cepas resistentes a esses antivirais foram identificadas mutações específicas na proteína M2 que conferiam esse fenótipo ao vírus, que incluem: resíduo 26 (Alanina para Fenilalanina – A26F) (BRIGHT et al., 2006), 27 (valina para Alanina – V27A) (HAY, 1985), 31 (Serina para Asparagina - S31N) (TANG et al., 2008) 34 (Glicina para Ácido glutâmico – G34E) e, mais raramente, o sítio 30 (Alanina para Treonina A-T) (SCHMIDTKE et al., 2006). A maioria dos vírus resistentes apresentam a mutação S31N (BRIGHT et al., 2006).

Os antivirais *Zanamivir* e *Oseltamivir* inibem a hidrólise da ligação existente entre o ácido siálico, receptor do vírus influenza na célula, e a molécula da Hemaglutinina

(Figura 10). Esses antivirais apresentam uma excelente atividade contra influenza A e de influenza B (MENDEL e ROBERTS, 1998) porém, são mais eficazes quando é feito um rápido diagnóstico, idealmente nas primeiras 36 horas do início das manifestações da gripe (OXFORD e LAMBKIN, 1998; TREANOR et al., 2000).

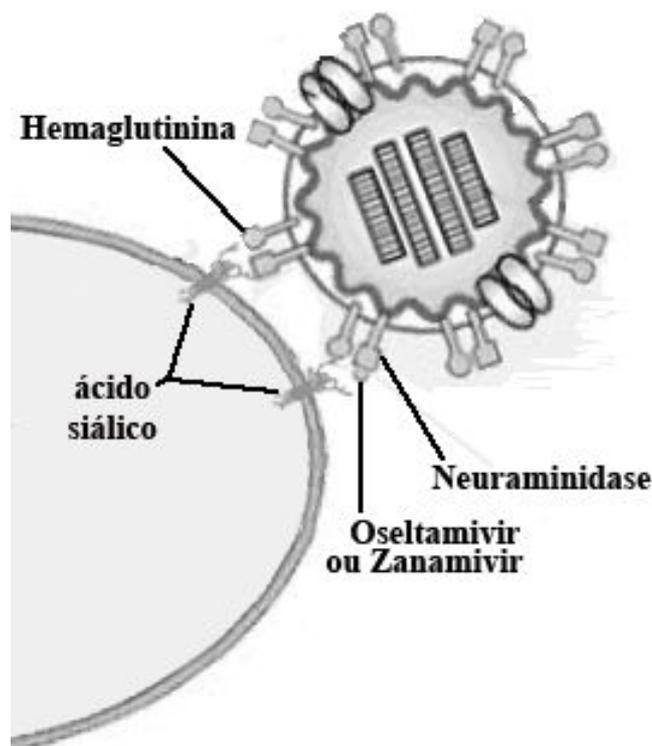


Figura 10 - Modelo de vírus Influenza A e os efeitos do *Zanamivir* e *Oseltamivir*. A molécula dos antivirais impede que a ligação entre a Hemaglutinina e o ácido siálico seja quebrada, pela ação da Neuraminidase.
Fonte: FIELDS (2007)

Essas drogas são eficazes, inclusive para o vírus da gripe aviária do subtipo H5N1, embora um tratamento prolongado e com doses maiores de *Oseltamivir* são necessários para realizar a inibição de tais vírus (YEN et al., 2005). A administração de doses mais elevadas, acima de 2mg/Kg, pode vir a colaborar com o surgimento de variantes com maior resistência (DUTKWSKI, 2010). O vírus Influenza A H1N1 também é sensível ao tratamento pelos inibidores da neuraminidase, embora até o momento, foram relatados um total de 304 casos associados à resistência ao Oseltamivir pela Influenza A (H1N1)

pandêmica. Todos os vírus, à exceção de um, apresentaram a substituição H275Y e todos permaneceram sensíveis ao *Zanamivir* (WHO, 2010f).

Vírus resistentes aos inibidores de Neuraminidase são raros em ensaios clínicos com taxas que variam de 0,4% a 1% na população adulta (MONTTO et al., 2006) e 4% a 8% em crianças (ROBERTS, 2001; WHITLEY et al., 2001). Entretanto, verificou-se em 2008 em Camarões, um aumento no aparecimento de cepas resistentes, chegando a 70% dos isolados de H1N1 circulantes (NJOUOM et al., 2010).

In vivo, diversas mutações foram identificadas em cepas resistentes ao *Oseltamivir* e *Zanamivir*. As substituições nos aminoácidos 292 (Asparagina para Serina - N292S) (KISO et al. 2004), 292 (Arginina para Lisina – R292K) (CARR et al., 2002), 119 (Ácido glutâmico para Valina – E119K) (BAZ et al., 2006), 198 (Ácido aspártico para Asparagina – D198N) (ISON et al., 2006), 294 (Asparagina para Serina – N294S) (KISO et al., 2004) e 274 (Histidina para Tirosina – H274T) (WANG et al., 2002) foram encontradas após tratamento com *Oseltamivir*; e a substituição no aminoácido 152 (Arginina para Lisina – N152K), relatada após o tratamento com o *Zanamivir* (GUBAREVA et al., 1998)

A mutação R152K induz resistência á neuraminidase do Influenza B (GUBAREVA et al., 1998), mas não na Neuraminidase tipo 2 (N2) do influenza A (YEN et al., 2006). Já as mutações H275Y e R371K, típicas do subtipo N1, promovem alto nível de resistência (DUTKOWSKI, 2010).

As principais características dos vírus influenza são a sua alta variabilidade genética e antigênica (principalmente em suas glicoproteínas de superfície Hemaglutinina e Neuraminidase) e o seu genoma segmentado. Os dois tipos de mudanças antigênicas que ocorrem nos vírus influenza são os *drifts*, que se referem a mudanças pontuais ocorridas no decorrer da replicação e os *shifts*, rearranjos entre segmentos de RNA de diferentes vírus. Os dois mecanismos podem gerar novas linhagens capazes de escapar à imunidade prévia da população sendo, portanto, de extrema importância para o surgimento de novas epidemias ou pandemias bem como de linhagens resistentes aos antivirais. Tal característica relaciona-se ao sucesso epidemiológico e insere a influenza na série de doenças emergentes ou re-emergentes.

As principais pandemias que ocorreram na população humana, responsáveis por elevado número de mortes, foram provocadas por *shifts* antigênicos ocorridos entre vírus

humanos e animais. Entretanto, um estudo recente, no qual os genomas completos de *Influenzavirus A*, isolados na cidade de Nova York no decorrer de 10 anos consecutivos foram analisados, sendo verificada a ocorrência não só de *drifts*, mas também de *shifts* entre as cepas circulantes em humanos, tanto em vírus do mesmo subtipo como entre os subtipos diferentes, podendo, inclusive, levar a uma falha vacinal (HOLMES et al., 2005; WOLF et al., 2006). Portanto, a caracterização das cepas circulantes em determinada localidade é de extrema importância tanto para a profilaxia da doença, pela escolha correta das cepas vacinais a serem utilizadas, como para o tratamento, para a verificação dos genótipos envolvidos na resistência aos antivirais e para o entendimento da evolução do vírus.

O presente trabalho tem por objetivo o sequenciamento parcial de cinco genes do *Influenzavirus A*, HA, NA, M, NS e NP e realizar análises que permitam verificar a concordância das cepas circulantes com as cepas vacinais utilizadas nas campanhas nacionais, a presença de mutações relacionadas à resistência aos antivirais e a circulação do vírus em nosso meio.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Caracterizar geneticamente os Vírus Influenza A detectados em crianças menores de cinco anos, atendidas no Hospital Universitário/USP, cidade de São Paulo, no ano de 2006.

Objetivos específicos

- Realizar o sequenciamento parcial dos genes dos vírus Influenza A: Neuraminidase (NA), Matriz (M2), Hemaglutinina (HA), Nucleoproteína (NP) e Proteína Não estrutural (NS)

- Analisar as sequencias obtidas comparando-as com as cepas vacinais recomendadas pela OMS, com amostras detectadas em diversas regiões do mundo e com sequencias de amostras resistentes aos antivirais disponíveis.

- Verificar o possível aparecimento de shifts antigênicos

- Verificar a presença de mutações que possam estar relacionadas com o surgimento de resistência aos antivirais *Amantadine* e *Rimantadine*, inibidores da M2, e ao *Zanamivir* e *Oseltamivir*, inibidores da Neuraminidase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística – Amostras de coleção.

Durante o ano de 2006, foram colhidas 526 amostras clínicas de crianças atendidas na Enfermaria ou na Retaguarda do ambulatório ou na Unidade de Terapia Intensiva (UTI pediátrica e neo-natal) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP) que apresentavam sintomatologia respiratória.

As amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Edison Luiz Durigon do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia, ICB/USP. A colheita foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB/ USP (parecer 808/CEP) (Anexo A) e foi realizada após consentimento dos responsáveis legais, os quais assinaram um Termo de Consentimento Pós-Informado (Anexo B). Os dados sobre o histórico dos pacientes foram colhidos junto aos prontuários médicos (Anexo C).

3.2 Colheita das amostras

Os espécimes clínicos consistiram de *swab* nasal e aspirado de nasofaringe e foram obtidos conforme Myao et al. (1999) e encaminhados, em gelo, para o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (ICB/USP), onde foram tratados com antibióticos (1000 U/mL de penicilina e 1000 µg/mL de estreptomicina) e separadas 4 alíquotas: duas para armazenamento em freezer -70 °C, após adição de meio de congelamento e duas alíquotas contendo 75% de TRIzol[®] LS (*InvitrogenTM*, Carlsbad, Califórnia, EUA) (250 µL da amostra e 750 µL de TRIzol[®] LS) para diagnóstico molecular. Neste estudo foi utilizada a alíquota estocada com 75% de TRIzol[®] LS e a partir dela foi realizada a extração do RNA total.

3.3. Fluxograma de trabalho

A figura 11 mostra o esquema do trabalho desenvolvido a partir da amostra clínica durante o ano de 2006.

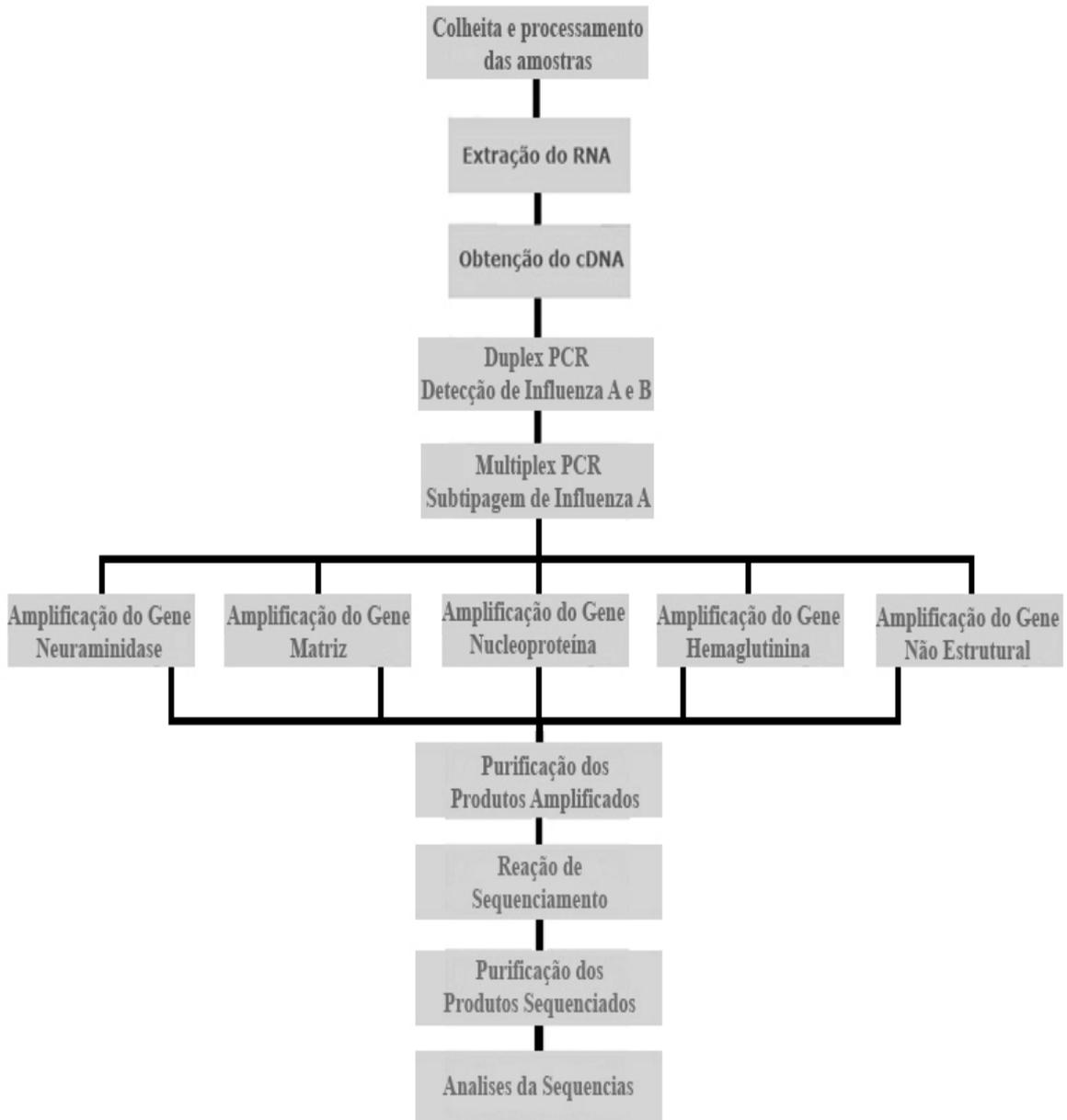


Figura 11 - Fluxograma de trabalho a partir do material clínico colhido no Hospital Universitário (HU) no ano de 2006.

3.4 Detecção dos Vírus Influenza A e B pela Duplex-RT-PCR

3.4.1 Extração do RNA

O RNA total foi extraído utilizando-se Trizol LS (InvitrogenTM). A 1 mL da amostra armazenada em Trizol foram acrescidos 100 µL de clorofórmio (Merck[®]) gelado. Foi utilizada durante o processo de extração a centrífuga refrigerada (*Eppendorf* – modelo 5804R, rotor F-34-6-38/ ângulo fixo). As amostras foram homogeneizadas durante 15 segundos e deixadas em gelo por 5 minutos. Após esse período, foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo acrescido de isopropanol 100% (Merk[®]), gelado, volume a volume. Os novos tubos foram homogeneizados e incubados em gelo por 15 minutos. Após esse período, foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 800 µL de etanol a 75% gelado. As amostras foram homogeneizadas no vórtex e centrifugadas a 8.225 rpm a 4 °C por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram secos em temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensionado em 50 µL de água ultra PURE (InvitrogenTM) e o RNA extraído armazenado a – 70 °C. Em todas as extrações, um controle negativo, composto de 250 µL de água destilada livre de DNase e RNase – água Ultra Pure (InvitrogenTM) e 3 controles positivos, que consistiam de 2 isolados de *Influenzavirus A* (H1N1 e H3N2) e uma de *Influenzavirus B*, isoladas no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP amostras virais padrão foram extraídos concomitantemente.

3.4.1.1 Padrões virais

Amostras de vírus Influenza, A/Brazil/125/2001 (H3N2), A/Brazil/133/2001 (H1N1) e B/Brazil/017/2000, anteriormente isoladas e identificadas pelo Laboratório de Virologia Clínica Molecular - ICBII/USP foram utilizadas como controle positivo para detecção e subtipagem.

Para propagação dos vírus padrão, foram utilizadas células da linhagem celular MDCK (Madin Darby Canine Kidney), gentilmente cedida pelo Dr. Larry J. Anderson, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Center of Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta, GA-USA.

As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (Corning) com Meio de crescimento, constituído de Meio mínimo Essencial Eagle (MEN) adicionando-se 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab). O crescimento foi realizado em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e as células foram repicadas com auxílio de solução de Tripsina-EDTA (0,25% de Tripsina 1250 (Sigma) e 0,02% de EDTA (Gibco-BRL), com um período de até 6 dias entre um repique e outro. As células foram crescidas até alcançarem 70 - 80% de confluência.

A infecção foi realizada após a retirada do meio de crescimento, seguido da adição de 1 mL de solução Tripsina (Sigma[®] - 4 µg/mL) e da inoculação de 200 µL da amostra (previamente tratadas com antibióticos e antifúngicos por 60 minutos a 4 °C) por garrafa. Após incubação a 37 °C por 30 minutos foram adicionados 10 mL de meio de manutenção (Meio MEN com adição de 2% de soro fetal bovino - Cultilab). Após o aparecimento do efeito citopático, as células foram colhidas com auxílio de um *scraper*, homogeneizadas com o meio de manutenção, aliquotadas após adição de Trizol LS, na proporção 1:3 e congeladas a - 70 °C.

3.4.2 Obtenção do cDNA

O cDNA foi obtido utilizando o kit Comercial *High Capacity cDNA Aquiver* (Applied Biosystems, Inc., EUA), seguindo a orientação do fabricante, para obtenção de um volume final de 100 µL de reação. Resumindo, em um microtubo de 0,2 mL foram adicionados 10 µL de tampão de RT (10x) (20 mM Tris-HCL [pH8,0]; 50 mM KCl; 0,5 mM EDTA; 8 mM DTT; 50% (v/v) glicerol), 2,5 mM de cada dNTPs, 200 U da enzima transcriptase reversa, 40 U de *RNAseOUT* (*Invitrogen*TM) (inibidor de RNAse), 10 µL de *Random primer* (10x) ou o *primer* específico Uni 12 – 5' AGCAAAAGCAGG – 3' (HOFFMANN et al., 2001) e água ultra PURE (*Invitrogen*TM) para completar o volume de

50 µL de amostra. A reação foi colocada em termociclador GeneAmpPCR system 9700 (Applied Biosystems, Inc., EUA) com pré-aquecimento de 25 °C por 10 minutos, seguido de 37 °C por 120 minutos. O cDNA foi estocado em freezer -20 °C.

O cDNA dos controles positivos e negativos foram sintetizados concomitantemente em cada reação realizada.

3.4.3 Duplex RT-PCR

A triagem das amostras foi realizada pela Duplex-RT-PCR com utilização dos *primers* complementares ao gene NS1 dos vírus de influenza A e B, seguindo a metodologia descrita por Class et al. (1992), modificada por Vedovello (2006). A localização de cada *primer* no genoma viral, a polaridade e a sequência 5'–3' estão representados na Tabela 2 e na Figura 12.

Tabela 2 - Relação dos *primers* utilizados para a DUPLEX-RT-PCR, sua polaridade, sequência 5' – 3', localização no genoma viral e tamanho do produto amplificado.

Primer	Polaridade	Seqüência de nucleotídeos / 5' – 3'	Localização gene NS	Produto Amplificado
Rev A	<i>Anti Sense</i>	CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC	602-621	190pb
Fow A	<i>Sense</i>	AAG GGC TTT CAC CGA AGA GG	392-412	
Rev B	<i>Anti Sense</i>	TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG	986-967	241p
<i>Fow B</i>	<i>Sense</i>	ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC	746-755	

A Duplex-RT-PCR foi realizada diluindo 2,5 µL do cDNA em Tampão de Reação (Tris HCL a 75mM pH 9.0, MgCl₂ a 2mM, KCL 50mM, (NH₄)₂SO₄ 20mM) acrescido de 2,5 mM de Mg⁺²; 0,4 mM de dNPTs; 10 pmol de cada um dos quatro *primers* e 1U de enzima Taq Polimerase (Biotools) para um volume final de 25 µL de reação. O ciclo de amplificação consistiu em um pré-aquecimento a 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos,

cada um deles composto de 1 minuto a 94 °C para denaturação do DNA molde, 1 minuto a 54 °C para a hibridização dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para a extensão das novas cadeias. Findos os ciclos seguiu-se um aquecimento a 72 °C por 10 minutos para extensão final.

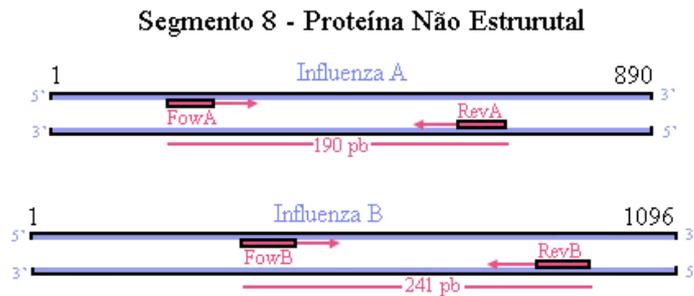


Figura 12 - Esquema do emparelhamento da fita alvo, gene codificador da Proteína Não Estrutural dos vírus Influenza A e B, com os *primers* utilizados na Duplex-RT-PCR. A fita alvo está indicada na cor azul e o tamanho dos genes (número de nucleotídeos) indicado acima das fitas. Os quadrados rosa indicam os primers, as setas os sentidos dos mesmos (*sense* e *anti sense*). O tamanho esperado do *amplicon* e o nome dos *primers* estão indicados na parte inferior da fita alvo.

3.5 Subtipagem dos vírus de Influenza A por Multiplex- RT-PCR

As amostras positivas para o vírus Influenza A foram subtipadas por Multiplex-PCR, utilizando-se *primers* para os genes que codificam as proteínas HA (H1, H3) e NA (N1 e N2), descritos por Poddar et al. (2002) e modificados por Vedovello (2006) com base em seqüências de cada um dos subtipos, isoladas e publicadas no *GenBank* (Tabela 3, Figura 13).

Tabela 3 - Relação de *primers* utilizados na Subtipagem dos Vírus Influenza A, sua polaridade, sequência de nucleotídeos (5'-3'), sua localização no genoma viral e o tamanho do produto amplificado.

Primer	Polaridade	Seqüência de nucleotídeos 5' - 3'	Região	Produto Amplificado
H1Fow	Sense	AAT TTG CTA TGG CTG ACG GG	HA 490 – 509	165pb
H1Rev	Anti-Sense	CTA CAG AGA CAT AAG CAT TTT C	HA 655 - 635	
H3 Fow	Sense	GCA AAG CCT ACA GCA ACT GTT	HA 272 - 292	231pb
H3 Rev	Anti-Sense	GCA TAG TCA CGT TCA ATG CTG	HA 503 - 485	
N1Fow	Sense	ACC ATA ATG ACC GAT GGC CC	NA 730 – 749	427pb
N1Rev	Anti-Sense	TCT GTC CAT CCA TTA GGA TCC	NA 1157-1137	
N2 Fow	Sense	AGC ACA CAT AAC TGG AAA CAT TG	NA 796 - 818	176pb
N2 Rev	Anti-Sense	GGA AAA TCG TTC ATA TTA GCA CA	NA 972 - 953	

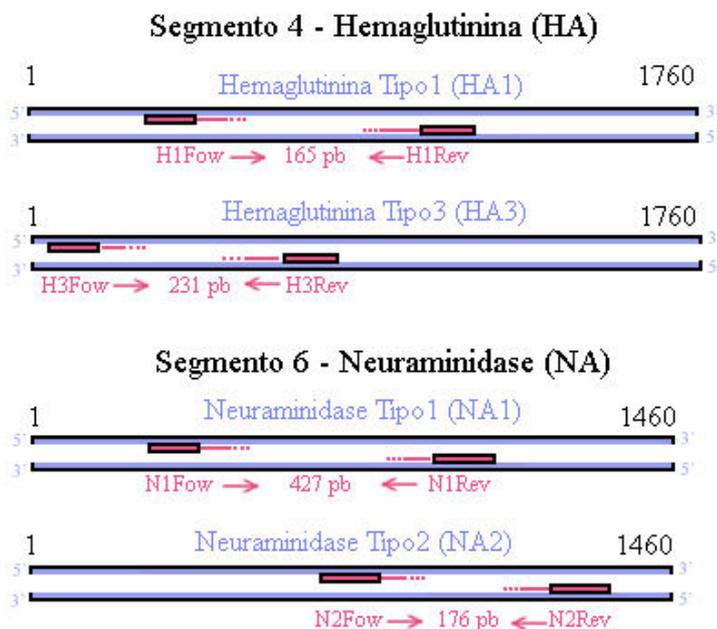


Figura 13 - Esquema do emparelhamento da fita alvo, genes codificadores da Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA) dos vírus Influenza A e B, com os *primers* utilizados na Multiplex-PCR. A fita alvo está indicada na cor azul e o tamanho dos genes (número de nucleotídeos) indicado acima das fitas. Os quadrados em cor rosa indicam os primers, as setas e o sentido dos mesmos (*sense* e *anti sense*). O tamanho esperado do *amplicon* e o nome dos *primers* estão indicados na parte inferior da fita alvo

A reação utilizada na subtipagem dos vírus Influenza A consistiu de 5 pmol de cada um dos *primers* dos gene H1 e N1, 10 pmol de cada um dos *primers* para os genes H3 e N2, 0,4 mM de dNTP, 1U de enzima Taq DNA Polimerase (Biotools), 2,5 μ L de tampão da enzima (Tris HCL a 75mM pH 9,0, CL a 50mM e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 20mM), acrescido de MgCl_2 a 3 mM e água ultra PURE (*Invitrogen*TM), para volume final de 25 μ L de reação.

As amostras foram colocadas em Termociclador – *GeneAmpPCR System 9700* – a 92 °C por minutos 5 minutos, seguido de 35 ciclos compostos de 1 minuto a 92 °C para denaturação, 1 minuto a 58 °C (rampa de -1 °C/segundo) para hibridização e 1 minuto a 72 °C para extensão das cadeias, encerrando a reação em 10 minutos a 72 °C para extensão final. A reação foi mantida a 4 °C.

3.6 Amplificação dos genes da HA, NA, NP, NS e M, dos Vírus Influenza A

A amplificação dos genes que codificam as proteínas da HA, NA, NP, NS e M, foi realizada seguindo diferentes estratégias, descritas nos itens 3.6.1 a 3.6.6. Para as reações foram utilizados primers descritos por Hoffman et al. (2001), e/ou primers desenhados com auxílio do programa IDT *-primerdesign*—<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as seqüências dos respectivos genes de cepas publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2) (Nº. de acesso GenBank (FJ445087.1 e CY023009.1, respectivamente). Ou ainda *primers* gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Schutten da *Erasmus Medical Center, Department of Virology, Rotterdam, Netherlands*.

3.6.1. Amplificação do gene da Neuraminidase

A amplificação do gene da Neuraminidase foi realizada conforme descrito por Sacramento, 2010. A estratégia envolveu uma primeira amplificação utilizando os *primers* NaF e NaR, descritos por Hoffman et al. (2001), que visava a amplificação do gene inteiro, seguido de *Nested-PCR* ou *Semi-Nested PCR* utilizando os primers descritos por Sacramento, 2010. A relação dos *primers*, sua polaridade, sequência 5' – 3' e o tamanho do produto amplificado estão descritos na tabela 4.

Para a primeira amplificação do gene da neuraminidase, subtipo N1, a reação consistiu de 5 µL de cDNA diluído em tampão de reação (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,4 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada *primer* e 1,25 U de *Taq DNA Polymerase (Biotools)* para um volume final de 50 µL.

Para a primeira amplificação do gene da neuraminidase, subtipo N2, a reação consistiu de 5 µL de cDNA diluído em tampão de reação (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,4 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada *primer* e 1,25 U de *Taq DNA Polymerase (Biotools)* para um volume final de 50 µL.

A amplificação, para ambos os subtipos, foi realizada em termociclador *GeneAmpPCR System 9700*, a 94 °C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 1

minuto a 94 °C para desnaturação, 1 minuto a 50 °C para hibridização dos *primers* e 5 minutos a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final obtida a 72 °C por 10 minutos.

Após a primeira amplificação, foram realizadas reações de *Nested ou Semi nested PCR*, utilizando os primers descritos por SACRAMENTO (2010). Para a amplificação do gene da neuraminidase do subtipo N1, foram utilizados os primers NA1F e NA1R1-1 (gerando um produto de 978 pb) e NA1F4-2 NA1R (699 pb) e, alternativamente, nos casos nos quais não foi possível amplificar algum dos fragmentos, os primers NA1F e NA1R1-2, NA1F2 e NA1R2, NA1F3 e NA1R3, NA1F4-1 e NA1R, que geraram produtos de 478 pb, 727 pb, 467 pb e 451 pb, respectivamente (Tabela 4, Figura 14)

As reações de *Nested ou Semi nested PCR* para a amplificação do gene da neuraminidase N2 foram realizadas utilizando os primers NA2F e NA2R1-1, gerando um produto de 983 pb e NA2F4-2 e NA2R, gerando um produto de 746 pb, e alternativamente, nos casos nos quais não foi possível amplificar algum dos fragmentos, os *primers* NA2F e NA2R1-2, NA2F2 e NA2R2, NA2F3 e NA2R3 e NA2F4-1 e NA2R, que geraram produtos de 781 pb, 732 pb, 518 pb e 459 pb, respectivamente (Tabela 4, Figura 15).

As reações, para ambos os subtipos, foram realizadas utilizando 1 µL dos produtos da primeira PCR diluído em tampão de reação (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,4 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 10 pmol de *primers* e 1,0 U de *Taq DNA Polymerase (Biotools)* para um volume final de 25 µL. A amplificação foi feita em termociclador *GeneAmpPCR System 9700*, a 94 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos compostos de 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 1 minuto a 54 °C para hibridização dos *primers* e 4 minutos a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final obtida a 72 °C por 7 minutos.

Tabela 4 - Relação de *primers* utilizados na Amplificação do gene da Neuraminidase do vírus Influenza A, polaridade, sequência 5' – 3' e o tamanho do produto amplificado

Primer Sense	Sequencia 5' - 3'	Primer Anti-Sense	Sequencia 5' - 3'	Produto amplificado
Neuraminidase N1 – 6º Segmento				
NA1F	AGTCAAAAGCAGGAGTTTA	NA1R1-1	CTATTTGATAATCCAGGT	978pb
	AGTCAAAAGCAGGAGTTTA	NA1R1-2	GTCCCATTTGAATGTTTG	478pb
NA1F2	AAAGGACAAAACCTCAGT	NA1R2	CTATTTGATAATCCAGGT	727pb
NA1F3	TAATGGGGCCGCCTCGTA	NA1R3	TCAGTTATTGCCACAACA	467pb
NA1F4-1	ATGGAGAGGGCAGCTGTA	NA1R	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTI	451pb
NA1F4-2	TAATGGGGCCGCCTCGTA		AGTAGAAACAAGGAGTTTTTI	699pb
Neuraminidase N2 – 6º Segmento				
NA2F	AGTCAAAAGCAGGAGTTTA	NA2R1-1	ACATAACTGGAAACAATGCT	983pb
	AGTCAAAAGCAGGAGTTTA	NA2R1-2	GTACTGTGTCATTTGAAT	481pb
NA2F2	AATATGCCCCAAACTAGC	NA2R2	ACATAACTGGAAACAATGCT	732pb
NA2F3	GTCGGAATGCGTTTGTAT	NA2R3	TKTCAACTATGACTTGCC	518pb
NA2F4-1	AAAAACGACAGCTCCAGC	NA2R	AGTAGAAACAAGGAGTTTTTI	459pb
NA2F4-2	GTCGGAATGCGTTTGTAT		AGTAGAAACAAGGAGTTTTTI	746pb

Em negrito: *Primers* descritos por Hoffman et al. (2001); demais *primers* descritos por Sacramento (2010)

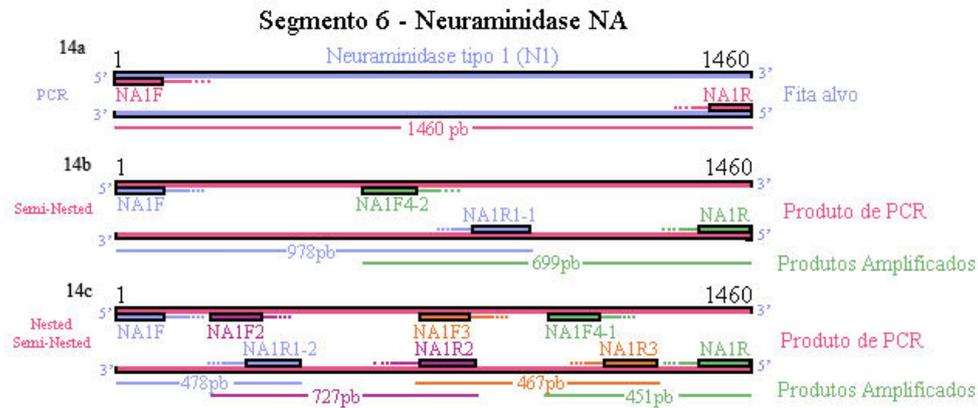


Figura 14 - Esquema dos *primers* utilizados na PCR e *Semi-nested/Nested* PCR para amplificação do gene da NA, subtipo N1. As fitas alvos estão indicadas nas cores azul ou rosa e os quadrados coloridos indicam os *primers*, sua localização e emparelhamento com as fitas alvo. Figura 14a - PCR - fita alvo (em azul), na parte superior está indicado o subtipo da NA e o tamanho do gene (número de nucleotídeos). Os *primers* NA1F e NA1R estão indicados em cor rosa e o tamanho esperado do amplicon está representado na parte inferior da fita alvo. Figura 14b - Primeiro esquema de *Semi-nested-PCR*: fita alvo (produto da PCR) identificada em cor rosa: os *primers* NA1F e NA1R1-1, em azul e os *primers* NA1F4-2 e NA1R1 em verde. Figura 14c - Segundo esquema de *Nested* ou *semi-Nested*, utilizado como alternativa. Em rosa está representada a fita alvo e os *primers* NA1RF e NA1R1-2, na cor azul, os *primers* NA1F2 e NA1R2 na cor roxa, os *primers* NA1F3 e NA1R3 na cor laranja e os *primers* NA1F4-1 e NA1R em verde. O tamanho esperado dos *amplicons* estão indicados na parte inferior de cada fita alvo, nas mesmas cores que seus respectivos pares de *primers*.

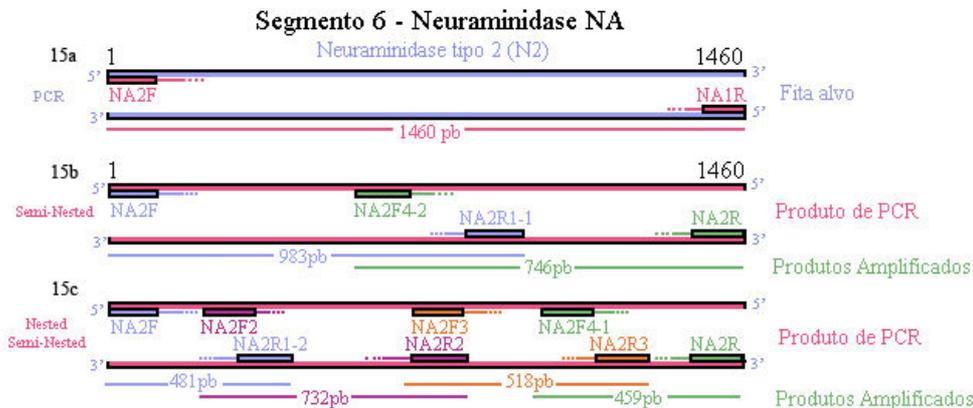


Figura 15 - Esquema dos *primers* utilizados na PCR e *Semi-nested/Nested* PCR para amplificação do gene da NA, subtipo N2. As fitas alvo estão indicadas nas cores azul ou rosa e os quadrados coloridos indicam os *primers*, sua localização e emparelhamento com as fitas alvo. Figura 15a - PCR - fita alvo (em azul), na parte superior está indicado o subtipo da NA e o tamanho do gene (número de nucleotídeos). Os quadrados coloridos indicam os *primers*, sua localização e emparelhamento com as fitas alvo. O tamanho esperado do amplicon está representado na parte inferior da fita alvo. Figura 15b - Primeiro esquema de *Semi-nested-PCR*: fita alvo (produto da PCR) identificada em cor rosa: *primers* NA2F e NA2R1-1, em azul e *primers* NA2F4-2 e NA2R, em verde. Figura 15c - Segundo esquema de *Nested* ou *semi-Nested*, utilizado como alternativa. Em rosa está representada a fita alvo e os *primers* NA2F e NA2R1-2, na cor azul, os *primers* NA2F2 e NA2R2 na cor roxa, os *primers* NA2F3 e NA2R3 na cor laranja e os *primers* NA2F4-1 e NA2R em verde. O tamanho esperado dos *amplicons* estão indicados na parte inferior de cada fita alvo, nas mesmas cores que seus respectivos pares de *primers*.

3.6.2 Amplificação do gene da Matriz

Para a amplificação do gene da Matriz foram realizadas duas PCR por amostra, utilizando os primers MF e MR1, gerando um produto de 674 pb e MF2 e MR, gerando um produto de 536 pb. Os primers foram desenhados com auxílio do programa *IDT-primer design* – <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as seqüências dos respectivos genes de cepas publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2) (Nº. de acesso GenBank FJ445087.1 e CY023009.1, respectivamente). A descrição dos primers, sua polaridade, sequencia 5' – 3' e o tamanho do produto amplificado estão descritos na Tabela 5 e figura 16.

A reação consistiu de 2,5 µL ou 5 µL cDNA diluído em tampão de reação (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,2 mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 15 pmol de cada *primer* e 1 U de *Taq DNA Polymerase (Biotools)* para um volume final de 25 µL. A amplificação foi feita em termociclador *GeneAmpPCR System 9700*, a 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 52 °C para hibridização dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final obtida a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 5 - Relação de *primers* utilizados na Amplificação do gene da Matriz do vírus Influenza A, sua polaridade, sequencia 5' - 3' e o tamanho do produto amplificado

Primer	Sequencia 5' - 3'	Primer	Sequencia 5' - 3'	Produto amplificado
Sense		Anti-Sense		
Matriz M – 7º Segmento				
MF	TATTCGTCTCAGGGAGC	MR2	GAC TCC CAG CAC AGG	674pb
	AAAAGCAGGTAG		TCT CAT AGG	
MF2	AGA GCC ATT GGG ACT CAT	MR	ATATCGTCTCGTATTA	536pb
	CCT AGC		GTAGAAACAAGGTAG	
			TTTTT	

Em negrito: *Primers* descritos por Hoffman et al. (2001) e demais primers desenhados com auxílio do programa *IDT-primer design* – <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as seqüências dos respectivos genes de cepas publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2).

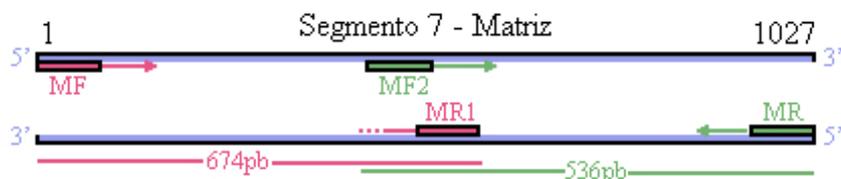


Figura 16 - Esquema dos *primers* utilizados nas duas PCRs para amplificação do gene da Matriz. A fita alvo está indicada na cor azul. A identificação do gene, número do segmento e tamanho (em número de nucleotídeos) estão indicadas na parte superior da fita. Os quadrados coloridos indicam a localização dos primers e o seu emparelhamento com as fitas alvo. As setas coloridas indicam a sua polaridade. Na cor rosa estão indicados os *primers* MF e MR1 e NSF e NSR1 e na cor verde os *primers* MF2 e MR2 e NSF2 e NSR2. O tamanho esperado do *amplicon* está indicado na parte inferior de cada fita alvo, nas mesmas cores que seus respectivos pares de *primers*.

3.6.3. Amplificação do Gene da Hemaglutinina HA

A estratégia de amplificação do gene da HA envolveu uma primeira amplificação, PCR, utilizando os *primers* HaF e HaR, descritos por Hoffman et al. (2001), que visava a amplificação do gene inteiro, seguido de *Nested-PCR* ou *Semi-Nested PCR*, utilizando primers desenhados com auxílio do programa IDT-*primerdesign*—<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as seqüências dos respectivos genes de cepas publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2) (Nº. de acesso *GenBank*: FJ445087.1 e CY023009.1, respectivamente). A descrição dos primers, sua polaridade, sequencia 5' – 3' e o tamanho do produto amplificado estão descritos na Tabela 6 e figuras 17 e 18.

A PCR consistiu de 5 µL de cDNA diluídos em tampão de reação (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,4 mM de dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada *primer* e 1, 25 U de *Taq DNA Polymerase* (*Biotools*) para um volume final de 50 µL.

A amplificação foi feita em termociclador *GeneAmpPCR System 9700*, a 94 °C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 1 minuto

a 50 °C para hibridização dos *primers* e 5 minutos a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final obtida a 72 °C por 10 minutos.

Após a primeira amplificação, os produtos da PCR foram submetidos a *Nested*-PCR ou *Semi-Nested*-PCR para amplificação dos genes da hemaglutinina, subtipos H1 e H3, utilizando os *primers* específicos, seguido os esquemas descritos nas figuras 15 e 16.

A *Semi-Nested* PCR, para amplificação do gene HA, subtipo H1, foi realizada, inicialmente com os primers HA1F e HA1R1, gerando um produto de 1040 pb, e primers HA1F4 e HA1R, gerando um produto de 739 pb Alternativamente, nos casos nos quais não foi possível amplificar algum dos fragmentos foram realizadas reações de *Nested* ou *Semi-Nested PCR*, utilizando os primers HA1F3 e HA1R3 (produto de 403 pb), HA1F2 e HA1R2 (produto de 1016 pb) (figura 13).

A *Semi-Nested* PCR, para amplificação do gene HA, subtipo H3, foi realizada, inicialmente com os primers HA3F e HA3R1, gerando um produto de 1056 pb, e primers HA3F4 e HA3R, gerando um produto de 723 pb. Nos casos nos quais não foi possível amplificar algum dos fragmentos foram realizadas reações de *Nested* ou *Semi-Nested PCR*, utilizando os primers HA3F3 e HA3R3 (produto de 841 pb), HA3F2 e HA3R2 (produto de 709 pb) (figura 14).

A reação, para ambos os subtipos, consistiu de 2,5 µL do produto de PCR, 5,0 µL do tampão de reação (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,2 mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada *primer* e 1,25 U de *Taq* DNA *Polymerase* (*Biotoools*) para um volume final de 50 µL. A amplificação foi feita em termociclador *GeneAmpPCR System 9700*, a 94 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos compostos de 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 1 minuto a 54 °C para hibridização dos *primers* e 4 minutos a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final obtida a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 6 - Relação de *primers* utilizados na Amplificação do gene Hemaglutinina do vírus Influenza A, polaridade, sequência 5' – 3' e o tamanho do produto amplificado

Primer	Sequencia 5' - 3'	Primer	Sequencia 5' - 3'	Produto
Sense		Anti-Sense		amplificado
Hemaglutinina H1 – 4º Segmento				
HA1F	AGCAAAAGCAGGGGAT ou AGCAAAAGCAGGGGAAAAT	HA1R1	CTTAGTCCTGTAACCATCCT	1040pb
HA1F2	CATACGCAGACACAATATGT	HA1R2	AAACCGGCAATGGCTCCAAA	1016pb
HA1F3	CACCCCAGAAATAGCCAAAA	HA1R3	AAACCGGCAATGGCTCCAAA	403pb
HA1F4	AGGATGGTTACAGGACTAAG	HA1R	AGTAGAAACAAGGGTGTTTT	739pb
Hemaglutinina H3 – 4º Segmento				
HA3F	AGCAAAAGCAGGGGATAAT	HA3R1	GTTTCTCTGGTACATTTTCGC	1056pb
HA3F2	CAGCAAAGCYTACAGCAACTGT	HA3R2	GCTTCCATTTGGAGTGATGC	709pb
HA3F3	GCATCACTCCAAATGGAAGC	HA3R3	AGTAGAAACAAGGGTGTTTT	841pb
HA3F4	GCGGAATGTACCAGAGAAAC	HA3R	AGTAGAAACAAGGGTGTTTT	723pb

Em negrito: *Primers* descritos por Hoffman et al. (2001) e demais primers desenhados com auxílio do programa IDT-*primerdesign*– <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as seqüências dos respectivos genes de cepas publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2).

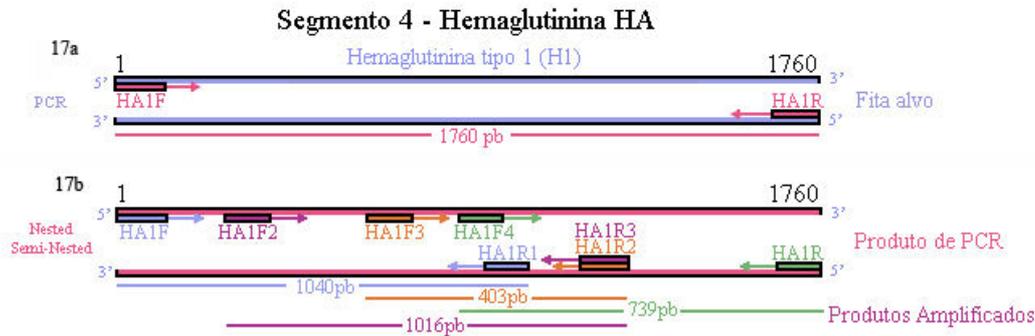


Figura 17 - Esquema dos *primers* utilizados na PCR e *Semi-nested/Nested* PCR para amplificação do gene da HA, subtipo H1. As fitas alvo estão indicadas nas cores azul ou rosa e os quadrados coloridos indicam os *primers*, sua localização e emparelhamento com as fitas alvo. Figura 15a - PCR - fita alvo (em azul), na parte superior está indicado o subtipo da HA e o tamanho do gene (número de nucleotídeos). Os *primers* HA1F e HA1R estão indicados em rosa e o tamanho esperado do *amplicon* está indicado na parte inferior. Figura 15b - *Nested-PCR* ou *Semi-Nested* PCR - a fita alvo (produto de PCR) está identificado em cor rosa, e os *primers* HA1F e HA1R1, em azul, *primers* HA1F2 e HA1R2 (em roxo), os *primers* HA1F3 e HA1R3 (em laranja) e os *primers* HA1F4 e HA1R, identificados na cor verde. Os tamanhos esperados dos *amplicons* estão indicados na parte inferior de cada fita alvo, nas mesmas cores que seus respectivos pares de *primers*.

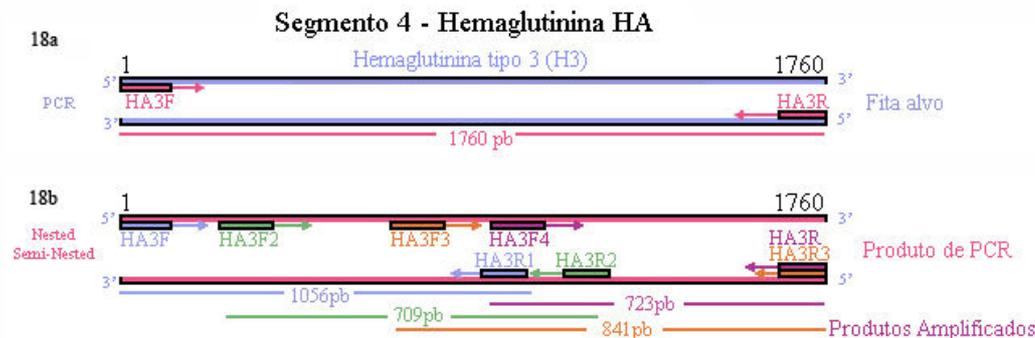


Figura 18 - Esquema dos *primers* utilizados na PCR e *Semi-nested/Nested* PCR para amplificação do gene da HA, subtipo H3. As fitas alvo estão indicadas nas cores azul ou rosa e os quadrados coloridos indicam os *primers*, sua localização e emparelhamento com as fitas alvo. Figura 16a - PCR - fita alvo (em azul), na parte superior está indicado o subtipo da HA e o tamanho do gene (número de nucleotídeos). Os *primers* HA3F e HA3R estão indicados em rosa e o tamanho esperado do *amplicon* está indicado na parte inferior. Figura 16b - *Semi-Nested-PCR/Nested-PCR* - fita alvo (produto da primeira PCR) está identificada em cor rosa, os *primers* HA3F e HA3R1 (em azul) os *primers* HA3F2 e HA3R2 (em roxo), HA3F3 e HA3R3 (em laranja) e HA3F4 e HA3R (em verde). Os tamanhos esperados dos *amplicons* estão indicados na parte inferior de cada fita alvo, nas mesmas cores que seus respectivos pares de *primers*.

3.6.4 Amplificação dos genes da Neuraminidase, Hemaglutinina e Matriz utilizando diferentes *primers*

Para a amplificação dos três genes, HA, NA e M, também foram utilizados os primers: Hafwd + HA2, HA3 + HA4, HA5 + HA6, HA7 + HArev para hemaglutinina; Nafwd + NA2, NA3 + NA4, NA5 + NA6, NA7 + NAreve para a neuraminidase e M2fwd + M22, M2.3 + M2rev para a Matriz, gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Schutten da *Erasmus Medical Center, Department of Virology, Rotterdam, Netherlands*

As reações de amplificações dos 3 genes foram realizadas separadamente, seguindo o seguinte protocolo: foi preparado um Mix com volume de 40 µL contendo 5 µL de tampão da reação [20 mM de Tris-HCl [pH 8.4] / 50 mM de KCl / 2 mM de MgCl₂], 1 µL de dNTP [20mM], 1 U de Taq DNA Polymerase (Biotools B & M Labs, S.A.) e 33 µL de água ultra PURE (GibcoTM). A esse mix foram adicionados 2 µL de *mix de primers* [20 pmol de cada] e 8 µL de cDNA, obtendo-se um volume final de 50 µl por reação. As amostras foram amplificadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems Inc., EUA*), a partir de uma etapa a 95 °C por 15 min, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 15 segundos para desnaturação das fitas; 55 °C por 30 segundos para a hibridização dos *primers*; 72 °C por 45 segundos para extensão e uma etapa final de 72 °C por 7 min para completar a extensão. Portanto, cada amostra foi submetida a 10 diferentes PCRs, 4 para amplificação da HA, 4 para a NA e 2 para a M.

3.6.5 Amplificação do Gene da Nucleoproteína (NP)

A amplificação do gene da NP foi realizada em três PCRs distintas utilizando os *primers* NPF e NPR1, NPF2 e NPR2 e NPF3 e NPR, que geraram produtos de 726 pb, 736 pb e 490 pb, respectivamente. Os primers foram desenhados com auxílio do programa *IDT-primerdesign*– <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as seqüências dos respectivos genes de cepas publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2) (Nº. de acesso GenBank

(FJ445087.1 e CY023009.1, respectivamente). A descrição dos primers, sua polaridade, sequência 5' – 3', sua localização no genoma e o tamanho do produto amplificado estão descritos na Tabela 7 e figura 19.

Cada uma das reações foi realizada partindo-se de 2,5 µL ou 5 µL cDNA diluído em tampão de reação (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,2 mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 15 pmol de cada *primer* e 1 U de *Taq DNA Polymerase* (*Biotoools*) para um volume final de 25 µL. A amplificação foi feita em termociclador *GeneAmpPCR System 9700*, a 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 52 °C para hibridização dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final obtida a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 7 - Relação de *primers* utilizados na Amplificação do gene da Nucleoproteína do vírus Influenza A, sua polaridade, sequência 5' – 3' e o tamanho do produto amplificado

Primer	Sequencia 5' - 3'	Primer	Sequencia 5' - 3'	Produto amplificado
Sense		Anti-Sense		
Nucleoproteína NP – 5º Segmento				
NPF	ATATCGTCTCAGGGAGCAA AAGCAAAAGCAGGGTA	NPR1	AGGAAAATTTCAAACAGCTGCAC A	726pb
NPF2	CAGAGGACAAGAGCTCTTGT TCG	NPR2	AACACTAATCAACAAAGGGC AACACTAATCAACAGAGGGC	736pb
NPF3	TTAAGCTTCATCAGAGGTCA AGCTTCATCAGAGG	NPR	ATATCGTCTCGTATTCGTAGA AACAAAGGGTATTTTT	490pb

Em negrito: *Primers* descritos por Hoffman et al. (2001) e demais primers desenhados com auxílio do programa *IDT-primer design* – <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as seqüências dos respectivos genes de cepas publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2).

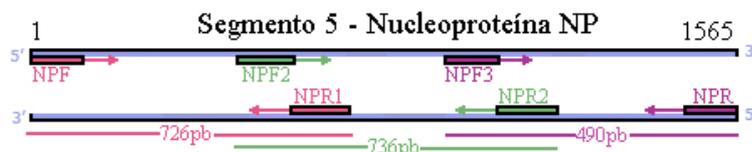


Figura 19 - Esquema dos primers utilizados na PCR para amplificar o gene da Nucleoproteína. A fita alvo está indicada na cor azul. A identificação do gene, número do segmento e tamanho (em número de nucleotídeos) estão indicadas na parte superior de cada fita. Os quadrados coloridos indicam os primers sua localização e o seu emparelhamento com as fitas alvo. As setas coloridas indicam a sua polaridade. Na cor rosa estão indicados os *primers* NPF e NPR1, na cor verde os *primers* NPF2 e NPR2 e na cor roxa os *primers* NPF3 e NPR. O tamanho esperado do *amplicon* está indicado na parte inferior de cada fita alvo, nas mesmas cores que seus respectivos pares de *primers*.

3.6.6 Amplificação do Gene da Proteína Não Estrutural (NS)

A amplificação do gene da Proteína Não Estrutural foi realizada em duas PCRs distintas, com a utilização dos primers NSF e NSR1 e NSF2 e NSR que geraram produtos de 528 pb e 451 pb, respectivamente. Os primers foram desenhados com auxílio do programa *IDT-primerdesign* – <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as seqüências dos respectivos genes de cepas publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2) (Nº. de acesso GenBank FJ445087.1 e CY023009.1, respectivamente). A descrição dos primers, sua polaridade, sequencia 5' – 3' e o tamanho do produto amplificado estão descritos na Tabela 8 e figura 20.

Cada uma das reações foi realizada partindo-se de 2,5 µL ou 5 µL cDNA diluído em tampão de reação (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,2 mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 15 pmol de cada *primer* e 1 U de *Taq DNA Polymerase* (*Biotoools*) para um volume final de 25 µL.

A amplificação foi feita em termociclador *GeneAmpPCR System 9700*, a 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 52 °C para hibridização dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final obtida a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 8 – Relação de *primers* utilizados na Amplificação dos genes da NS, do vírus Influenza A, sua polaridade, sequencia 5' – 3' e o tamanho do produto amplificado

Primer Sense	Sequencia 5' - 3'	Primer Anti-Sense	Sequencia 5' - 3'	Produto amplificado
Não Estrutural, NS – 8º Segmento				
NSF	TATTCGTCTCAGGGAGCA AAAGCAGGGTG	NSR2	CTAAGGGCTTTCACCGAA GAGGGA	528pb
NSF2	TGC AAT TGG GGT CCT CAT CGG A	NSR	ATATCGTCTCGTATTAGT AGAAACAAGGGTGTTTT	451pb

Em negrito: *Primers* descritos por Hoffman et al. (2001) e demais primers desenhados com auxílio do programa IDT-*primer design* – <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as seqüências dos respectivos genes de cepas publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2).



Figura 20 - Esquema dos *primers* utilizados nas PCRs para amplificação do gene da Proteína Não Estrutural. A fita alvo está indicada na cor azul. A identificação do gene, número do segmento e tamanho (em número de nucleotídeos) estão indicadas na parte superior de cada fita. Os quadrados coloridos indicam a localização dos primers e o seu emparelhamento com as fitas alvo. As setas coloridas indicam a sua polaridade. Na cor rosa estão indicados os *primers* MF e MR1 e NSF e NSR1 e na cor verde os *primers* MF2 e MR2 e NSF2 e NSR2. O tamanho esperado do *amplicon* está indicado na parte inferior de cada fita alvo, nas mesmas cores que seus respectivos pares de *primers*.

3.7 Análise dos produtos amplificados

A detecção dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose (*InvitrogenTM*) a 2% (*Duplex PCR* e *Multiplex PCR*) ou 1,0% (amplificação dos genes da HA, NA, M, NP e NS) em tampão TBE 1,0 x (45 mM Tris-Borato e 1 mM EDTA [pH 8]) e 0,5 mg/mL de brometo de etídeo. Uma mistura de 5 µL de produto amplificado e 2 µL de *loading buffer*, juntamente com o marcador de peso molecular 100 pb (*Biotoools*)

(para a *Duplex* e *Multiplex*) ou 1 Kb (DNA *Mass Ladder* - *Biotoools*) foram submetidos à eletroforese em cuba horizontal (C.B.S. EC-320 *Minicell Submarina*) em tampão TBE 1,0 x durante 50 minutos a 100 V. A visualização do gel foi feita em transiluminador de luz ultravioleta, sendo registrada em foto-documentador *BioDoc-ItTM* (*Imaging System*).

3.8 Purificação dos produtos Amplificados

Os produtos amplificados dos genes da HA, NA, NP, NS e M foram purificados pela metodologia de precipitação com etanol e acetato, descrita brevemente a seguir. Foi utilizada durante o processo de extração a centrifuga refrigerada (*Eppendorf* – modelo 5804R, rotor F-34-6-38/ ângulo fixo). Ao produto de PCR foi adicionado 10% de acetato de potássio 3 M e 2 vezes o volume de etanol absoluto gelado. Após incubação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no mínimo uma hora as amostras foram centrifugadas por 12 horas a 25000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Eppendorf* – modelo 5804R, rotor F-34-6-38/ ângulo fixo). O sobrenadante foi descartado e o tubo seco a temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 250 μL de etanol 70% gelado e a seguir foram centrifugados a 13000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram virados sob um papel toalha até secar. Em seguida as amostras foram ressuspensas em 20 μL de água ultra PURE (*InvitrogenTM*). Após a purificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, e quantificadas com o auxílio de marcador de peso molecular (DNA *Mass Ladder* - *Biotoools*).

Como alternativa para purificação dos produtos de PCR foi utilizada a enzima ExoSAP-IT[®] (USB Corporation, Ohio, USA). Acrescentou-se 3 μL da enzima a cada 7 μL do produto de PCR. Os tubos foram mantidos no termociclador *GeneAmpPCR System 9700* (*Applied Biosystems*), em um programa de 15 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, para ação da enzima e 15 minutos a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para sua inativação.

3.9 Reação de Sequenciamento

Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando o kit *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction* versão 3.1 (*Applied Biosystem, Inc., EUA*), seguindo as instruções do fabricante. Foram realizadas reações distintas para cada um dos segmentos do vírus Influenza e utilizando os primers específicos descritos nas tabelas 3 a 8.

Brevemente, a reação de sequenciamento foi realizada utilizando, em média, 10 a 30 ng do produto purificado diluído em 2 µL de tampão de reação *Save Money* (*Applied Biosystems*), 2 µL de *Big Dye* (*Applied Biosystem*), 3 a 5 pmoles de cada *primer* separadamente (*sense* e *anti-sense*) e água ultra PURE (*Invitrogen™*) para o volume final de 10,0 µL.

A extensão enzimática foi realizada em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems, Inc., EUA*) a 95 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos compostos de 15 segundos a 96 °C para desnaturação, 20 a 30 segundos a 50 °C para hibridização dos *primers* e 4 minutos a 60 °C para extensão das cadeias

Após a reação de sequenciamento, visando a remoção do excesso de dideoxynucleotídeos, as amostras foram novamente purificadas pela precipitação com isopropanol, realizada através da lavagem e centrifugação da amostra com Isopropanol a 75%, seguido de lavagem com etanol a 75% ou com o kit *BigDye® X-Terminator™* (*Applied Biosystems, Inc., EUA*), conforme instruções do fabricante. Brevemente, em 10 µL da reação de seqüenciamento, foram acrescentados 10 µL do X-Terminator e 55 µL de tampão da Reação “*buffer SAM’S*”. O mix foi agitado por 30 minutos seguido de uma centrifugação a 1300 x g por 2 minutos.

Os produtos purificados pelas duas metodologias foram submetidos à eletroforese em polímero POP6, utilizando-se sequenciador automático *ABI PRISM® 3100* (*Applied Biosystems*).

3.10 Processamento e alinhamento das seqüências dos genes

A edição das seqüências e montagem dos *contigs* foram realizadas com auxílio do programa Seq Man™ 4.05 - *Expert Analysis Software* - DNASTAR, Inc., EUA, de modo a obter os fragmentos correspondentes a cada um dos 5 genes do *Influenzavirus A*. As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos correspondentes foram alinhadas, gene por gene, e comparadas, pelo programa *Se Al (Sequence Alignment Editor v.2.0a11)* (RAMBAUT e CHARLESTON, 2001), com seqüências circulantes em outras localidades e/ou com cepas vacinais utilizadas a partir de 1999 até 2010, período correspondente ao início da Campanha vacinal no Brasil (tabela 9) e/ou com cepas resistentes a drogas antivirais, publicadas no GenBank. A descrição das cepas e o número de acesso ao *GenBank* estão relatados no Anexo D.

3.11 Reconstrução filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas empregando os critério de Distâncias Evolutivas, utilizando o programa *PAUP*4.0* versão Beta - *Sinauer Associates, Inc.*, (SWOFFORD, 1998). Inicialmente realizou-se, com cada um dos *data sets*, o teste de razão de verossimilhança para a escolha do modelo evolutivo a ser utilizado, realizado com auxílio do programa *Modeltest versão 3.06* (David Posada, Department of Zoology, Brigham Young University, USA). Após a escolha do modelo, foi realizada uma busca heurística com o algoritmo de *neighbor joining*. Foram calculados os valores de *bootstrap* com 500 réplicas para verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas (FELSENSTEIN et al., 1985).

Tabela 9 - Relação das cepas *Influenzavirus A H3N2* e *H1N1* recomendadas pela OMS para composição da vacina no Hemisfério Sul, no período de 1999 a 2006.

Ano	Local de Utilização	Cepa A(H1N1)	Cepa A(H3N2)
2010	Hemisfério Sul	A/California/7/2009	A/Perth/16/2009
2009-2010	Hemisfério Norte	A/Brisbane/59/2007	A/Brisbane/10/2007
2009	Hemisfério Sul	A/Brisbane/59/2007	A/Brisbane/10/2007
2008-2009	Hemisfério Norte	A/Brisbane/59/2007	A/Brisbane/10/2007
2008	Hemisfério Sul	A/SolomonIslands/3/2006	A/Brisbane/10/2007
2007-2008	Hemisfério Norte	A/SolomonIslands/3/2006	A/Wisconsin/67/2005
2007	Hemisfério Sul	A/NewCaledonia/20/99	A/Wisconsin/67/2005
2006-2007	Hemisfério Norte	A/NewCaledonia/20/99	A/Wisconsin/67/2005
2006	Hemisfério Sul	A/NewCaledonia/20/99	A/California/7/2004
2005-2006	Hemisfério Norte	A/NewCaledonia/20/99	A/California/7/2004
2005	Hemisfério Sul	A/NewCaledonia/20/99	A/Wellington/1/2004
2004-2005	Hemisfério Norte	A/NewCaledonia/20/99	A/Fujian/411/2002
2004	Hemisfério Sul	A/NewCaledonia/20/99	A/Fujian/411/2002
2003-2004	Hemisfério Norte	A/NewCaledonia/20/99	A/Moscow/10/99
2003	Hemisfério Sul	A/NewCaledonia/20/99	A/Moscow/10/99
2002-2003	Hemisfério Norte	A/NewCaledonia/20/99	A/Moscow/10/99
2002	Hemisfério Sul	A/NewCaledonia/20/99	A/Moscow/10/99
2001-2002	Hemisfério Norte	A/NewCaledonia/20/99	A/Moscow/10/99
2001	Hemisfério Sul	A/NewCaledonia/20/99	A/Moscow/10/99
2000-2001	Hemisfério Norte	A/NewCaledonia/20/99	A/Moscow/10/99
2000	Hemisfério Sul	A/NewCaledonia/20/99	A/Moscow/10/99
1999-2000	Hemisfério Norte	A/Beijing/262/95	A/Sydney/5/97
1999	Hemisfério Sul	A/Beijing/262/95	A/Sydney/5/97
1998-1999	Hemisfério Norte	A/Beijing/262/95	A/Sydney/5/97

4 RESULTADOS

4.1 Detecção dos Vírus *Influenza* A e B (IA e IB) em amostras clínicas pela Duplex-RT-PCR

A duplex RT-PCR para a amplificação do gene NS, utilizando os *primers* FowA e RevA, gerou um produto de 190 pb para IA e 241 pb para IB (Figura 21).



Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da *duplex* RT-PCR para verificação da amplificação de fragmento de 190 pb ou de 241 pb do gene NS1 dos *Influenzavirus* A e B, respectivamente. **Canaleta 1:** Peso molecular de 100 pb (*Biotools*[®]). **Canaleta 2 :** Controles positivos de IA e IB. **Canaleta 3:** Controle Negativo (H₂O). **Canaleta 4 a 6:** Amostras clínicas (ano/n^o da amostra): Br06/864, Br06/903, e Br06/1015, respectivamente. **Canaleta 7 a 9:** Amostras clínicas Br06/1007, Br06/1113 e Br06/1297. **Canaletas 10:** Controle Negativo (H₂O).

Das 526 amostras colhidas durante o ano de 2006, 29 (5,5%) foram positivas pela Duplex-RT-PCR, sendo 25 (4,7%) positivas para o vírus Influenza A, 4 (0,7%), para o vírus Influenza B e 492 (94,4%) negativas para os vírus Influenza A e/ou B, conforme demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Relação do total de amostras analisadas e de amostras positivas para *Influenzavirus* A e B em 2006

Ano	Amostras colhidas	Total de amostras positivas (%)	Amostras positivas para IA (%)	Amostras positivas para IB (%)
2006	521	29 (5,5%)	25 (4,7%)	4 (0,7%)

No ano de 2006 a circulação do vírus Influenza ocorreu, predominantemente, entre o final do outono e os meses de inverno, que correspondeu aos meses de maio a julho, com um total de 25 das 29 amostras identificadas. O vírus influenza A circulou entre os meses de maio (10 amostras), junho (11 amostras) e julho (2 amostras) enquanto que o influenza B apresentou circulação, embora esporádica, no segundo semestre, sendo identificados 2 casos nos meses de julho, 1 caso em outubro e 1 em novembro, sendo portanto predominante neste período. A distribuição dos casos no decorrer do ano está demonstrada na figura 22.

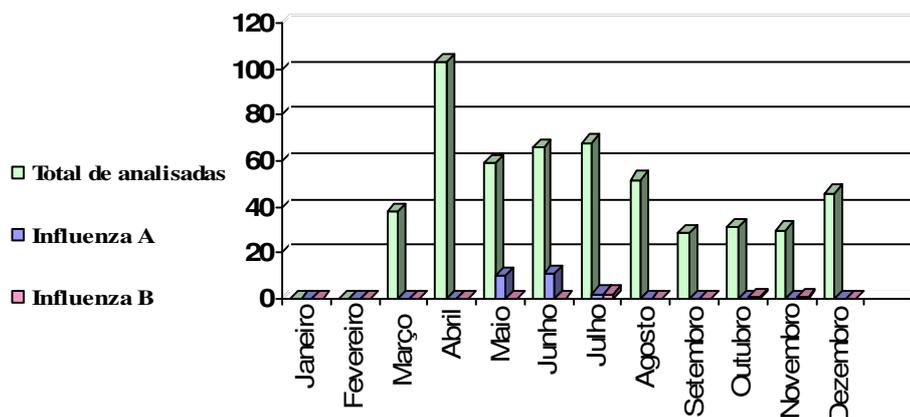


Figura 22 - Circulação mês a mês dos vírus Influenza A e B durante o ano de 2006

4.2 Subtipagem dos Vírus *Influenza* A e B pela Multiplex-RT-PCR

Amostras positivas para *Influenzavirus* A foram subtipadas pela *Multiplex*-RT-PCR, utilizando *primers* complementares aos genes que codificam as proteínas HA (H1, H3) e NA (N1 e N2), descritos na tabela 2. A amplificação gerou produtos de 165 pb e 231 pb para os genes H1 e H3, respectivamente e 427 pb e 176 pb para os genes N1 e N2, respectivamente (Figura 23).

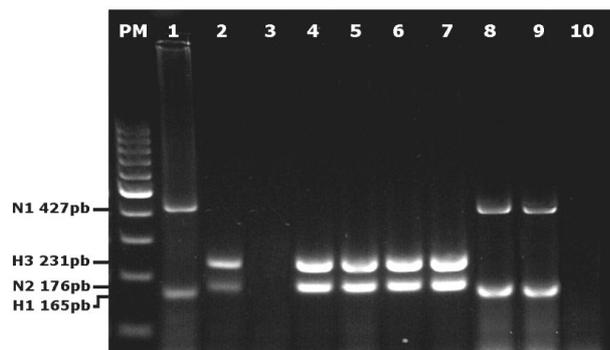


Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da *Multiplex* RT-PCR: PM: Peso molecular 100 pb (Biotools). **Canaleta 1:** Controle Positivo Influenza A (H1N1); **Canaleta 2:** Controle Positivo Influenza A (H3N2); **Canaleta 3:** Controle Negativo (H₂O); **Canaletas 4 a 7:** Amostras clínicas (ano/n^o da amostra) IA(H3N2) Br06/840, Br06/903, Br06/946 e Br06/979, respectivamente. **Canaletas 8 e 9:** Amostras clínicas (ano/n^o da amostra) IA(H1N1) Br06/789 e Br06/840. **Canaleta 10:** Controle Negativo (H₂O)

Das 29 amostras positivas para o vírus Influenza A, detectadas durante o ano de 2006, 21 foram subtipadas pela Multiplex-RT-PCR sendo 17 delas positivas para o subtipo H3N2 e 4 para o subtipo H1N1 (Tabela 11).

Tabela 11 - Relação do total de amostras analisadas e de amostras positivas para os vírus Influenza A subtipos H1N1 e H3N2.

Ano	Amostras IA Positivas	H1N1	H3N2	Amostras Não Subtipadas
2006	25	4 (16%)	17 (68%)	4 (16%)

4.3 Amplificação e sequenciamento dos genes do Vírus Influenza A

4.3.1 Sexto segmento: Gene da Neuraminidase NA

Após a primeira PCR que amplificava o gene NA completo (1460 pb), o produto de PCR foi submetido a *nested* ou *semi-nested* PCR conforme descrito no item 3.6.1. A

amplificação do gene da Neuraminidase, subtipo N1, utilizando os primers NA1F/NA1R1-1 e NA1F4-2/NA1R, gerou produtos de 978 pb e 699 pb, respectivamente. Alternativamente, nos casos nos quais não ocorreu a amplificação de um ou dois fragmentos, o produto da primeira PCR foi submetido a uma segunda amplificação utilizando os primers: NA1F/NA1R1-2, que gerou produtos de 478 pb, NA1F2/ NA1R2, que gerou produto de 727 pb, NA1F3/ NA1R3 (467 pb) e NA1F4-1/ NA1R (451 pb). As figuras 24 e 25 representam a amplificação do gene NA, subtipo N1, de algumas amostras clínicas estudadas e a tabela 12 resume o total de amostras amplificadas.

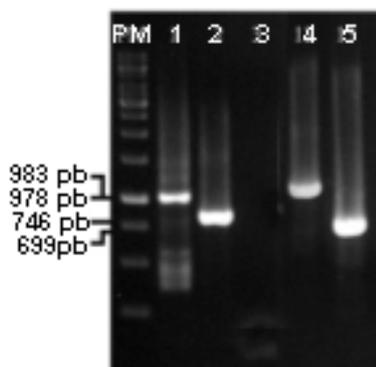


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, visualizando os produtos amplificados pela *Semi-Nested* PCR. **PM:** marcador molecular de 1 Kb (*Biotoools*), **Canaleta 1:** Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA2F e NA2R1-1; **Canaleta 2:** Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA2F4- e NA2R; **Canaleta 3:** Controle Negativo; **Canaleta 4:** Controle Positivo A(H1N1) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA1F e NA1R1-1; **Canaleta 5:** Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA1F4-2 e NA1R.

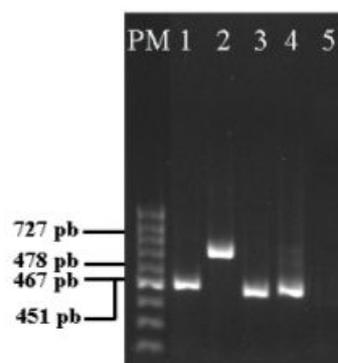


Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, visualizando os produtos amplificados pela *Semi-nested* ou *Nested* PCR. **PM:** marcador molecular de 1 Kb (*Biotoools*); **Canaleta 1:** Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA1F e NA1R1-2; **Canaleta 2:** Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA1F2 e NA1R2; **Canaleta 3:** Controle Positivo A(H1N1) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA1F3 e NA1R3; **Canaleta 34:** Controle Positivo A(H1N1) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA1F4-1 e NA1R; **Canaleta 5:** Controle Negativo.

As reações de *Nested* ou *Semi nested PCR* para a amplificação do gene N2, também foram realizadas em duas estratégias: a primeira utilizando os primers NA2F/NA2R1-1 e NA2F4-2/NA2R que gerou produtos de 983 pb e 746 pb, respectivamente. A segunda, utilizando os primers: NA2F/ NA2R1-2, NA2F2/ NA2R2, NA2F3/ NA2R3 e os primers NA2F4-1/NA2R, que geraram produtos de 481 pb, 732 pb, 518 pb e 459 pb, respectivamente. A figura 26 representa a amplificação do gene NA, subtipo N2, de algumas amostras clínicas estudadas e a tabela 12 resume o total de amostras amplificadas.

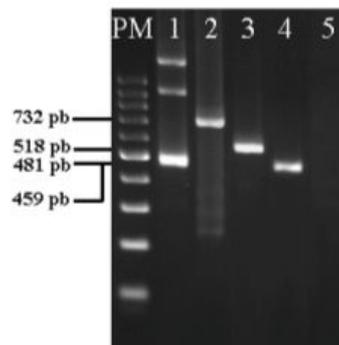


Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, visualizando os produtos amplificados pela *Semi-nested* ou *Nested PCR*. PM: marcador molecular de 1 Kb (*Biotoools*); Canaleta 1: Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA2F e NA2R1-2; Canaleta 2: Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA2F2 3 NA2R2; Canaleta 3: Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA2F3 e NA2R3; Canaleta 34: Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NA2F4-1 e NA2R; Canaleta 5: Controle Negativo.

Tabela 12 - Relação de amostras submetidas a PCR para amplificação do gene da Neuraminidase (NA), utilizando os primers: NA1F+NA1R1-1/2, NA1F2 + NA1R2, NA1F3+NA1R3 e NA1F4-1/2+NA1R, para o subtipo N1 e os primers NA2F+NA2R1-1/2, NA2F2 + NA2R2, NA2F3+NA2R3 e NA2F4-1/2+NA2R, para o subtipo N2 e seus respectivos fragmentos. Os amplicons seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco

Amostra	Duplex	Multiplex	Primers e produto amplificado			
Influenza A (H1N1)			NA1F+	NA1F2 +	NA1F3+	NA1F4-1/2+
			NA1R1-1/2	NA1R2	NA1R3	NA1R
Br06/933	IA	H1N1	478pb*	727pb*	467pb*	699pb*
Br06/994	IA	H1N1	NA	727pb	467pb	699pb
Influenza A (H3N2)			NA2F+	NA2F2+	NA2F3 +	NA2F4-1/2 +
			NA2R1-1/2	NA2R2	NA2R3	NA2R
Br06/791	IA	H3N2	NA	NA	NA	NA
Br06/840	IA	H3N2	NA	732pb*	518pb*	746pb*
Br06/872	IA	H3N2	983pb	732pb*	518pb*	746pb*
Br06/877	IA	H3N2	NA	732pb*	518pb*	746pb*
Br06/899	IA	H3N2	NA	732pb*	518pb*	746pb*
Br06/903	IA	H3N2	983pb	732pb*	518pb*	746pb*
Br06/946	IA	H3N2	NA	732pb*	518pb*	746pb*
Br06/956	IA	H3N2	481pb	732pb*	518pb*	459pb*
Br06/972	IA	H3N2	NA	NA	NA	459pb*
Br06/979	IA	H3N2	NA	NA	NA	746pb*
Br06/988	IA	H3N2	NA	NA	NA	459pb
Br06/999	IA	H3N2	NA	732pb*	518pb*	746pb*
Br06/1001	IA	H3N2	NA	NA	NA	746pb*
Br06/1015	IA	H3N2	983pb	732pb*	518pb*	746pb
Br06/1026	IA	H3N2	481pb	732pb*	518pb*	746pb*

NA – não amplificada

As amostras não amplificadas por essa metodologia foram submetidas à amplificação seguindo protocolo descrito pelo Dr. Martin Schutten da *Erasmus Medical Center, Department of Virology, Rotterdam, Netherlands* (comunicação pessoal), conforme descrito no item 3.6.4. As amplificações do gene da Neuraminidase utilizando os primers NAfwd e NA2, NA3 e NA4, NA5 e NA6 e NA7 e Na-rev, geraram produtos de 500 bp e os resultados estão apresentados na figura 27 e tabela 13.

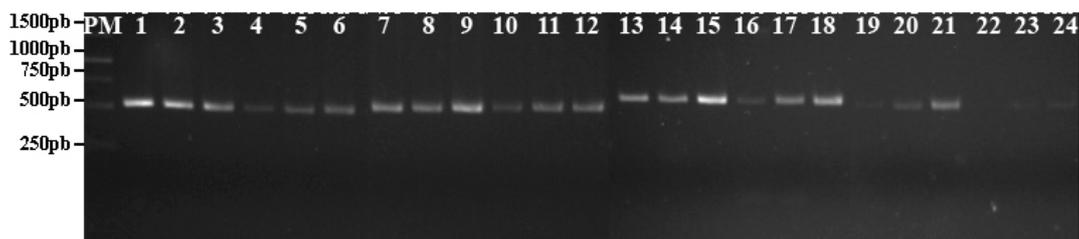


Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos amplificados do gene da Neuraminidase (N1 e N2). PM: Peso Molecular de 1 kb (Biotools). Canaletas 1 a 6: Amostras clínicas (ano/no da amostra) Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando primers NAFwd e NA2; Canaletas 7 a 12: Amostras clínicas Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando primers HNA3 e NA4; Canaleta 13 a 18: Amostras clínicas Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando primers NA5 e NA6 e Canaletas 19 a 24: Amostras clínicas Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando primers NA7 e NAreV.

Tabela 13 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da Neuraminidase (N1 e N2) utilizando os primers NAFwd e NA2, NA3 e NA4, NA5 e NA6 e NA7 e Na-rev e respectivos fragmentos amplificados. Os amplicons seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco *.

Amostras	Duplex	Multiplex	Primers e produto amplificado			
			NAfwd e NA2	NA3e NA4	NA5 e NA6	NA7 e NA-rev
Br06/791	IA	H3N2	500pb*	500pb*	500pb*	500pb*
Br06/972	IA	H3N2	500pb*	500pb*	500pb*	NA
Br06/979	IA	H3N2	500pb*	500pb*	500pb*	NA
Br06/988	IA	H3N2	500pb*	500pb*	500pb*	NA
Br06/1001	IA	H3N2	500pb*	500pb*	500pb*	NA

NA – não amplificadas

Os produtos de PCR obtidos por ambas as metodologias foram purificados conforme descrito no item 3.8 e submetidas à reação de sequenciamento utilizando os primers específicos NA1F/NA1R1-2, NA1F2/NA1R2, NA1F3/NA1R3 e NA1F4-1/NA1R para os amplicons obtidos com primeira metodologia ou NAFwd/NA2, NA3/NA4, NA5/NA6 e NA7/NArev para os amplicons obtidos na segunda. As figuras 28 e 29 resumem os resultados obtidos de amplificação e sequenciamento, respectivamente, do gene da NA de 17 amostras de vírus influenza A, 15 H3N2 e 2 H1N1.

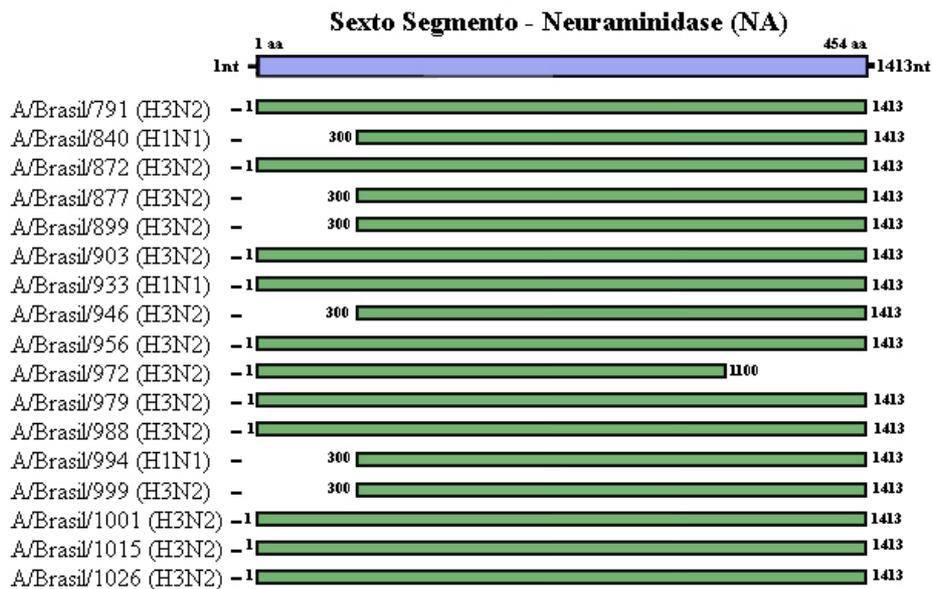


Figura 28 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da NA de 17 amostras de vírus Influenza A. Em azul está esquematizado o gene codificador da NA, com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde está demonstrado o tamanho do(s) *amplicon(s)* obtidos em cada amostra, levando em conta a soma dos nucleotídeos amplificados com cada par de primer. O número de nucleotídeos de cada fragmento amplificado está nas extremidades.

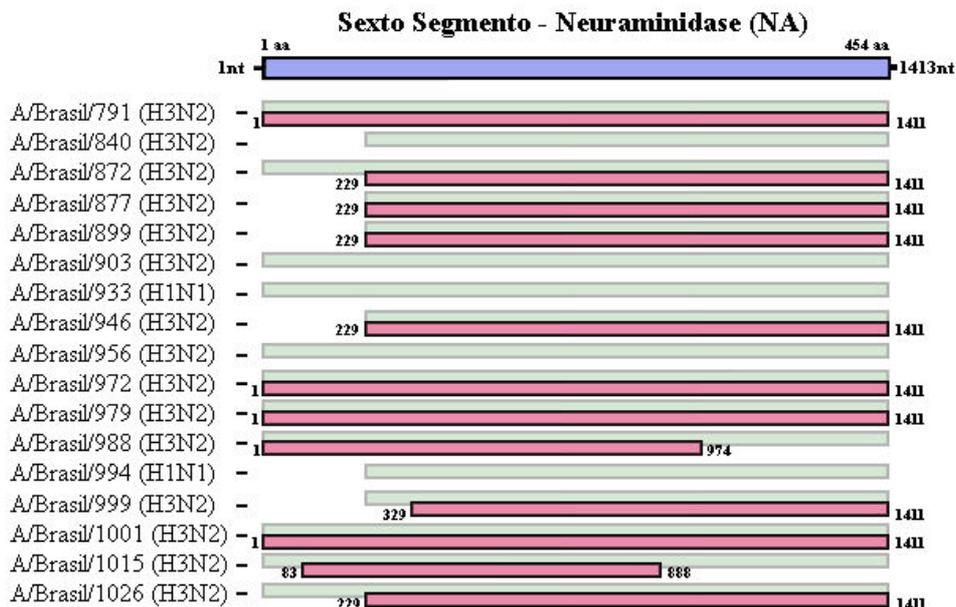


Figura 29 - Resumo dos fragmentos do gene da NA sequenciados de 17 amostras de vírus influenza. Em azul está sendo mostrado o gene codificador da NA, com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde claro, está demonstrado o tamanho aproximado dos *amplicons* obtidos em cada amostra e em rosa (sobreposto ao produto amplificado), o fragmento do gene sequenciado.

4.3.2 Sétimo segmento: Gene da Proteína da Matriz (M)

A amplificação do gene da Matriz foi realizada em 2 PCRs distintas, com a utilização dos primers MF/MR1 e MF2/MR, conforme descrito no item 3.6.2 que gerou produtos de 536 pb e 674 pb, respectivamente. A figura 30 representa a amplificação do gene M de algumas amostras clínicas estudadas e a tabela 14 resume o total de amostras amplificadas.

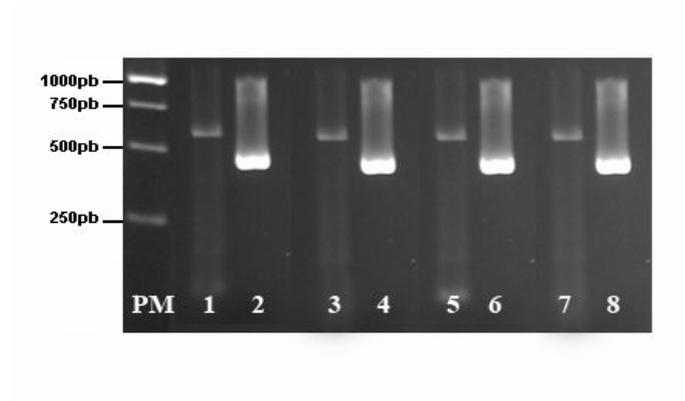


Figura 30 - Eletroforese em Gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo visualizando os produtos amplificados do gene da Matriz M: **PM** – Peso Molecular 1kb (Biotools). **Canaletas 1 e 2**, Controle Positivo A(H1N1) e produtos amplificados utilizando os *primers* MF e MR1 e MF2 e MR; **Canaletas 3 e 4**: Amostra clínica (ano/nº da amostra) Br06/933 (H1N1) e produto amplificado utilizando os *primers* MF e MR1 e MF2 e MR; **Canaletas 5 e 6**: Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* MF e MR1 e MF2 e MR; **Canaletas 7 e 8**: Amostra clínica Br06/999 (H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* MF e MR1 e MF2 e MR.

Tabela 14 - Relação de amostras submetidas a PCR para amplificação do gene da Matriz (M) utilizando os primers MF+MR1 e MF2+MR e respectivos fragmentos amplificados. Os amplicons seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco*.

Amostras	Duplex	Multiplex	Primers e produto amplificado	
			MF + MR1	MF2 + MR
Br06/789	IA	H1N1	536pb	674pb
Br06/791	IA	H3N2	536pb	674pb*
Br06/854	IA	H1N1	NA	674pb*
Br06/872	IA	H3N2	NA	674pb*
Br06/877	IA	H3N2	NA	674pb*
Br06/891	IA	H3N2	NA	674pb*
Br06/899	IA	H3N2	NA	NA
Br06/946	IA	H3N2	536pb*	674pb*
Br06/956	IA	H3N2	NA	674pb*
Br06/972	IA	H3N2	NA	674pb*
Br06/979	IA	H3N2	NA	674pb*
Br06/988	IA	H3N2	536pb	674pb
Br06/999	IA	H3N2	536pb	674pb*
Br06/1001	IA	H3N2	NA	674pb*
Br06/1015	IA	H3N2	NA	674pb*

NA – não amplificado

As amostras não amplificadas por essa metodologia foram submetidas à amplificação seguindo protocolo descrito pelo Dr. Martin Schutten da *Erasmus Medical Center, Department of Virology, Rotterdam, Netherlands* (comunicação pessoal), conforme descrito no item 3.6.4. As amplificações do gene da Matriz, utilizando os primers M2fwd e M22 e os primers M23 e M2-rev geram produtos de 500 bp (Figura 31 e Tabela 15).

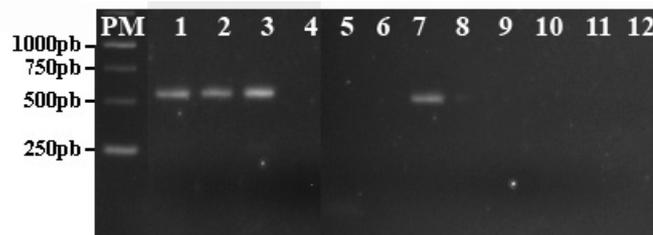


Figura 31 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos amplificados do gene da Matriz. **PM:** Peso Molecular de 1 kb (*Biotoools*). **Canaletas 1 a 6:** Amostras clínicas (ano/n^o da amostra) Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando *primers* M2fwd e M22; **Canaletas 7 a 12:** Amostras clínicas Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando *primers* M23 e M2rev.

Tabela 15 - Relação de amostras submetidas a PCR para amplificação do gene da Matriz (M) utilizando os primers **M2fwd + M22** e **M23 e M2-rev** e respectivos fragmentos amplificados. Os amplicons sequenciados estão representados em negrito com um asterisco*.

Amostras	Duplex	Multiplex	Primers e produto amplificado	
			M2fwd e M22	M23 e M2-rev
Br06/791	IA	H3N2	500pb*	500pb*
Br06/972	IA	H3N2	500pb*	NA
Br06/1001	IA	H3N2	500pb*	NA

NA- não amplificado

Os produtos de PCR obtidos por ambas as metodologias foram purificados conforme descrito no item 3.8 e submetidas à reação de sequenciamento utilizando os primers MF, MR1, MF2 e MR na primeira metodologia e M2fwd-2/ M2.3-rev na segunda. As figuras 32 e 33 resumem os resultados obtidos de amplificação e sequenciamento, respectivamente, do gene da Matriz de 16 amostras de vírus influenza A, 14 H3N2 e 2 H1N1.

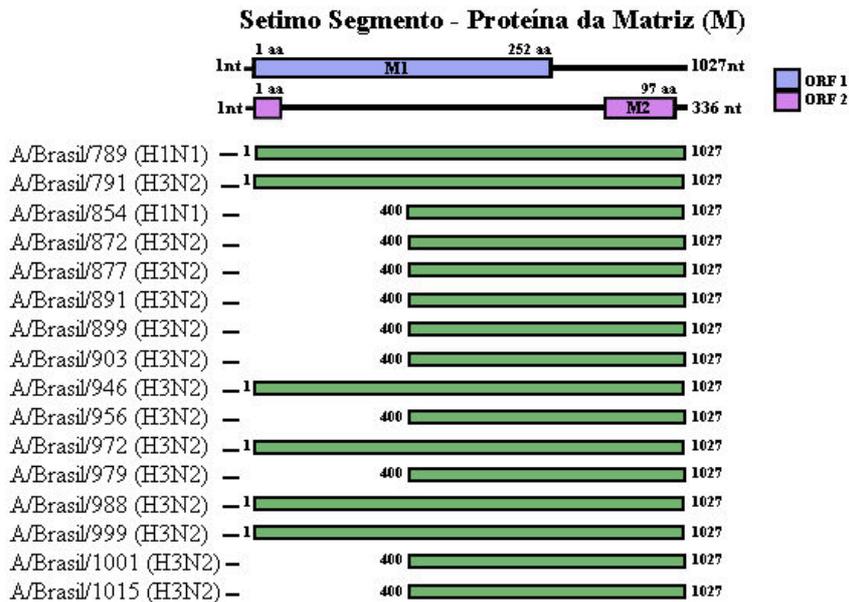


Figura 32 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da M de 16 amostras de vírus Influenza A. Em azul está esquematizado o gene codificador da Matriz, M1, e em roxo da M2, com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde está demonstrado o tamanho do *amplicon* obtido em cada amostra, levando em conta a soma dos nucleotídeos amplificados com cada par de primer. O número de nucleotídeos de cada fragmento amplificado está nas extremidades

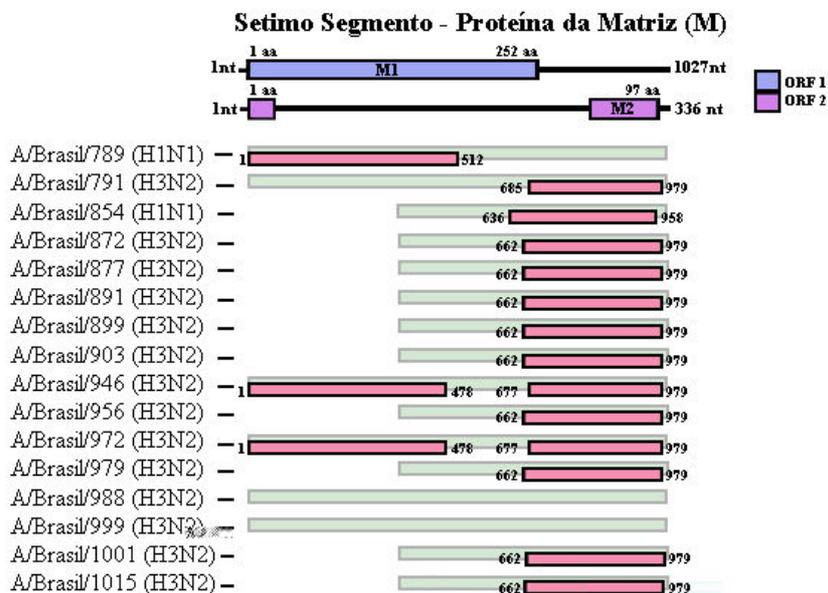


Figura 33 - Resumo dos fragmentos do gene da M seqüenciados de 16 amostras de vírus influenza. Em azul está sendo mostrado o gene codificador da Matriz M1 e em roxo da M2, com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde claro, está demonstrado o tamanho aproximado dos *amplicons* obtidos em cada amostra e em rosa (sobreposto ao produto amplificado), o fragmento do gene seqüenciado.

4.3.3 Quarto segmento: Gene da Hemaglutinina HA

Após a primeira PCR que amplificava o gene completo (1760 pb) o produto de PCR foi submetido a *nested* ou *semi-nested* PCR conforme descrito no item 3.6.3. A amplificação do gene da Hemaglutinina, subtipo H1, utilizando os pares de *primers* HA1F/HA1R1, HA1F4/ HA1R, HA1F3/ HA1R3 e HA1F2/HA1R2 gerou produtos de 1040 pb, 739 pb, 403 pb e 1016 pb, respectivamente. A amplificação do gene HA, subtipo H3, utilizando os *primers* HA3F/HA3R1 e HA3F3/HA3R3, gerou produtos de 1056 pb e 841pb, e os *primers* HA3F2/HA3R2 e HA3F4/HA3R, gerou produtos de 709 pb e 723 pb, respectivamente.

A figura 34 representa a amplificação do gene HA, subtipos H1 e H3, e a tabela 16 resume o total de amostras amplificadas.

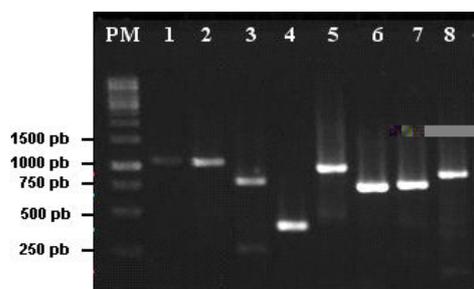


Figura 34 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da *nested* PCR para o gene da Hemaglutinina subtipos H1 e H3. **PM:** Peso Molecular de 1 kb (*Biotoools*). **Canaleta 1 a 4:** Controle A(H1N1), utilizando *primers* HA1F e HA1R1; *primers* , HA1F2 e HA1R2, *primers* HA1F4 e HA1R e *primers* HA1F3 e HA1R3 respectivamente. **Canaleta 5 a 8:** Controle A(H3N2), utilizando *primers* HA3F e HA3R1; *primers* HA3F2 e HA3R2; *primers* HA3F4 e HA3R; *primers* HA3F3 e HA3R3 .

Tabela 16 - Relação de amostras submetidas a PCR para amplificação do gene da Hemaglutinina (HA) utilizando os primers: HA1F+HA1R1, HA1F2+HA1R2, HA1F3+HA1R3, HA1F4+ HA1R, para o subtipo H1 e os primers: HA3F + HA3R1, HA3F2+HA3R2, HA3F3+HA3R3, HA3F4+ HA3R para o subtipo H3 e seus respectivos fragmentos. Os *amplicons* seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco *

Amostra	Duplex	Multiplex	Primers e produto amplificado			
		Influenza A H1N1	HA1F + HA1R1	HA1F2 + HA1R2	HA1F3+ HA1R3	HA1F4+ HA1R
Br06/933	IA	H1N1	1040pb	1016pb	403pb	739pb
		Influenza A H3N2	HA3F + HA3R1	HA3F2 + HA3R2	HA3F3 + HA3R3	HA3F4 + HA3R
Br06/859	IA	NS	1040pb*	709 pb*	841pb*	NA
Br06/791	IA	H3N2	NA	1016pb	403pb	NA
Br06/864	IA	NS	1040pb*	1016 pb*	NA	NA
Br06/877	IA	H3N2	1056pb	709 pb	841pb	723 pb
Br06/946	IA	H3N2	1040pb	1016 pb*	403pb	739 pb
Br06/956	IA	H3N2	1056pb	NA	NA	723 pb
Br06/972	IA	H3N2	NA	NA	NA	723 pb
Br06/979	IA	H3N2	NA	NA	NA	723 pb*
Br06/988	IA	H3N2	NA	709 pb	NA	723 pb
Br06/1001	IA	H3N2	1056pb	NA	NA	NA
Br06/1015	IA	H3N2	1056pb	NA	NA	NA

NA – não amplificado

As amostras não amplificadas por essa metodologia foram submetidas à amplificação seguindo protocolo descrito pelo Dr. Martin Schutten da *Erasmus Medical Center, Department of Virology, Rotterdam, Netherlands* (comunicação pessoal), conforme descrito no item 3.6.4. As amplificações do gene da Hemaglutinina, utilizando os primers HAFwd/HA2, HA3/HA4, HA5/HA-6 e HA7/HAreV geraram produtos de 500 bp, tanto para a H1 como para a H3. A figura 35 representa a amplificação do gene da Hemaglutinina, subtipos H1 e H3, de algumas amostras estudadas e a tabela 17 resume o total de amostras amplificadas.

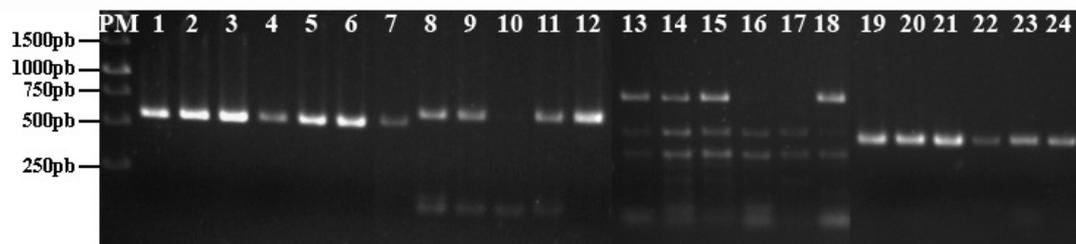


Figura 35 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos amplificados do gene da Hemaglutinina (H1 e H3). **PM:** Peso Molecular de 1 kb (*Biotoools*). **Canaletas 1 a 6:** Amostras clínicas (ano/nº da amostra) Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando *primers* HAFwd e HA2; **Canaletas 7 a 12:** Amostras clínicas Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando *primers* HA3 e HA4; **Canaleta 13 a 18:** Amostras clínicas Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando *primers* HA5 e HA6 e **Canaletas 19 a 24:** Amostras clínicas Br06/791, Br06/972, Br06/979, Br06/988, Br06/1001 e Br06/1015, utilizando *primers* HA7 e HAreV.

Tabela 17 - Relação de amostras submetidas à amplificação utilizando os primers HAFwd/HA2 HA3/HA4, HA5/HA6 e HA7/HAreV e respectivos fragmentos amplificados. Os *amplicons* seqüenciados estão representados em **negrito** com um asterisco *

Amostras	Duplex	Multiplex	Primers e produto amplificado			
Influenza A H1N1			Hafwd e	HA3 e	HA5 e	HA7 e
			HA2	HA4	HA6	Harev
<i>Br06/789</i>	IA	H1N1	500pb*	500pb*	500pb*	500pb
Br06/854	IA	H1N1	NA	NA	NA	NA
Influenza A H3N2						
Br06/791	IA	H3N2	500pb*	500pb	500pb	500pb
Br06/840	IA	H3N2	500pb	500pb	500pb	500pb
Br06/872	IA	H3N2	500pb	500pb	500pb	500pb
Br06/877	IA	H3N2	500pb*	500pb*	500pb*	500pb
Br06/891	IA	H3N2	500pb	500pb	500pb	500pb*
Br06/899	IA	H3N2	500pb	500pb	500pb	500pb
Br06/903	IA	H3N2	500pb	NA	NA	NA
Br06/939	IA	H3N2	500pb	NA	NA	500pb
Br06/956	IA	H3N2	500pb	NA	NA	500pb
Br06/972	IA	H3N2	500pb*	500pb*	500pb*	NA
Br06/979	IA	H3N2	500pb*	500pb*	500pb*	NA
Br06/988	IA	H3N2	500pb	NA	500pb	NA
Br06/999	IA	H3N2	500pb	500pb*	NA	NA
Br06/1001	IA	H3N2	500pb	500pb*	500pb*	NA
Br06/1015	IA	H3N2	500pb	500pb	500pb*	500pb*

NA – não amplificado

Os produtos de PCR obtidos por ambas as metodologias foram purificados, conforme descrito no item 3.8, e submetidos à reação de sequenciamento utilizando os primers específicos HA1F, HA1R1, HA1F4, HA1R, HA1F3, HA1R3, HA1F2 e HA1R2 para os *amplicons* obtidos com primeira metodologia ou HAFwd e HA2, HA3 e HA4, HA5 e HA6 e HA7 e HAreV para os *amplicons* obtidos na segunda. As figuras 36 e 37 resumem os resultados obtidos de amplificação e sequenciamento, respectivamente, do gene da

Hemaglutinina de 21 amostras de vírus influenza A, 18 H3N2 e 3 H1N1.

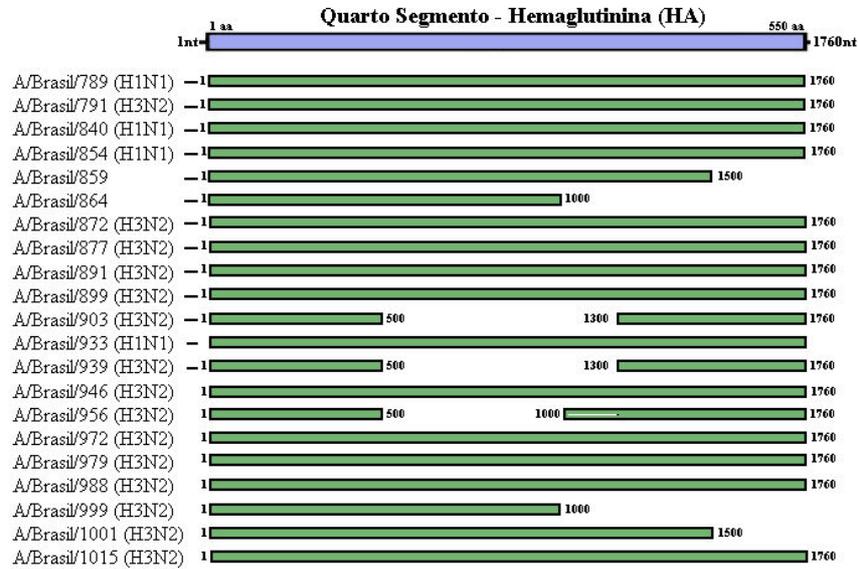


Figura 36 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da Hemaglutinina de 21 amostras de vírus Influenza A. Em azul está esquematizado o gene que codifica a Hemaglutinina, com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde está demonstrado o tamanho do(s) *amplicon(s)* de cada amostra, levando em conta a soma dos nucleotídeos amplificados com cada par de primer. O número de nucleotídeos de cada fragmento amplificado está nas extremidades.

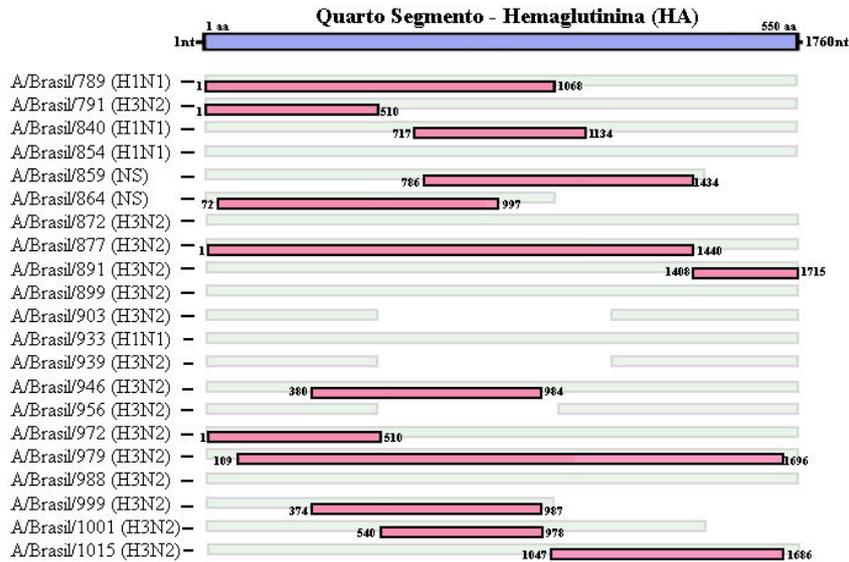


Figura 37 - Resumo dos fragmentos do gene da Hemaglutinina seqüenciados de 21 amostras de vírus influenza. Em azul está esquematizado o gene que codifica a proteína da Hemaglutinina, com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde claro, está demonstrado o tamanho aproximado dos *amplicons* obtidos em cada amostra e em rosa (sobrepuesto ao produto amplificado), o fragmento do gene seqüenciado.

4.3.4 Quinto segmento: Gene da Nucleoproteína NP

A amplificação do gene da NP foi realizada em 3 PCRs distintas utilizando os *primers* NPF e NPR1, NPF2 e NPR2 e NPF3 e NPR, que geraram produtos de 726 pb, 736 pb e 490 pb, respectivamente. A figura 38 representa a amplificação do gene NS de algumas amostras estudadas e a tabela 18 resume o total de amostras amplificadas.

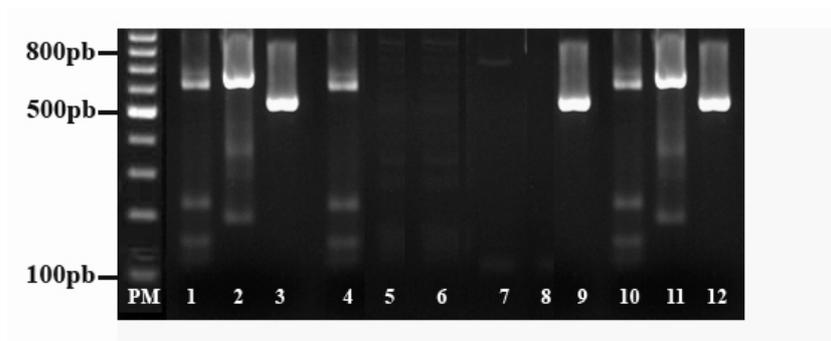


Figura 38 - Eletroforese em Gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo visualizando os produtos amplificados do gene da Nucleoproteína NP: **PM**: Peso Molecular 100 pb (Biotools). **Canaletas 1 a 3**, Controle Positivo A(H1N1) e produtos amplificados utilizando os *primers* NPF e NPR1, NPF2 e NPR2 e NPF3 e NPR; **Canaletas 4 a 6**: Amostra clínica (ano/nº da amostra) Br06/933 (H1N1) e produtos amplificados utilizando os *primers* NPF e NPR1, NPF2 e NPR2 e NPF3 e NPR. **Canaletas 7 a 9**: Controle Positivo H3N2 e produtos amplificados utilizando os *primers* NPF e NPR1, NPF2 e NPR2 e NPF3 e NPR; **Canaletas 10 a 12**: Amostra clínica Br06/999 A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers* NPF e NPR1, NPF2 e NPR2 e NPF3 e NPR.

Tabela 18 - Relação de amostras submetidas a PCR para amplificação do gene Nucleoproteína (NP) utilizando os primers: **NPF + NPR1**, **NPF2 + NPR2** e **NPF3 + NPR**. Os amplicons seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco *

Amostras	Duplex	Multiplex	Primers e produto amplificado		
			NPF e NPR1	NPF2 e NPR2	NPF3 e NPR
Br06/789	IA	H1N1	NA	736 pb	490 pb*
Br06/840	IA	H3N2	NA	736 pb	490 pb*
Br06/854	IA	H1N1	NA	736 pb	NA
Br06/859	IA	NS	NA	NA	490 pb*
Br06/872	IA	H3N2	NA	736 pb	490 pb*
Br06/877	IA	H3N2	NA	736 pb*	490 pb*
Br06/891	IA	H3N2	NA	736 pb	490 pb*
Br06/899	IA	H3N2	NA	736 pb	490 pb
Br06/903	IA	H3N2	NA	736 pb	NA
Br06/933	IA	H1N1	726 pb	NA	NA
Br06/946	IA	H3N2	NA	736 pb*	490 pb*
Br06/956	IA	H3N2	726 pb	NA	NA
Br06/972	IA	H3N2	726 pb	736 pb*	490 pb*
Br06/979	IA	H3N2	726 pb	NA	NA
Br06/988	IA	H3N2	726 pb	736 pb*	490 pb*
Br06/994	IA	H1N1	NA	736 pb	NA
Br06/999	IA	H3N2	726 pb	736 pb	490 pb*
Br06/1001	IA	H3N2	NA	736 pb	490 pb*
Br06/1015	IA	H3N2	NA	NA	490 pb*

NA – não amplificado.

Os produtos de PCR foram purificados, conforme descrito no item 3.8, e submetidos à reação de sequenciamento utilizando os primers NPF, NPR1, NPF2, NPR2, NPF3 e NPR. As figuras 39 e 40 resumem os resultados obtidos de amplificação e sequenciamento, respectivamente, do gene da NP de 19 amostras de vírus influenza A, 16 H3N2 e 3 H1N1.

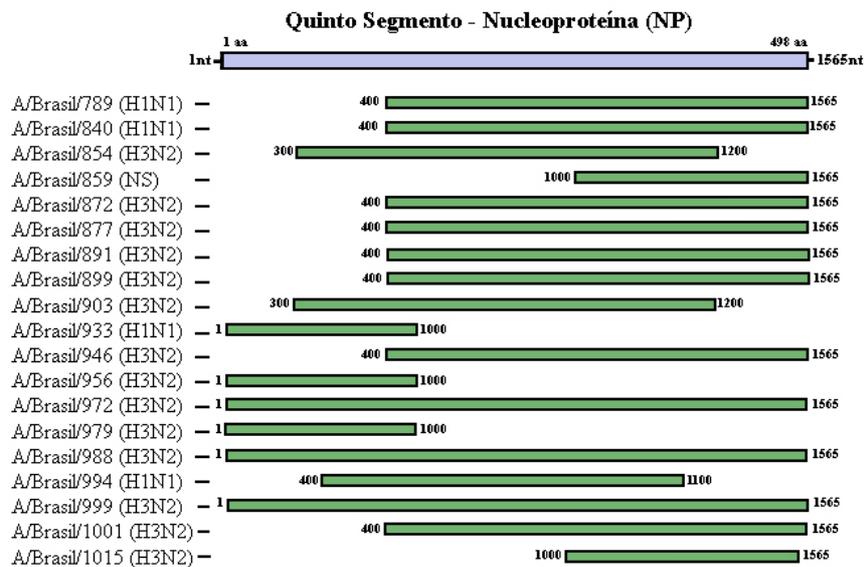


Figura 39 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da NP de 19 amostras de vírus Influenza A. Em azul está esquematizado o gene que codifica a NP, com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde está demonstrado o tamanho do(s) *amplicon(s)* obtidos em cada amostra, levando em conta a soma dos nucleotídeos amplificados com cada par de primer. O número de nucleotídeos de cada fragmento amplificado está nas extremidades.

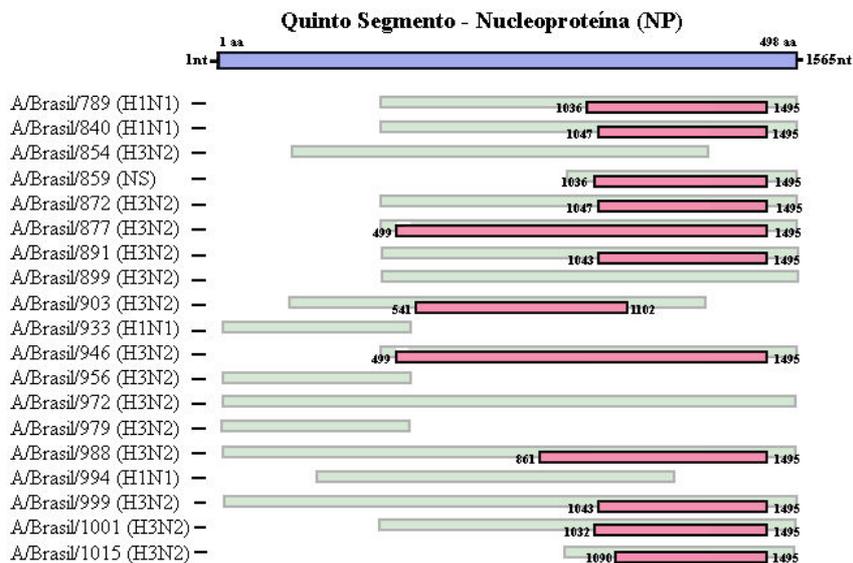


Figura 40 - Resumo dos fragmentos do gene da NP sequenciados de 19 amostras de vírus influenza. Em azul está sendo mostrado o gene codificador da NP, com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde claro, está demonstrado o tamanho aproximado dos *amplicons* obtidos em cada amostra e em rosa (sobreposto ao produto amplificado), o fragmento do gene sequenciado.

4.3.5 Oitavo segmento: Gene da Proteína Não Estrutural (NS)

A amplificação do gene da Proteína Não Estrutural foi realizada em 2 PCRs distintas, com a utilização dos primers NSF/NSR1 e NSF2/NSR, que gerou produtos de 528 pb e 451 pb, respectivamente. A figura 41 representa a amplificação do gene NS de algumas amostras estudadas e a tabela 19 resume o total de amostras amplificadas.

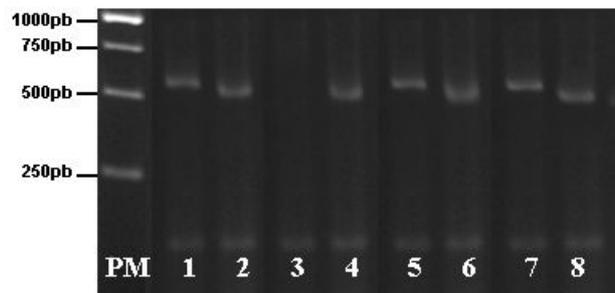


Figura 41 - Eletroforese em Gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo visualizando os produtos amplificados do gene da Não estrutural NS: **PM** – Peso Molecular 1kb (Biotools). **Canaletas 1 e 2**, Controle Positivo A(H1N1) e produtos amplificados utilizando os *primers* NSF e NSR1 e NSF2 e NSR; **Canaletas 3 e 4**: Amostra clínica (ano/nº da amostra) Br06/999(H1N1) e produto amplificado utilizando os *primers primers* NSF e NSR1 e NSF2 e NSR; **Canaletas 5 e 6**: Controle Positivo A(H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers primers* NSF e NSR1 e NSF2 e NSR; **Canaletas 7 e 8**: Amostra clínica Br06/999 (H3N2) e produtos amplificados utilizando os *primers primers* NSF e NSR1 e NSF2 e NSR.

Tabela 19 - Relação de amostras submetidas a PCR para amplificação do gene Não Estrutural (NS) utilizando os primers NSF + NSR1 e NSF2 + NSR e seus respectivos fragmentos amplificados. Os amplicons seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco *

Amostras	Duplex	Multiplex	Primers e produto amplificado	
			NSF + NSR1	NSF2 + NSR
<i>Br06/789</i>	IA	H1N1	528pb	451pb*
Br06/854	IA	H1N1	NA	451pb*
Br06/864	IA	NS	NA	451pb
Br06/872	IA	H3N2	NA	451pb
Br06/877	IA	H3N2	NA	451pb*
Br06/891	IA	H3N2	NA	451pb*
Br06/933	IA	H1N1	NA	451pb
Br06/946	IA	H3N2	NA	451pb*
Br06/956	IA	H3N2	528pb	451pb*
Br06/972	IA	H3N2	528pb	451pb
Br06/979	IA	H3N2	NA	451pb*
Br06/988	IA	H3N2	NA	451pb
Br06/994	IA	H1N1	NA	451pb
Br06/999	IA	H3N2	NA	451pb*
Br06/1001	IA	H3N2	NA	451pb*
Br06/1015	IA	H3N2	NA	451pb*

* NA – não amplificado

Os produtos de PCR foram purificados conforme descrito no item 3.8 e submetidos à reação de sequenciamento utilizando os primers NSF/NSR1 e NSF2/NSR. As figuras 42 e 43 resumem os resultados obtidos de amplificação e sequenciamento, respectivamente, do gene da proteína Não Estrutural de 16 amostras de vírus influenza A, 10 H3N2 e 4 H1N1.

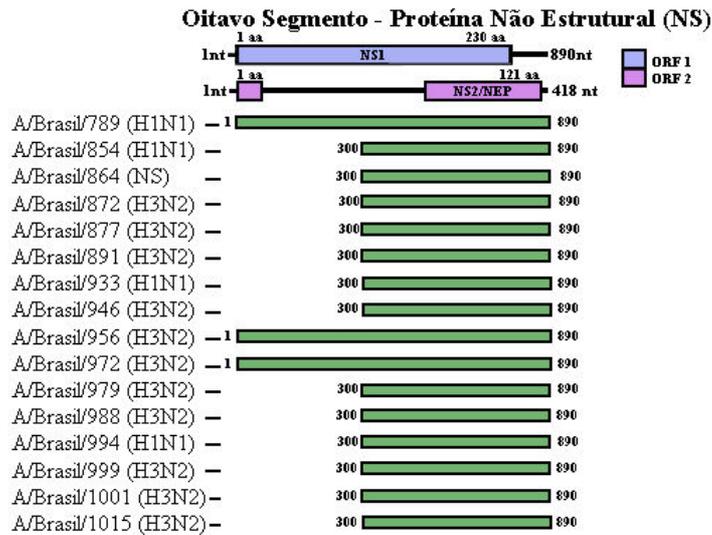


Figura 42 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da proteína não estrutural (NS) de 16 amostras de vírus Influenza A. Em azul está esquematizado o gene que codifica a NS1 e em roxo da NS2 (NEP), com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde está demonstrado o tamanho do *amplicon* obtido em cada amostra, levando em conta a soma dos nucleotídeos amplificados com cada par de primer. O número de nucleotídeos de cada fragmento amplificado está nas extremidades

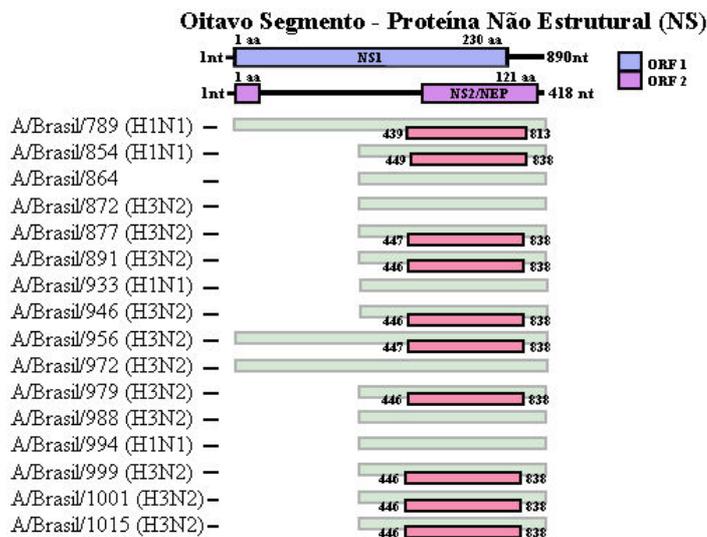


Figura 43 - Resumo de todos os produtos amplificados do gene da proteína não estrutural (NS) de 16 amostras de vírus Influenza A. Em azul está esquematizado o gene que codifica a NS1 e em roxo da NS2 (NEP), com o número de aminoácidos acima do gene e o número de nucleotídeos nas extremidades. Em verde claro, está demonstrado o tamanho dos *amplicons* obtidos em cada amostra e em rosa (sobreposto ao produto amplificado), o fragmento do gene sequenciado.

Para melhor visualização dos resultados a figura 44 resume todos os fragmentos do genoma de cada amostra.

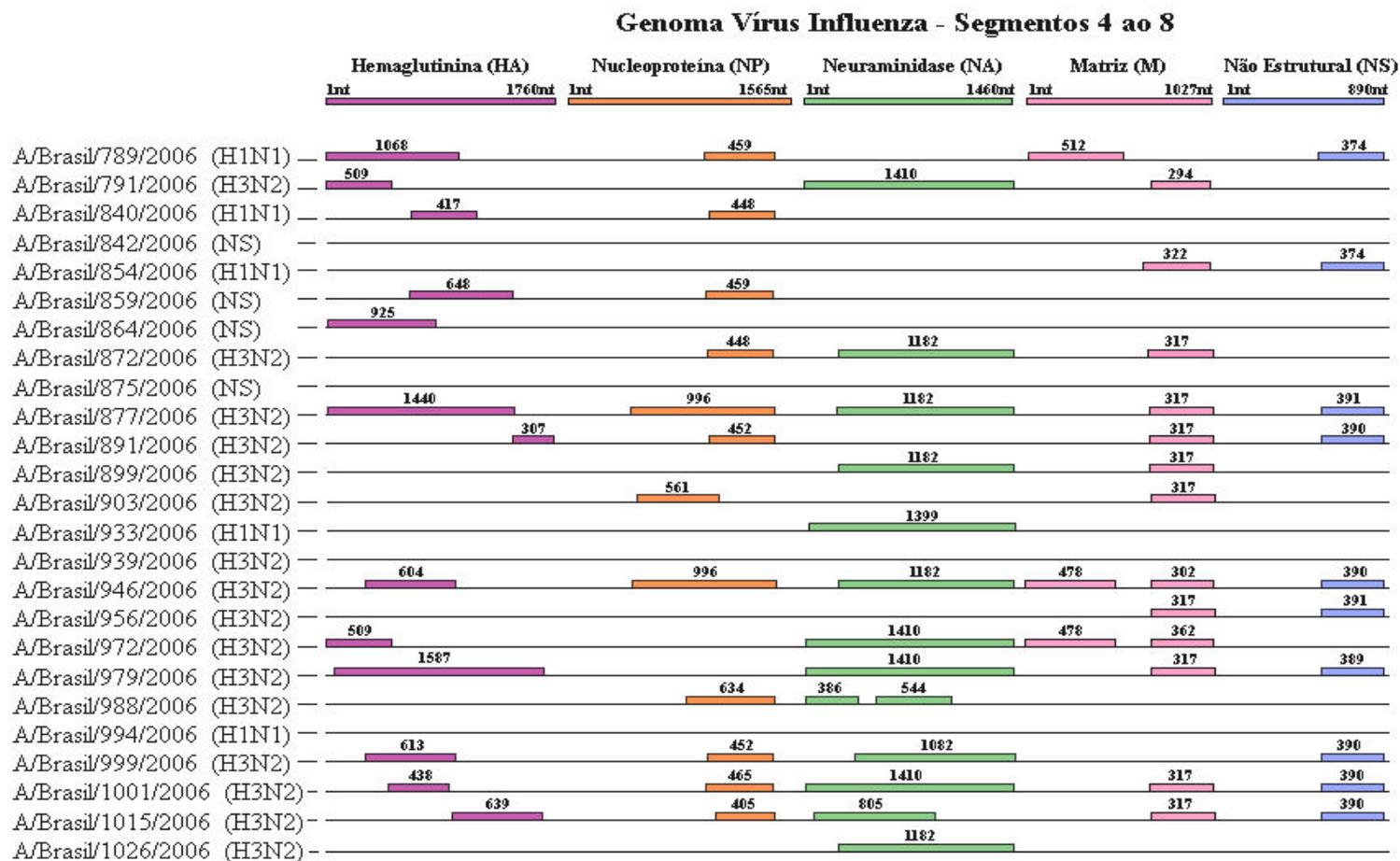


Figura 44 – Esquema dos fragmentos dos cinco genes dos vírus influenza A, segmentos quatro ao oito, que foram sequenciados. Na parte superior estão esquematizados os genes, com o nome da proteína codificada e o tamanho do gene. Fragmentos em roxo correspondem ao gene da hemaglutinina que foram seqüenciados. Em laranja gene da Nucleoproteína, em verde da neuraminidase, em rosa da matriz e em azul da Proteína Não Estrutural.

4.4 Alinhamento dos genes.

As seqüências de cada um dos genes foram alinhadas, utilizando o programa SeAl, com seqüências obtidas do GenBank de cepas circulantes em várias localidades, principalmente no Brasil e América do Sul e/ou com cepas que apresentavam resistência à drogas anti-virais e com as cepas vacinais recomendadas pela OMS (Tabela 9).

4.4.1 Gene da Hemaglutinina – HA

O gene da hemaglutinina de 1 amostra de influenza A(H1N1) foi parcialmente sequenciado e a sequência traduzida correspondeu a um fragmento de 300 aa, correspondentes à região HA1 (resíduo 1 a 300). Essa região foi escolhida, tanto para o subtipo H1 como para o H3, pela presença dos principais sítios antigênicos da proteína e dos sítios de ligação ao receptor. A sequência de aa foi alinhada com a cepa vacinal utilizada em 2006, A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1), e com cepas vacinais utilizadas desde o início da campanha vacinal no Brasil, em 1999. Pelo alinhamento representado na figura 45 verifica-se que a amostra Br/789 apresentou um total de 32 de mutações ao longo do gene, sendo oito delas presentes nos sítios antigênicos e duas em regiões conservadas do sítio de ligação aos receptores de ácido siálico. As principais alterações dentro dos sítios antigênicos estão representados na tabela 20. O sítios altamente conservados relacionados à ligação ao receptor celular em ambos os subtipos, H1 e H3: Tirosina (Y)-98, Serina (S)-136, Triptofano (W)-153, Histidina (H)-183, Tirosina (Y)-195 e Alanina (A)-200 (SKEHEL e WILEY, 2000) estão conservados, com exceção do sítio 136, que apresenta a alteração de Serina para Treonina.

Os genes da hemaglutinina de 12 amostras de influenza A(H3N2) foram parcialmente sequenciados e as sequências traduzidas corresponderam, em média, a um fragmento de 300 aa da região HA1 da proteína, que compreendem o resíduo 1 até o 300. A figura 46 mostra o alinhamento de aminoácidos de 9 sequências brasileiras com seqüências de cepas vacinais utilizadas desde o início da campanha de vacinação contra Influenza no

Brasil, sendo utilizada como referência a cepa vacinal A/California/7/2004 (H3N2), utilizada na campanha de 2006 (Figura 46). Três sequencias 1015, 891 e 859 não foram incluídas no alinhamento pois o fragmento sequenciado não correspondia à região analisada. As sequencias apresentaram um total de 8 substituições em relação à cepa vacinal, demonstrando boa similaridade das cepas circulantes com a vacinal. Entretanto, duas destas alterações ocorreram dentro do sítio antigênico B (tabela 20). Não foram verificadas alterações nos sítios relacionados à ligação com o receptor celular.

Tabela 20 - Relação das substituições de aminoácidos das cepas brasileiras em comparação com a cepa vacinal A/California/7/2004 (H3N2) e A/NewCaledoni/20/1999 (H1N1), sua posição e localização dentro dos sítios antigênicos previamente mapeados (Fonte: WILEY et al., 1981; SKEHEL e WILEY, 2000).

	Posição	Aminoácido vacinal	Aminoácido da amostras brasileiras	Sítio Antigênico*
H1N1	78	E	K	Cb
	84	V	A	Cb
	125	S	R	Sa
	129	N	K	Sa
	142	N	K	Ca
	156	G	E	Sa
	157	K	E	Sa
	160	L	E	Sa
	194	L	I	Sb
	196	H	Q	Sb
	208	H	N	Ca
	225	D	G	Ca
	H3N2	193	S	F
196		T	A	B

4.4.2 Gene da Neuraminidase – NA

Os genes da neuraminidase de 1 amostra de influenza A(H1N1) foi completamente sequenciado e as sequencias traduzidas corresponderam a um fragmento de 478 aa. A

figura 47 mostra o alinhamento de aminoácidos da sequência obtida comparada com sequências de cepas vacinais utilizadas desde o início da campanha de vacinação contra Influenza no Brasil, sendo utilizada como referência a cepa vacinal A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1), utilizada na campanha de 2006. Foram incluídas no alinhamento amostras que apresentam sítios de substituições de aminoácidos que conferem resistência aos antivirais Zanamivir e Oseltamivir: H275Y (Histidina glutâmico para Tirosina) (YEN et al., 2007; SHEU et al., 2008) e N294S (Asparagina para Serina) (EARHART et al., 2009).

Com relação à cepa vacinal foram verificadas três alterações: E132K (Ácido glutâmico para Lisina), N450D (Asparagina para Ácido aspártico) e T467I (Treonina para Isoleucina).

Os genes da neuraminidase de 12 amostras de influenza A(H3N2) foram parcialmente sequenciados e as sequências traduzidas corresponderam a um fragmento de 210 aa. A figura 48 mostra o alinhamento de aminoácidos das sequências obtidas com sequências de cepas vacinais utilizadas desde o início da campanha de vacinação contra Influenza no Brasil, sendo utilizada como referência a cepa vacinal A/California/7/2004 (H3N2), utilizada na campanha de 2006. Foram incluídas no alinhamento amostras que apresentam sítios de substituições de aminoácidos que conferem resistência aos antivirais Zanamivir e Oseltamivir: E119V (Ácido glutâmico para Valina) (BAZ et al., 2006) e R292K (Arginina para Lisina), H274Y (SHEU et al., 2008).

Quando comparadas à cepa vacinal foram verificadas 10 alterações, sendo que as substituições nas posições 93 (de Ácido Aspártico para Asparagina - D93N), 172 (de Lisina para Arginina - K172R) e 222 (de Lisina para Ácido glutâmico - K222E) ocorreram em todas as sequências brasileiras. Essas alterações foram verificadas nas cepas vacinais utilizadas nos anos subsequentes (2007 e 2008).

4.4.3 Gene da Proteína da Matriz – M

Os genes da matriz de 12 amostras de influenza A, (H3N2) e 2 de (H1N1) foram parcialmente sequenciados. As sequências traduzidas de 98 aminoácidos correspondentes à

região codificadora do gene da Matriz, M2, foram utilizadas para as análises. As sequências obtidas, correspondentes à região codificadora do gene da Matriz M1 não foram suficientes para realizar as análises, por esta razão foram removidas dos alinhamentos.

Uma amostra de Influenza A foi sequenciada e alinhada com cepas vacinais utilizadas desde o início da campanha de vacinação contra Influenza no Brasil, sendo utilizada como referência a cepa vacinal A/New Caledonia/20/1999 (H1N1), utilizada na campanha de 2006 (Figura 49). Foram incluídas amostras que apresentam sítios com substituições de aminoácidos relacionados ao desenvolvimento de resistência aos antivirais *Amantadine* e *Rimantadine*: L26F, V27A, A30T, S31N e G34E. Não foram detectados sítios de substituição que conferem resistência aos inibidores dos canais iônicos da M2 nas amostras brasileira de H1N1. A única substituição de aminoácido verificada foi na posição 89 (de Glicina para o Ácido aspártico - G89D), substituição esta detectada também em outra amostra (A/Sendai/TU101/2006).

A figura 50 mostra o alinhamento dos 98 aa das 12 amostras de influenza A(H3N2). Todas as amostras alinhadas apresentaram a substituição de Glutamina para Histidina na posição 90 (Q90H) e todas as amostras brasileiras apresentaram a substituição de Serina para Asparagina na posição 31 (S31N). Esta substituição é característica de amostras que apresentam resistência aos antivirais inibidores dos canais iônicos da M2.

4.4.4 Gene da Nucleoproteína – NP

Os genes da Nucleoproteína de 12 amostras de influenza A foram sequenciados parcialmente, sendo obtidas sequências que, quando traduzidas, corresponderam a um fragmento de 100 aminoácidos do gene da NP das amostras de H1N1 e 140 aa das amostras de H3N2.

Duas amostras de H1N1 foram alinhadas com cepas vacinais utilizadas desde o início da campanha de vacinação contra Influenza no Brasil, sendo utilizada como referência a cepa vacinal A/New Caledonia/20/1999 (H1N1), utilizada na campanha de 2006 (Figura 51). A única substituição verificada nesse fragmento nas amostras brasileiras

foi no resíduo 423, de Treonina para Alanina (T423A). A mesma alteração foi verificada nas cepas vacinais utilizadas nos anos de 2007 e 2008, subsequentes ao ano estudado

Uma das amostras A/Brasil/859/2006, não foi subtipada pela multiplex PCR e pelo sequenciamento do gene HA foi subtipada como H3 (figura 55). Entretanto, a sequência da nucleoproteína alinhou-se apenas com sequências da NP do subtipo H1N1. Esses resultados foram confirmados após análise utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), no qual verificou-se 99% de similaridade com A/England/494/2006(H1N1) e pela análise filogenética envolvendo esse gene (Figura 58).

Dez amostras de H3N2 foram alinhadas com cepas vacinais utilizadas desde o início da campanha de vacinação contra Influenza no Brasil, sendo utilizada como referência a cepa vacinal A/California/7/2004 (H3N2), utilizada na campanha de 2006 (Figura 52). As amostras brasileiras apresentaram substituições nas posições 377, (de Serina para Glicina - S377G), 472, (de Alanina para Treonina - A472T) e 494 (de Lisina para Ácido glutâmico - K494E). A sequência da amostra A/Brasil/840/2006, inicialmente subtipada como H1N1 pela multiplex e pelo sequenciamento do gene da Hemaglutinina (figura 55), alinhou-se com sequências da nucleoproteína de amostras de influenza A(H3N2). Foi realizada uma análise utilizando o programa BLAST, no qual verificou-se 100% de similaridade com a cepa A/Brisbane/245/2006(H3N2). A análise filogenética, apresentada na figura 58 também confirmou esses dados.

4.4.5 Gene da Proteína Não Estrutural – NS

Os genes codificadores da proteína Não estrutural de 10 amostras de influenza A, (8 H3N2 e 2 H1N1) foram parcialmente sequenciados. As seqüências traduzida de 82 aminoácidos, correspondentes à região codificadora do gene da proteína Não Estrutural NS1, foram alinhadas com cepas vacinais e isolados recentes de ambos os subtipos. As sequências obtidas, correspondentes à região codificadora do gene da proteína Não Estrutural NEP (NS2) não foram suficientes para realizar análises e por esta razão foram removidas dos alinhamentos.

Duas amostras de Influenza A(H1N1), tiveram o gene da proteína Não estrutural parcialmente sequenciados. Quando comparadas à cepa vacinal A/NewCaledonia/20/1999 verificou-se a presença de alterações em três sítios distintos: na posição 157 (de Leucina para Fenilalanina - L166F) e 207 e 217 (de Isoleucina para Treolina) (Figura 53).

Um total de 8 amostras de Influenza A (H3N2) tiveram o gene da proteína não estrutural sequenciado parcialmente. O alinhamento de aminoácidos das amostras brasileiras representado na figura 54 demonstra que as sequencias brasileiras, quando comparadas à cepa vacinal A/Wellington/1/2004 (H3N2), mostraram-se conservadas com 2 mutações pontuais nas posições 142 e 150 (de treonina para prolina - T142P e de isoleucina para asparagina - I150N) presentes em apenas 3 amostras. (Figura 54)

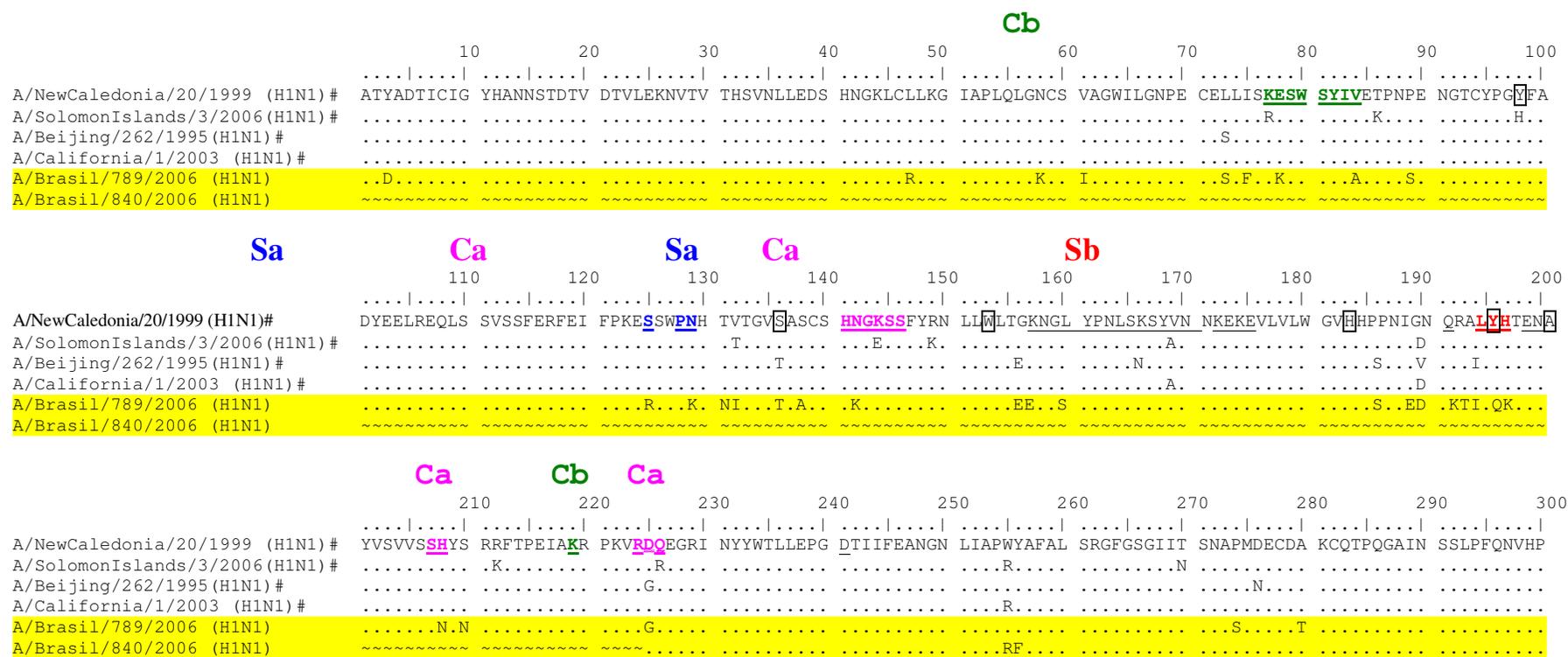


Figura 45 - Representação do alinhamento de 300 aa aminoácidos da região HA1 da Hemaglutinina (correspondendo ao sítio 1 ao 300) de 2 amostras de *Influenzavirus A H1N1* obtidas em 2006. Foram incluídas no alinhamento as cepas vacinais utilizadas no período de 1999 a 2008 (tabela 9). As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa vacinal A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1) estão demonstrados. O (*) indica stop codon, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não. Nos quadrados estão representados os aminoácidos conservados do sítio de ligação aos receptores. Sítios antigênicos¹ Sa, Sb, Ca, Cb. (¹ Wiley et al., 1981).

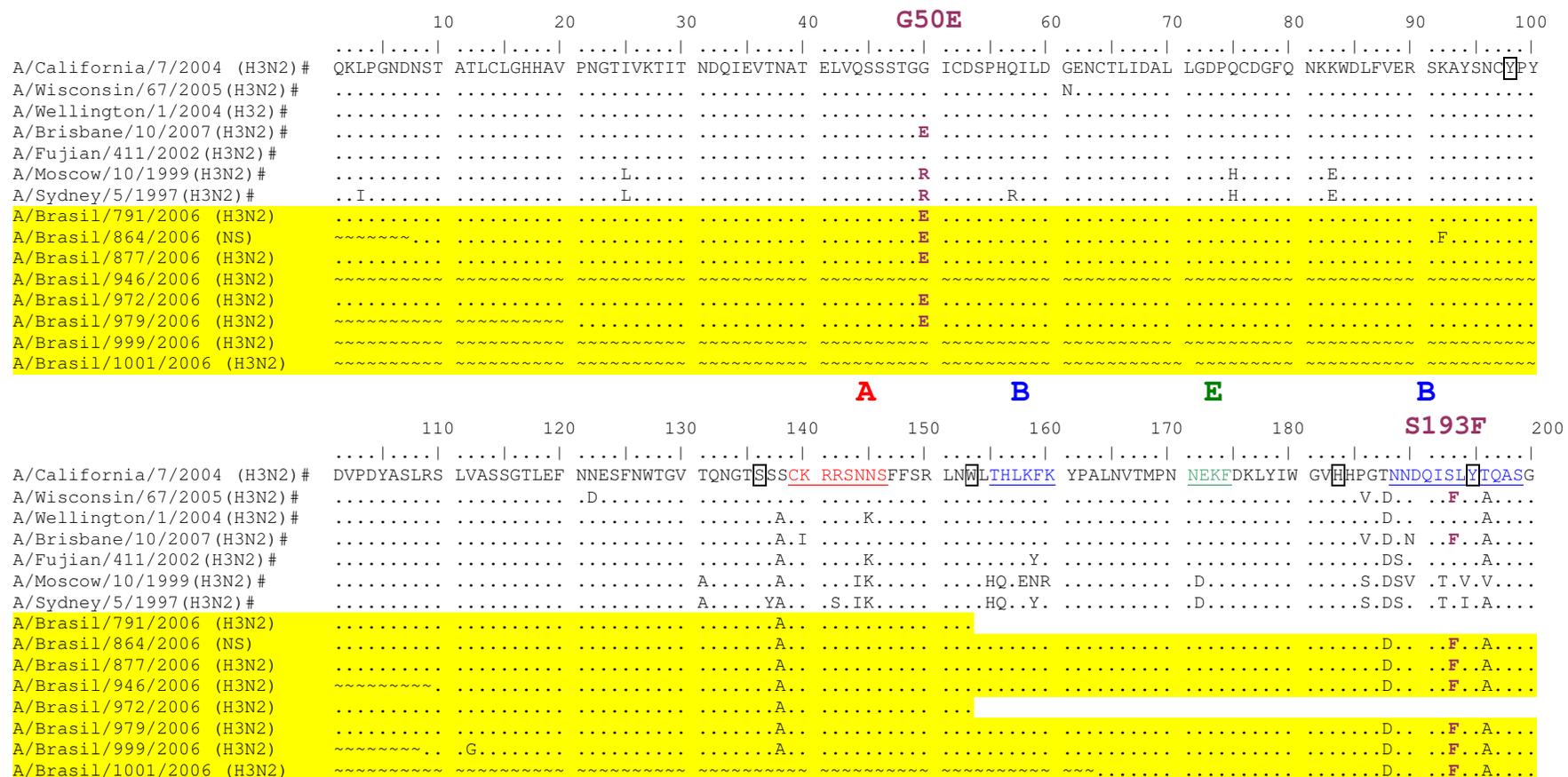


Figura 46 - Representação do alinhamento de 300 aa aminoácidos da região HA1 da Hemaglutinina (correspondendo ao sítio 1 ao 200) de 8 amostras de *Influenzavirus* A H3N2 obtidas em 2006. Foram incluídas no alinhamento as cepas vacinais utilizadas no período de 1999 a 2008 (tabela 9). As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa vacinal A/California/7/2004 (H3N2) estão demonstrados. O (*) indica *stop codon*, (#) cepas vacinais, (~) indica fragmento não sequenciado. Nos quadrados estão representados os aminoácidos conservados do sítio de ligação aos receptores. Os resíduos de aminoácidos previamente identificados como pertencentes aos sítios antigênicos (A a E) estão sublinhados e representados pelas cores: **A**, **B**, **C**, **D**, **E** estão representadas as diferenças encontradas com relação à cepa vacinal de 2006.

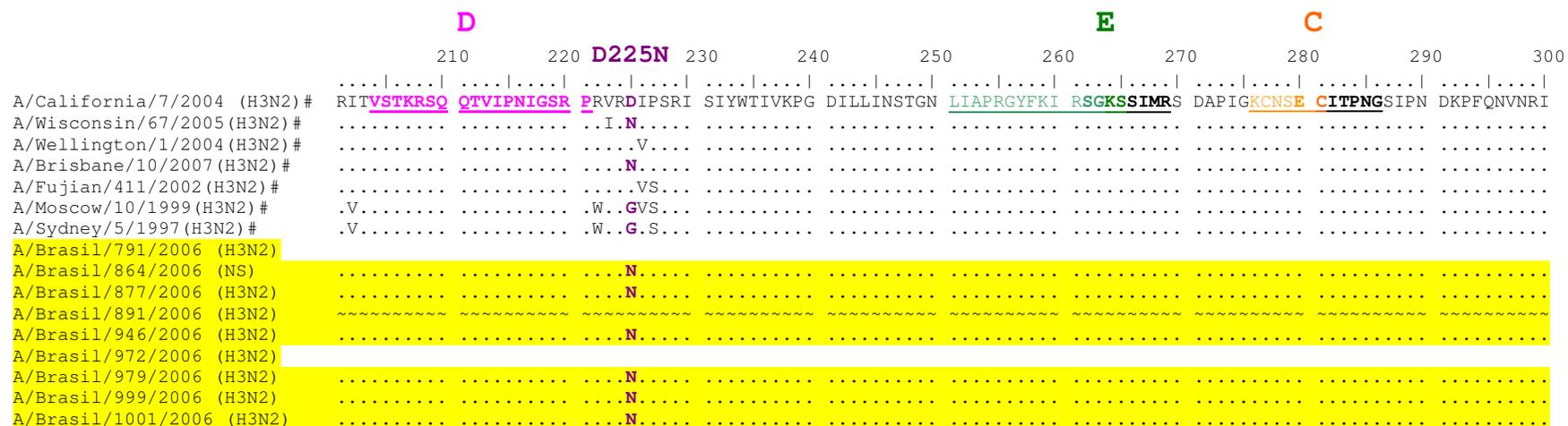


Figura 46 - Continuação. Representação do alinhamento de 300 aa aminoácidos da região HA1 da Hemaglutinina (correspondendo ao sítio 1 ao 200) de 8 amostras de *Influenzavirus* A H3N2 obtidas em 2006. Foram incluídas no alinhamento as cepas vacinais utilizadas no período de 1999 a 2008 (tabela 9). As seqüências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa vacinal A/California/7/2004 (H3N2) estão demonstrados. O (*) indica *stop codon*, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não sequenciado. Nos quadrados estão representados os aminoácidos conservados do sítio de ligação aos receptores. Os resíduos de aminoácidos previamente identificados como pertencentes aos sítios antigênicos (A a E) estão sublinhados e representados pelas cores: A, B, C, D, E estão representadas as diferenças encontradas com relação à cepa vacinal de 2006.

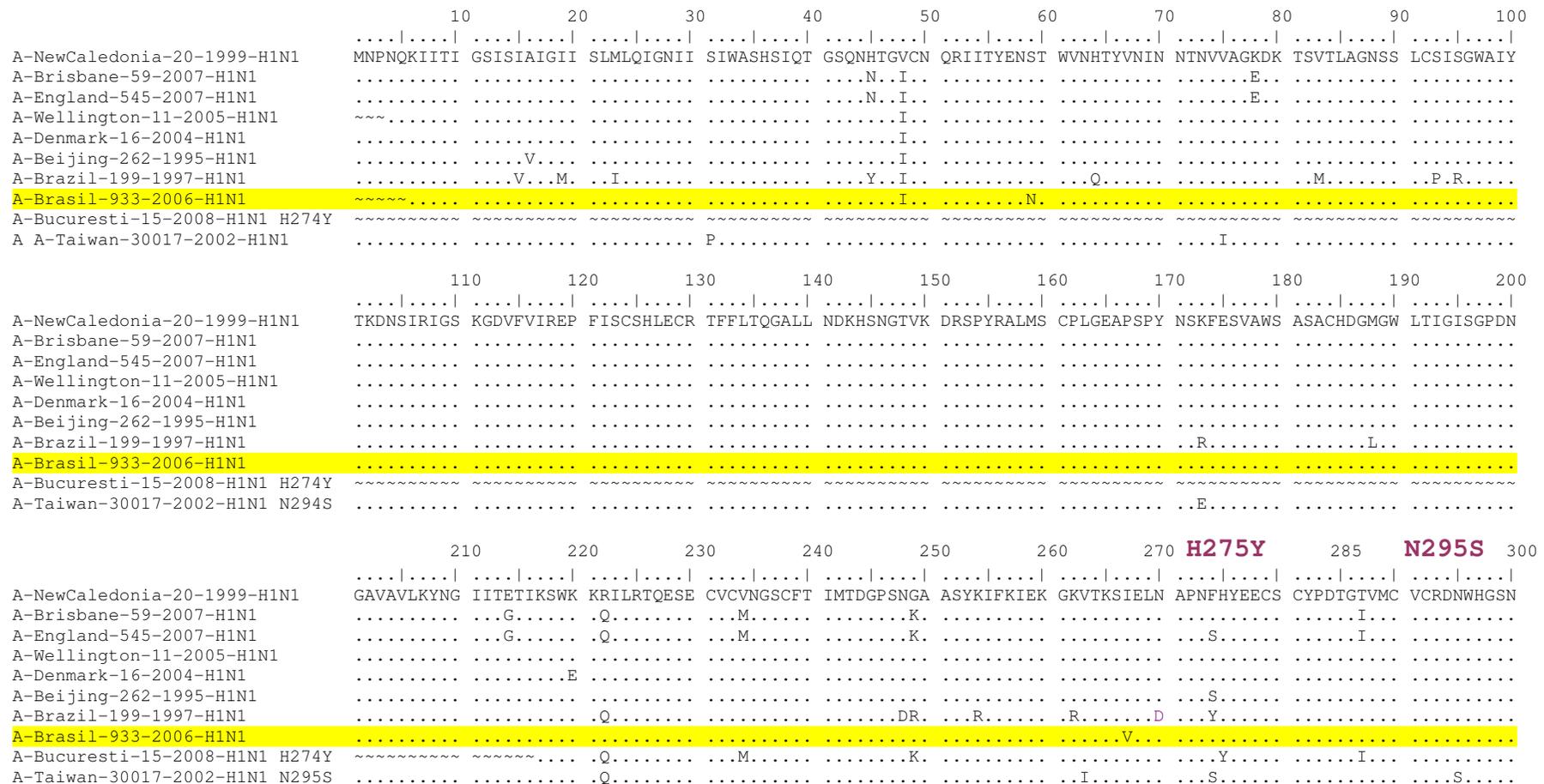


Figura 47 - Representação do alinhamento das sequencias de aminoácidos da 478 aminoácidos da Neuraminidase de 1 amostra brasileira de *Influenzavirus A* H1N1, correspondendo aos resíduos 1 ao 471. Foram incluídas no alinhamento amostras que apresentam sítios de resistência aos antivirais Zanamivir e Oseltamivir. Em lilás estão demonstrados os principais sítios que implicados no desenvolvimento de resistência aos inibidores da Neuraminidase: H275Y e N295S. As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa A/NewCaledonia/20/1999 estão demonstrados. (*) indica *stop codon*, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não sequenciado.

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
A-NewCaledonia-20-1999-H1N1	RPWVSFNQNL	DYQIGYICSG	VFGDNP RP KD	GE GSCNPVTV	DGADGVKGF S	YKYGN G V W I G	RTKSNRLRKG	FEMIWDPNGW	TD TDSDFSVK	QDVVAITDWS
A-Brisbane-59-2007-H1N1E.N.....D.....V.....N.....
A-England-545-2007-H1N1E.N.....D.....N.....
A-Wellington-11-2005-H1N1K.....M..
A-Denmark-16-2004-H1N1K.....
A-Beijing-262-1995-H1N1R.....M.....
A-Brazil-199-1997-H1N1R.....M.....M.....
A-Brasil-933-2006-H1N1K.....
A-Bucuresti-15-2008-H1N1 H274YE.N.....
A-Taiwan-30017-2002-H1N1 N294SN.....E.....D...D..N.....
	410	420	430	440	450	460	470			
A-NewCaledonia-20-1999-H1N1	GYSGS FVQHP	ELTGLDCIRP	CFWVELVRGL	PRENTTIWTS	GSSISFCGVN	SDTANWSWPD	G AELPFTIDK*			
A-Brisbane-59-2007-H1N1*
A-England-545-2007-H1N1*
A-Wellington-11-2005-H1N1D.....*
A-Denmark-16-2004-H1N1D.....*
A-Beijing-262-1995-H1N1R.....*
A-Brazil-199-1997-H1N1M.....E..D.....*
A-Brasil-933-2006-H1N1D.....I.....*			
A-Bucuresti-15-2008-H1N1 H274Y
A-Taiwan-30017-2002-H1N1 N294SV.....K.....*

Figura 47 - Continuação. Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos da 478 aminoácidos da Neuraminidase de 1 amostra brasileira de *Influenzavirus* A H1N1, correspondendo aos resíduos 1 ao 471. Foram incluídas no alinhamento amostras que apresentam sítios de resistência aos antivirais Zanamivir e Oseltamivir. Em lilás estão demonstrados os principais sítios que implicados no desenvolvimento de resistência aos inibidores da Neuraminidase: H275Y e N295S. As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa A/NewCaledonia/20/1999 estão demonstrados. (*) indica *stop codon*, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não sequenciado.

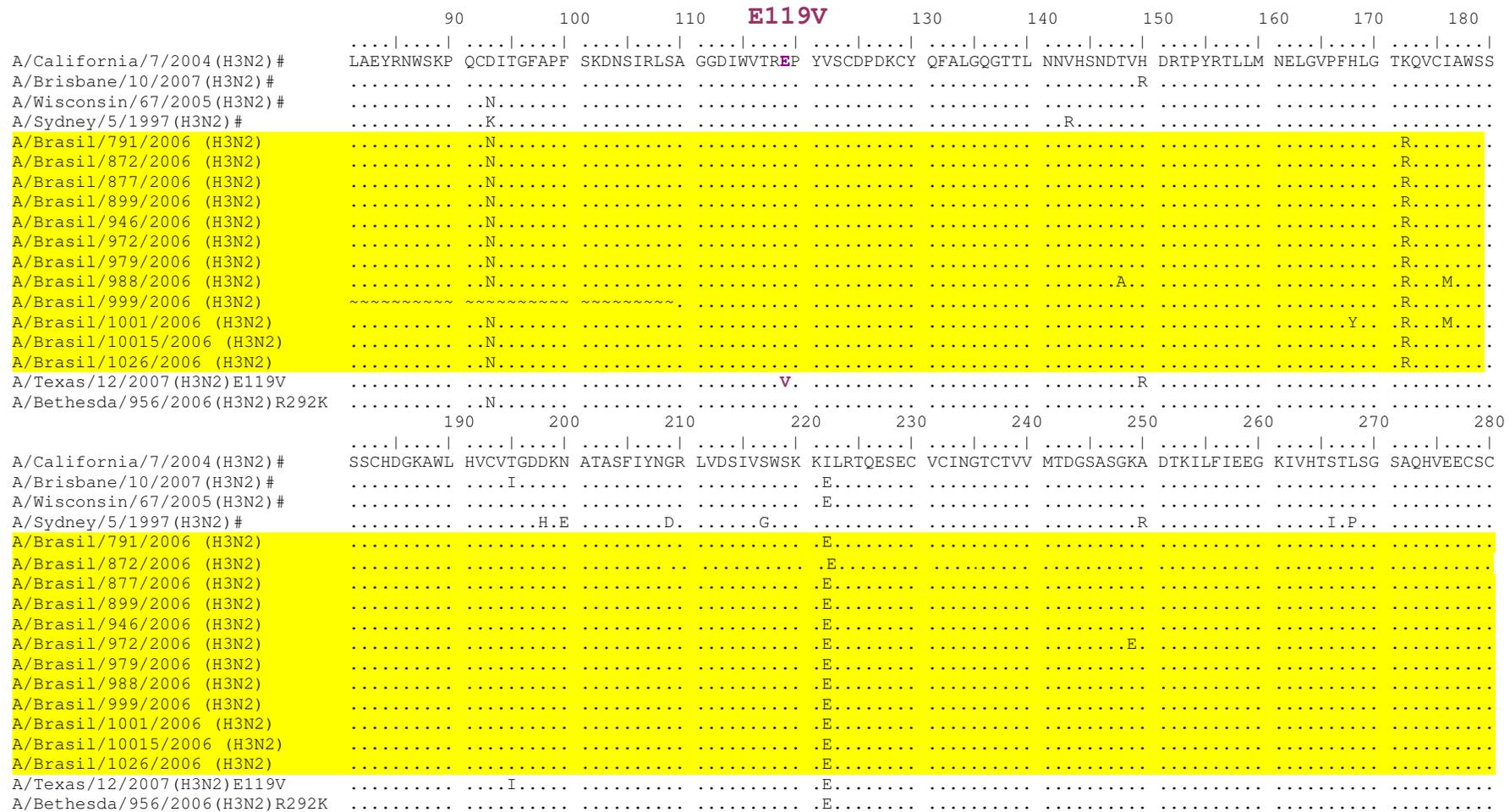


Figura 48 - Representação do alinhamento das sequencias de aminoácidos da 299 aminoácidos da Neuraminidase de 12 amostras brasileiras de *Influenzavirus* A H3N2, correspondendo aos resíduos 80 ao 380. Foram incluídas no alinhamento amostras que apresentam sítios de resistência aos antivirais Zanamivir e Oseltamivir (Anexo D). Em azul estão demonstrados os principais sítios que caracterizam a resistência aos inibidores da Neuraminidase: E119V e R292K (R152K, e N293S não estão incluídos). As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa A/California/7/2004 (H3N2) estão demonstrados. (*) indica stop codon, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não sequenciado.

	R293K	310	320	330	340	350	360	370	380	390
A/California/7/2004 (H3N2) #
A/Brisbane/10/2007 (H3N2) #	CYPRYPGVRC	VCRD [*] NWKGSN	RPIVDINIKD	YSIVSSYVCS	GLVGDTPRKN	DSSSSSHCLD	PNNEEGGHGV	KGWAFDDGND	VWMGRTISEK	LRSGYETFKV
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) #L.....	S.L.....
A/Sydney/5/1997 (H3N2) #V.....N.....	F.....
A/Brasil/791/2006 (H3N2)
A/Brasil/872/2006 (H3N2)
A/Brasil/877/2006 (H3N2)
A/Brasil/899/2006 (H3N2)
A/Brasil/946/2006 (H3N2)
A/Brasil/972/2006 (H3N2)H.....
A/Brasil/979/2006 (H3N2)
A/Brasil/988/2006 (H3N2)L.....
A/Brasil/999/2006 (H3N2)L.....
A/Brasil/1001/2006 (H3N2)
A/Brasil/10015/2006 (H3N2)
A/Brasil/1026/2006 (H3N2)
A/Texas/12/2007 (H3N2) E119VH.....	S.L.....
A/Bethesda/956/2006 (H3N2) R292KK.....G.....S.....

Figura 48 – Continuação. Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos da 299 aminoácidos da Neuraminidase de 12 amostras brasileiras de *Influenzavirus* A H3N2, correspondendo aos resíduos 80 ao 380. Foram incluídas no alinhamento amostras que apresentam sítios de resistência aos antivirais Zanamivir e Oseltamivir (Anexo D). Em azul estão demonstrados os principais sítios que caracterizam a resistência aos inibidores da Neuraminidase: E119V, R152K (E119V e R292K (R152K, e N293S não estão incluídos)). As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa A/California/7/2004 (H3N2) estão demonstrados. (*) indica stop codon, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não sequenciado.

```

          10      20  26/27 30 31/34 40      50      60      70      80      90
A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1)  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
A/Beijing/262/1995 (H1N1)    ~~~~~~.  ....|....|  G.....TI..  N...L..T.  ..L...F.C  ..R..Y...  ....D...K  .....K..  .SY.....  CS
A/Brasil/854/2006 (H1N1)    ~~~~~~.  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|  ....|....|
A/Canterbury/53/2001 (H1N1) #  ....|....|  ....|....|  ..E.....  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|
A/Hanfang/411/2001 (H1N1) #  ....|....|  ....|....|  ..A.....  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|
A/Sichuan/401/1997 (H1N1) #  ....|....|  ....|....|  .....|....|  ..L...L...  ..L...F.C  ..L.....  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|
A/Hong Kong/2652/2006 (H1N1) #  ....|....|  ....|....|  .....|....|  ..N.....  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|
A/Sendai/TU101/2006 (H1N1) #  ....|....|  ....|....|  .....|....|  ..E.....  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|  .....|....|

```

Figura 49 - Representação do alinhamento das sequencias de 98 aminoácidos da Matriz (M2) de 1 amostra brasileiras de *Influenzavirus* A H1N1. Foram incluídas no alinhamento sequencias que apresentam sítios de resistência aos antivirais *Amantadine* e *Rimantadina* (L26F, V27A, A30T, S31N e G34E). As seqüências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa A/NewCaledonia/20/1999(H1N1) estão demonstrados. (*) indica *stop codon*, (#) cepas com sítios de resistência, (-) indica o fragmento não sequenciado. Os resíduos sublinhados correspondem aos sítios de resistencia.

	10	20	26/27	30	31/34	40	50	60	70	80	90	
A/California/7/2004 (H3N2)	MSLLTEVETP	IRNEWGCRCN	DSSDPLVVA	SIIGILHLIL	WILDRLEFFKC	VYRLFKHGLK	RGPSTEGVPE	SMREEYRKEQ	QNAVDADDSQ	FVSIELE*		
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Fujian/411/2002 (H3N2)	H	
A/Brasil/791/2006 (H3N2)	<u>V</u>	H	*
A/Brasil/872/2006 (H3N2)	<u>V</u>	H	*
A/Brasil/877/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Brasil/891/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Brasil/899/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Brasil/903/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Brasil/956/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Brasil/946/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Brasil/972/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Brasil/979/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Brasil/1001/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Brasil/1015/2006 (H3N2)	<u>N</u>	H	*
A/Dunedin/8/2002 (H3N2) #	<u>F</u>	I.....	H	
A/Beijing/30/2005 (H3N2) #	<u>A</u>	H	
A/Canterbury/200/2004 (H3N2) #	<u>T</u>	H	*
A/Malaysia/434/2004 (H3N2) #	<u>N</u>	H	

Figura 50 - Representação do alinhamento das sequencias de 98 aminoácidos da Matriz (M2) de 12 amostras brasileiras de *Influenzavirus A H1N1*. Foram incluídas no alinhamento sequencias que apresentam sítios de resistência aos antivirais *Amantadine e Rimantadina* (L26F, V27A, A30T, S31N). As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa A/California/7/2004(H3N2) estão demonstrados. (*) indica *stop codon*, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não sequenciado. Os resíduos sublinhados correspondem aos sítios de resistência.

		360	370	380	390	400	410	420	430	440	450
A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1) #
A/Hong Kong/427/1998 (H1N1)	RVLPRGKLS	RGVQIASNEN	MDAIVSSTLE	LRSRYWAIRT	RSGGNTNQQR	ASAGQISTQP	TFSVQRNLPF	DKTTIMAAFT	GNTEGRTSDM	RAEIIKMMES	
A/Brasil/789/2006 (H1N1)
A/Brasil/859/2006 (H3N2)
A/Denmark/16/2004 (H1N1)
A/England/545/2007 (H1N1)
A/Brisbane/59/2007 (H1N1) #
		460	470	480	490	500					
A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1) #	ARPEEVSFQ	RGVFELSDEK	ATNP								
A/Hong Kong/427/1998 (H1N1)
A/Brasil/789/2006 (H1N1)
A/Brasil/859/2006 (H3N2)
A/Denmark/16/2004 (H1N1)
A/England/545/2007 (H1N1)
A/Brisbane/59/2007 (H1N1) #

Figura 51 - Representação do alinhamento de 100 aa aminoácidos da Nucleoproteína, correspondendo a posição 350 a 500 da cepa vacinal A/NewCaledonia/20/1999(H1N1)) de 2 amostras de *Influenzavirus A H1N1* obtidas em 2006. Foram incluídas no alinhamento as cepas vacinais utilizadas no período de 1999 a 2008 (tabela 9). As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa vacinal A/NewCaledonia/20/1999(H1N1) estão demonstrados. O (*) indica *stop codon*, (#) cepas vacinais, (-) indica o fragmento não sequenciado.

	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	
A/California/7/2004 (H3N2)#										
	KVSPRGKLS	RGVQIASNEN	MDNMGSSSTLE	LRSGYWAI	RSGGNTNQQR	ASAGQTSVQP	TFSVQRNL	PF EKSTIMAAFT	GNTEGRTSDM	RAEIIRMMEG	
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)#										
A/Brasil/840/2006 (H1N1)										
A/Brasil/872/2006 (H3N2)										
A/Brasil/877/2006 (H3N2)										
A/Brasil/891/2006 (H3N2)										
A/Brasil/903/2006 (H3N2)										
A/Brasil/946/2006 (H3N2)										
A/Brasil/988/2006 (H3N2)										
A/Brasil/999/2006 (H3N2)										
A/Brasil/1015/2006 (H3N2)										
A/Brasil/1001/2006 (H3N2)										
	460	470	480	490							
A/California/7/2004 (H3N2)#										
	AKPEEV	SFRG RGVFELSDEK	AANPIVPSFD	MSNEGSYFFG	DNAKEYDN*						
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)#										
										
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2)#										
										
A/Brasil/840/2006 (H1N1)										
										
A/Brasil/872/2006 (H3N2)										
										
A/Brasil/877/2006 (H3N2)										
										
A/Brasil/891/2006 (H3N2)										
										
A/Brasil/903/2006 (H3N2)										
										
A/Brasil/946/2006 (H3N2)										
										
A/Brasil/988/2006 (H3N2)										
										
A/Brasil/999/2006 (H3N2)										
										
A/Brasil/1015/2006 (H3N2)										
										
A/Brasil/1001/2006 (H3N2)										

Figura 52 - Representação do alinhamento de 140 aminoácidos da Nucleoproteína, correspondendo à posição 350 a 500 da amostra vacinal A/California/7/2004(H3N2), de 10 amostras de *Influenzavirus A* H3N2 obtidas em 2006. Foram incluídas no alinhamento as cepas vacinais utilizadas no período de 1999 a 2008 (tabela 9). As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa vacinal A/California/7/2004(H3N2) estão demonstrados. O (*) indica *stop codon*, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não sequenciado.

	150	160	170	180	190	200	210	220	
A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1) #	FTEEGAIVGE	ISPLPSLPGH	TNEDVKNAIG	VLIGGLEWND	NTVRVSETLQ	RFAWRSSNET	GGPPFTPTQK	RKMAGTIRSE	V*
A/Brisbane/59/2007 (H1N1) #F..T..T..	.*
A/Wellington/11/2005 (H1N1) #F..T..T..	.*
A/Denmark/16/2004 (H1N1) #F..Q.....T..*
A/Hong Kong/427/1998 (H1N1) #N*
A/Brasil/789/2006 (H1N1)F..T..T..	.*
A/Brasil/854/2006 (H1N1)	~.....F..T..T..	.*
A/England/545/2007 (H1N1)F..AT..T..	.*

Figura 53 - Representação do alinhamento das sequências de 82 aminoácidos da NS (posição 140 a 220 da amostra vacinal A/NewCaledonia/20/199 H1N1) de 2 amostras de *Influenzavirus A H1N1*, obtidas em 2006. Foram incluídas no alinhamento as cepas vacinais utilizadas no período de 1999 a 2008 (tabela 9). As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa vacinal A/NewCaledonia/20/1999 estão demonstrados. (*) indica *stop codon*, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não sequenciado.

	150	160	170	180	190	200	210	220	
A/Wellington/1/2004 (H3N2) #	FTEEGAIVGE	ISPLPSFPGH	TIEDVKNAIG	VLLGGLEWND	NTVVRVSKNLQ	RFAWRSSNEN	GGPPLTPKQK	RKMARTARSK	V*
A/Brisbane/10/2007 (H3N2) #E.....	*
A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) #	*
A/Fujian/411/2002 (H3N2) #K....	*
A/Moscow/10/1999 (H3N2) #	*
A/Brasil/877/2006 (H3N2)	*
A/Brasil/891/2006 (H3N2)	*
A/Brasil/946/2006 (H3N2)	.P.....	*
A/Brasil/956/2006 (H3N2)	*
A/Brasil/979/2006 (H3N2)	.P.....	*
A/Brasil/999/2006 (H3N2)	N.....	*
A/Brasil/1001/2006 (H3N2)	*
A/Brasil/1015/2006 (H3N2)	*

Figura 54 - Representação do alinhamento das sequências de 82 aminoácidos da NS de 8 amostras de *Influenzavirus* A H3N2 obtidas em 2006. Foram incluídas no alinhamento as cepas vacinais utilizadas no período de 1999 a 2008 (tabela 9). As sequências brasileiras estão indicadas em amarelo, representadas por “Brasil”, seguida do número da amostra e do ano de isolamento. Somente aminoácidos distintos da cepa vacinal A/NewCaledonia/20/1999 estão demonstrados. (*) indica *stop codon*, (#) cepas vacinais, (~) indica o fragmento não seqüenciado

4.5 Reconstruções filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas separadamente para cada um dos genes estudados (HA, NA, M2, NP e NS) pelo critério de distâncias evolutivas utilizando o programa PAUP. Em cada análise foram utilizadas as sequências das amostras brasileiras obtidas neste estudo, sequências de cepas vacinais recomendadas pela OMS (Tabela 9) e sequências de amostras isoladas de várias localidades da América do Sul obtidas do *GenBank*.

Um total de 37 sequências, correspondentes à região HA1 do gene da Hemaglutinina dos vírus Influenza A (H3N2) envolvendo cerca de 970 nucleotídeos e 36 sequências de Influenza A (H1N1), da mesma região foram analisadas. A topologia das árvores filogenéticas estão demonstradas na figura 55 (A - H3N2, B - H1N1 e C - H3N2 e H1N1). Os valores de *bootstrap* foram satisfatórios refletindo a boa sustentação dos ramos.

A análise envolvendo amostras do subtipo H3N2 revelou a presença de 2 grandes clados, sendo que primeiro continha amostras de anos anteriores a 2002 e o segundo clado todas as amostras mais recentes. Três amostras brasileiras (Br791, Br979 e Br 972) agruparam-se próximas a cepa vacinal utilizada em 2006 (A/California/7/2009). As demais amostras estavam mais relacionadas com as cepas vacinais utilizadas em anos subsequentes (em 2007 a cepa A/Wisconsin/67/2005 e em 2008 a cepa A/Brisbane/10/2007)

Duas amostras brasileiras, Br/859 e Br/864, identificadas neste estudo, não foram subtipadas pela multiplex-RT-PCR, entretanto o sequenciamento do gene HA e as análises realizadas, permitiram a classificação das mesmas como pertencentes ao subtipo H3N2.

Embora o número de amostras de H1N1 brasileiras tenha sido pequeno, a análise filogenética revelou a circulação de diferentes linhagens no mesmo ano, com uma amostra Br840 geneticamente mais relacionada com a cepa vacinal, utilizada no ano de 2006 (A/New caledonia/20/1999) e a outra mais próxima às cepas mais antigas, circulantes no final da década de 1990).

Um total de 27 sequências do gene da Neuraminidase dos vírus Influenza A (H3N2) e 24 sequências de Influenza A (H1N1), envolvendo cerca de 978 nucleotídeos, foram analisadas. A topologia das árvores filogenéticas está demonstradas na figura 56 (A - H3N2 e B - H1N1). Os valores de *bootstrap* foram satisfatórios refletindo a boa sustentação dos ramos.

Os genes N2 de 12 cepas brasileiras foram geneticamente relacionados entre si, agrupando-se em um mesmo clado, porém foram mais próximos da cepa vacinal utilizada em 2007 (ano subsequente a este estudo) do que a cepa vacinal A/Califórnia/7/2004. Esses dados foram, portanto, semelhantes aos obtidos com algumas amostras na análise da HA (Br1001, Br946, Br999 e Br877). Por outro lado, a análise com a única amostra brasileira do subtipo H1N1 demonstrou pouca relação com a cepa vacinal New Caledonia/20/1999.

Um total de 21 sequências do gene da Matriz dos vírus Influenza A (H3N2) e 10 sequências de Influenza A (H1N1), envolvendo cerca de 990 nucleotídeos, foram analisadas. A topologia das árvores filogenéticas estão demonstradas na figura 57 (A - H3N2, B - H1N1 e C - H1N1 e H3N2). Os valores de *bootstrap* foram satisfatórios refletindo a boa sustentação dos ramos.

O gene M das 10 amostras brasileiras de H3N2 agruparam-se em mesmo clado, demonstrando a pouca variabilidade deste gene. Quando analisamos as 2 amostras pertencentes ao subtipo H1N1 verificamos que a amostra 789 ficava completamente separada das demais. Para verificar a ocorrência de um possível rearranjo entre os genes, as 31 sequências de ambos os subtipos foram analisadas em conjunto, sendo certificado que o gene M desta amostra agrupou-se com sequências do subtipo H1, confirmando seu subtipo e a distância entre essa amostra e as cepas circulantes no mesmo ano (figura 57C), também verificado na análise da HA (figura 55 A e C).

Um total de dez sequências do gene da Nucleoproteína dos vírus Influenza A (H3N2) e duas sequências de Influenza A (H1N1), envolvendo cerca de 444 nucleotídeos, foram analisadas. A topologia das árvores filogenéticas está demonstradas na figura 58 (A - H3N2, B - H1N1 e C - H1N1 e H3N2). Os valores de *bootstrap* foram satisfatórios refletindo a boa sustentação dos ramos.

O gene NP das 9 amostras brasileiras, tanto do subtipo H1N1 como H3N2, agruparam-se em mesmo clado, demonstrando a pouca variabilidade deste gene. Quando analisamos as 2 amostras pertencentes ao subtipo H1N1 verificamos que a amostra 859, que não foi subtipada pela multiplex-RT-PCR, porém teve o gene da HA sequenciado e classificado como do subtipo H1, não agrupava-se com as demais amostras. Para verificar a ocorrência de um possível rearranjo entre os genes, 31 sequências de ambos os subtipos foram analisadas em conjunto. Verificou-se que o gene NP desta amostra agrupou-se com sequências do subtipo H3

confimando a hipótese de haver rearranjo entre os genes dessa amostra. Também verificou-se que a amostra 840, inicialmente subtipada como H1N1 pela multiplex e pelo sequenciamento do gene da HA, agrupou-se no clado formado pelas amostras do subtipo H3N2. Portanto, houve em nossas amostras dois rearranjos entre os subtipos H1N1 e H3N2 envolvendo os dois genes NP e HA. Infelizmente não foi possível obter sequências dos demais genes dessas duas amostras (figura 44).

Um total de oito sequências do gene da Proteína Não estrutural dos vírus Influenza A (H3N2), envolvendo cerca de 690 nucleotídeos, e duas sequências de Influenza A (H1N1) e envolvendo cerca de 240 nucleotídeos, foram analisadas. A topologia das árvores filogenéticas está demonstrada na figura 59 (A - H3N2 e B - H1N1). Os valores de *bootstrap* foram satisfatórios refletindo a boa sustentação dos ramos. No geral, tanto o gene NS1 do subtipo H1N1 como H3N2 apresentaram pouca variabilidade.

Os genes da NS1 das duas amostras brasileiras do subtipo H1N1 agruparam-se no mesmo clado e são geneticamente mais relacionados à cepa vacinal Brisbane/59/2207, utilizada em 2007 (ano subsequente a este estudo) do que da cepa utilizada no ano de 2006 (A/NewCaledônia/20/1999). O gene da NS1 de oito amostras brasileiras de H3N2 também agruparam-se em um mesmo clado. Próximas às amostras brasileiras, encontram-se as cepas vacinais utilizadas em anos anteriores aos das amostras.

Ressaltamos que pela análise dos genes da NP e NS1 a amostra 789, do subtipo H1N1, agrupou-se com a cepa vacinal utilizada em 2006 e com amostras circulantes no mesmo ano, diferentemente do verificado pela análise dos genes da HA e M.

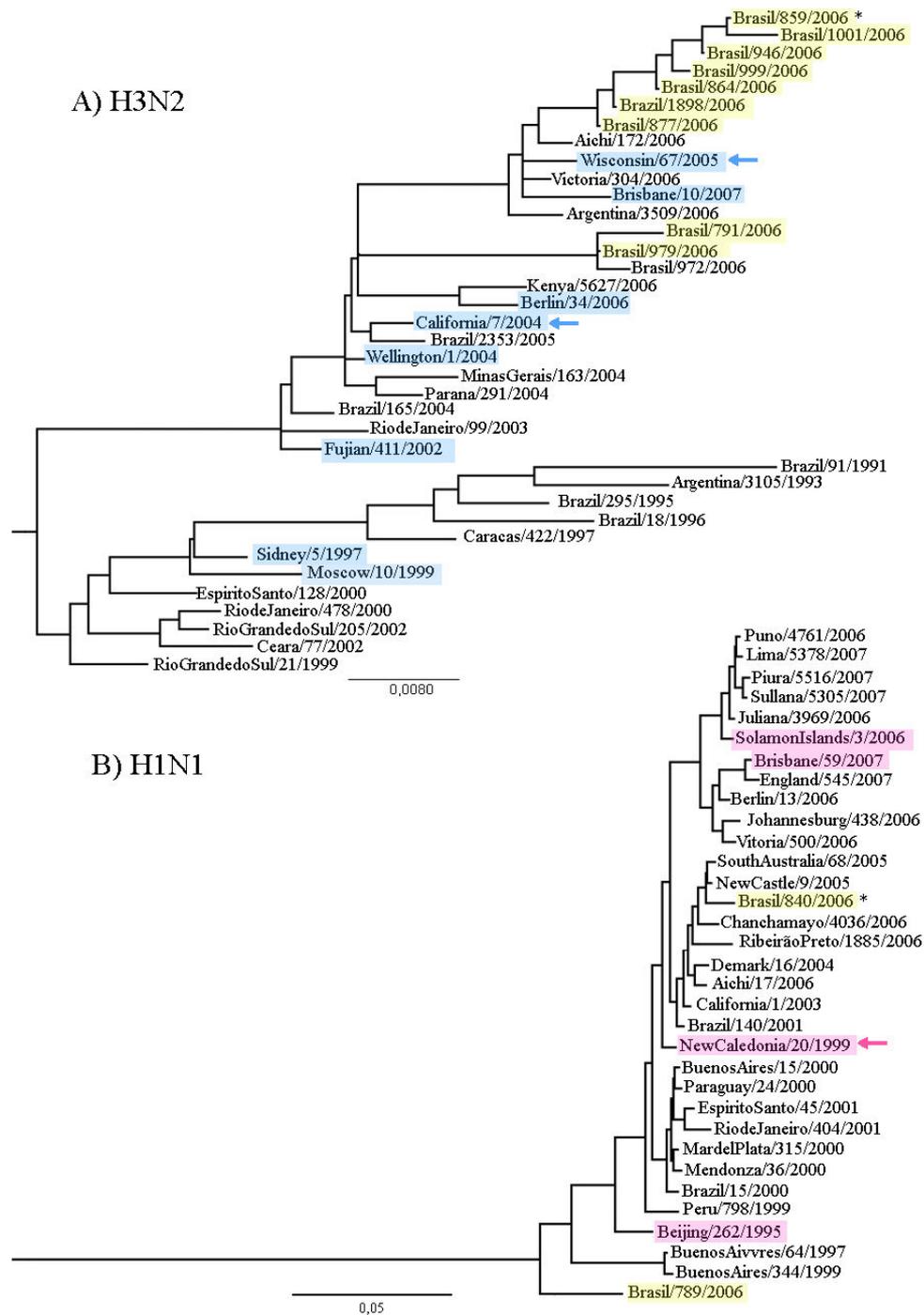


Figura 55 - Topologia das árvores obtidas pelo critério de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo *NeighborJoining* das seqüências brasileiras da Hemaglutinina dos vírus Influenza A. As amostras brasileiras obtidas neste estudo estão representadas em amarelo. **A)** Subtipo (H3N2), com as cepas vacinais representadas em azul; e **B)** Subtipo (H1N1) mostrando as cepas vacinais em rosa. Amostras indicadas com (*) apresentaram rearranjo entre genes. As setas representam as cepas vacinais utilizadas em 2006 nos hemisférios Norte e Sul. **C)** Topologia da árvore de 73 sequências de Influenza A subtipos H1N1 e H3N2.

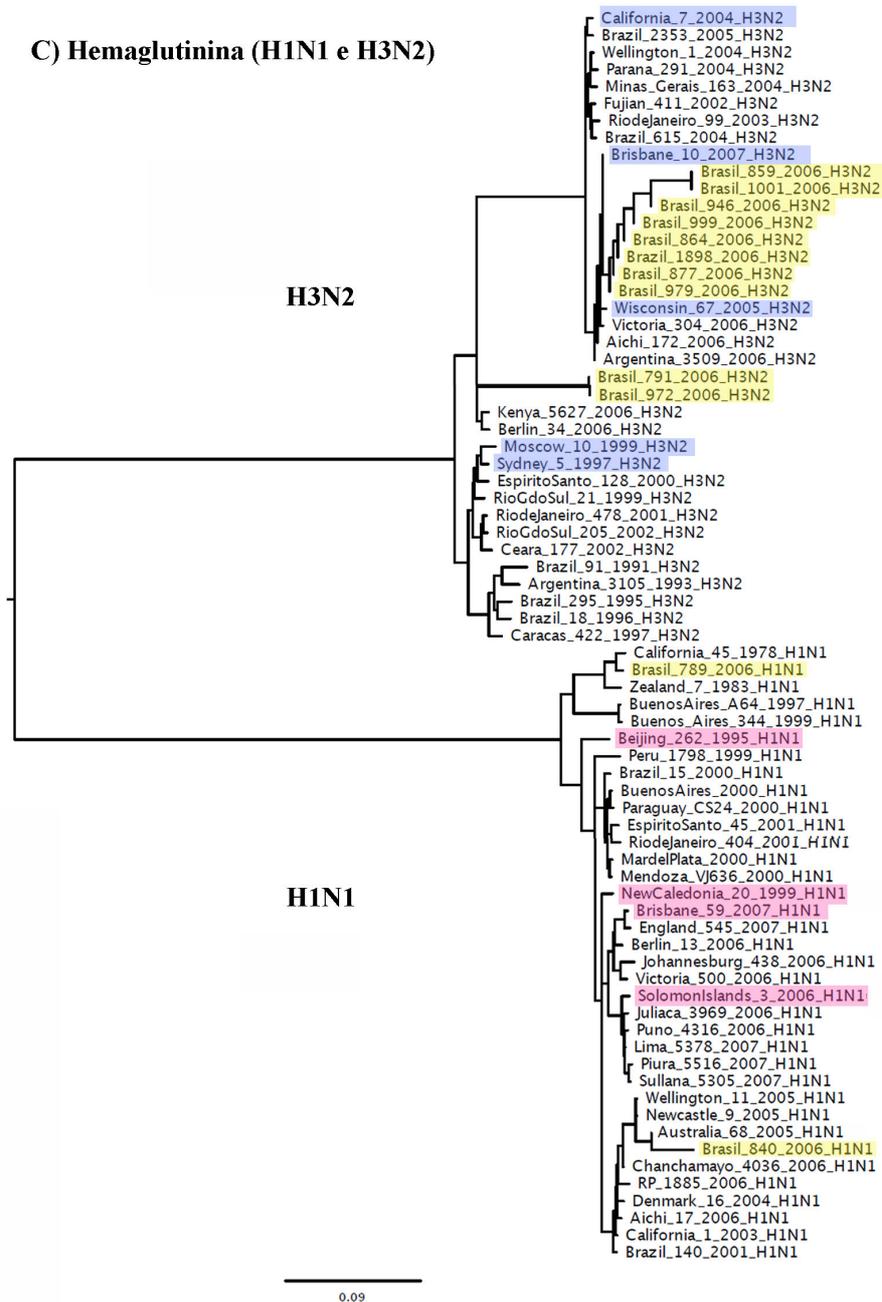


Figura 55 – Continuação. Topologia das árvores obtidas pelo critério de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo *NeighborJoining* das seqüências brasileiras da Hemaglutinina dos vírus Influenza A. As amostras brasileiras obtidas neste estudo estão representadas em amarelo. **A)** Subtipo (H3N2), com as cepas vacinais representadas em azul; e **B)** Subtipo (H1N1) mostrando as cepas vacinais em rosa. Amostras indicadas com (*) apresentaram rearranjo entre genes. As setas representam as cepas vacinais utilizadas em 2006 nos hemisférios Norte e Sul. **C)** Topologia da árvore de 73 sequências de Influenza A subtipos H1N1 e H3N2.

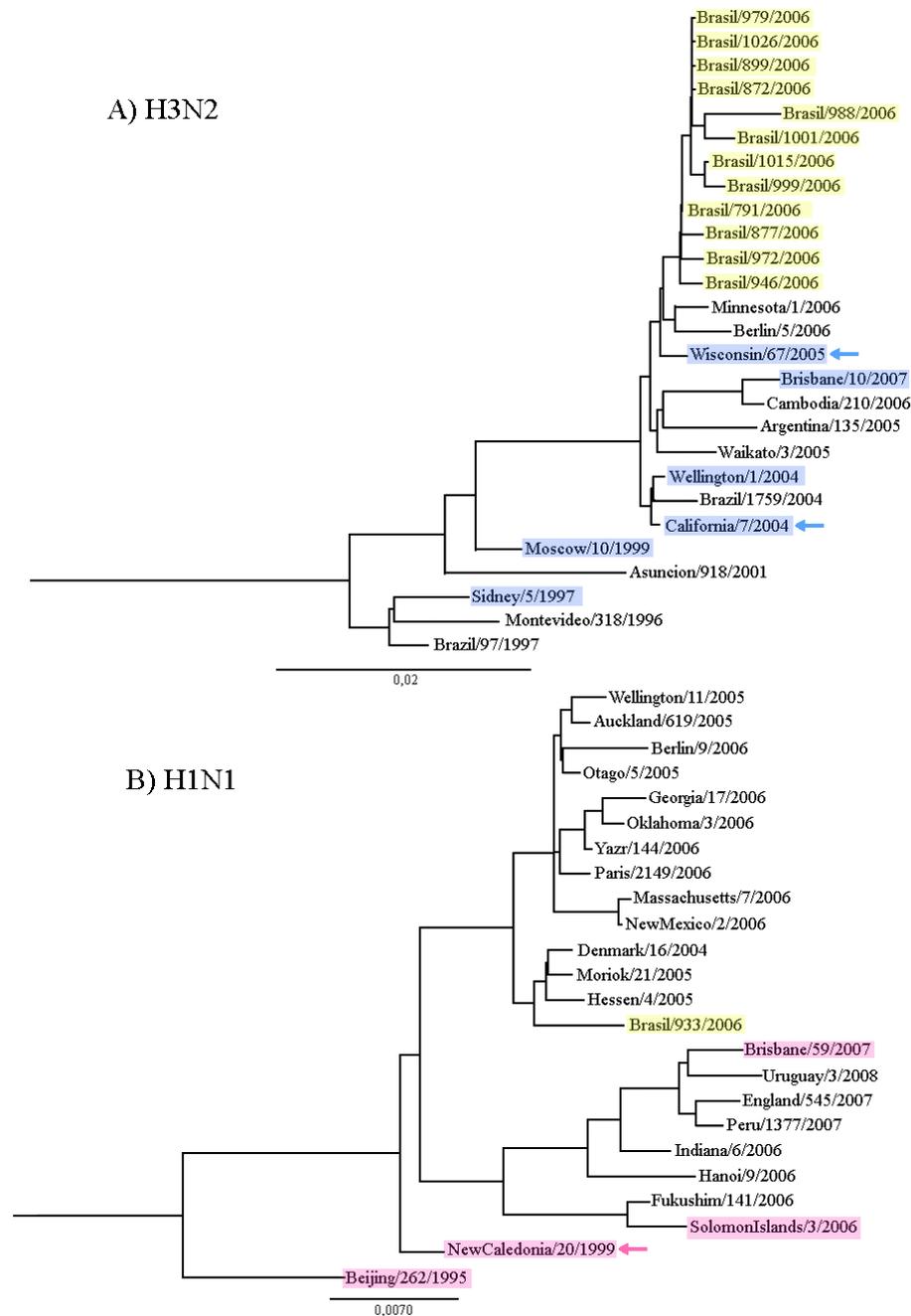


Figura 56 - Topologia das árvores obtidas pelo critério de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo NeighborJoining das seqüências brasileiras do gene da Neuraminidase dos vírus Influenza A. As amostras brasileiras obtidas neste estudo estão representadas em amarelo. **A)** Subtipo (H3N2) mostrando as cepas vacinais em azul; e **B)** Subtipo (H1N1) com as cepas vacinais representadas em rosa. As setas representam as cepas vacinais utilizadas em 2006 nos hemisférios Norte e Sul.

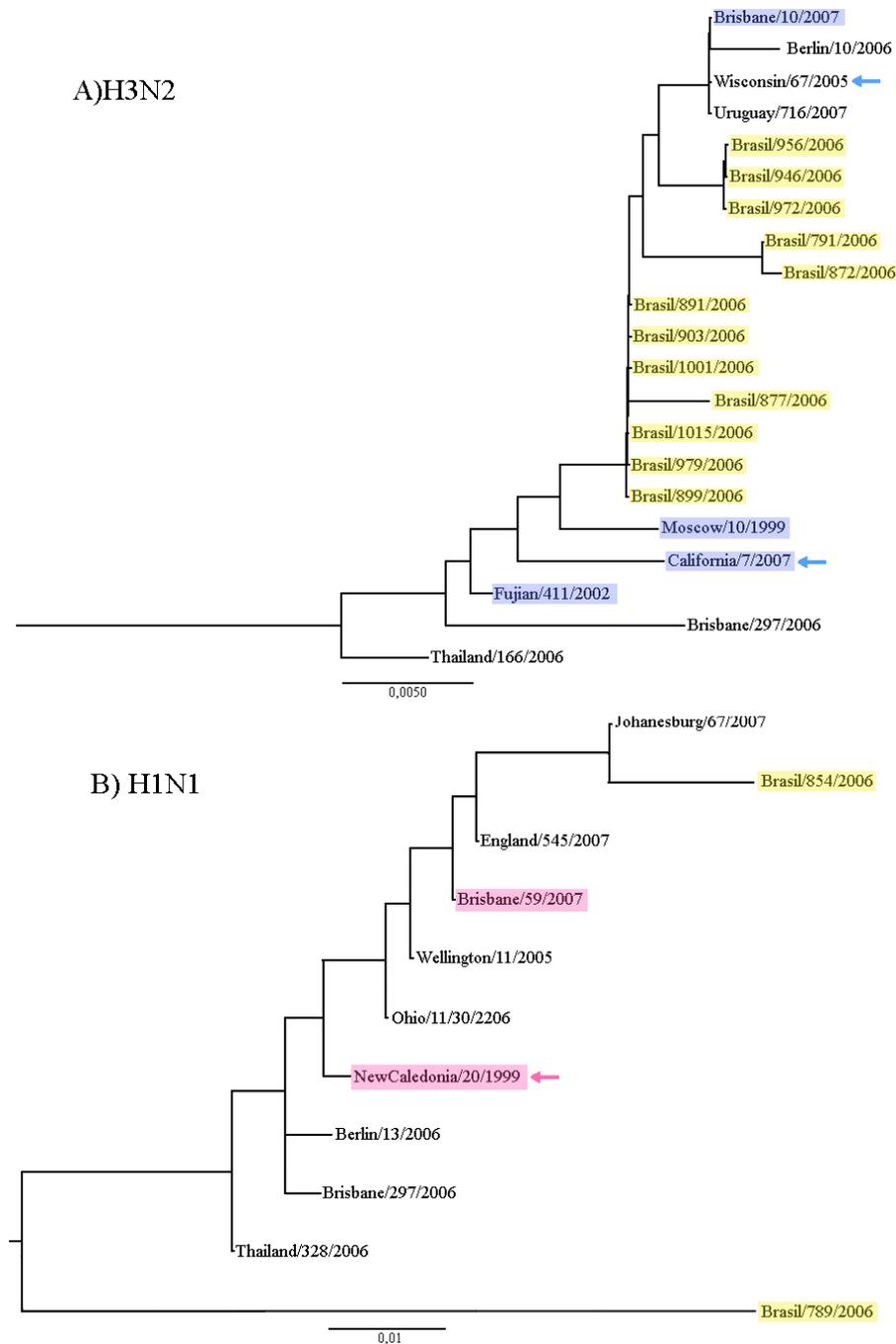


Figura 57 - Topologia das árvores obtidas pelo critério de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo NeighborJoining das seqüências brasileiras do gene da Matriz dos vírus Influenza A. As amostras brasileiras obtidas neste estudo estão representadas em amarelo. **A)** Subtipo (H3N2) mostrando as cepas vacinais em azul; **B)** Subtipo (H1N1) com as cepas vacinais representadas em rosa. As setas representam as cepas vacinais utilizadas em 2006 nos hemisférios Norte e Sul. Os valores de *bootstrap* estão representados nos ramos das árvores; e **C)** Topologia da árvore de 32 sequências de Influenza A subtipos H1N1 e H3N2

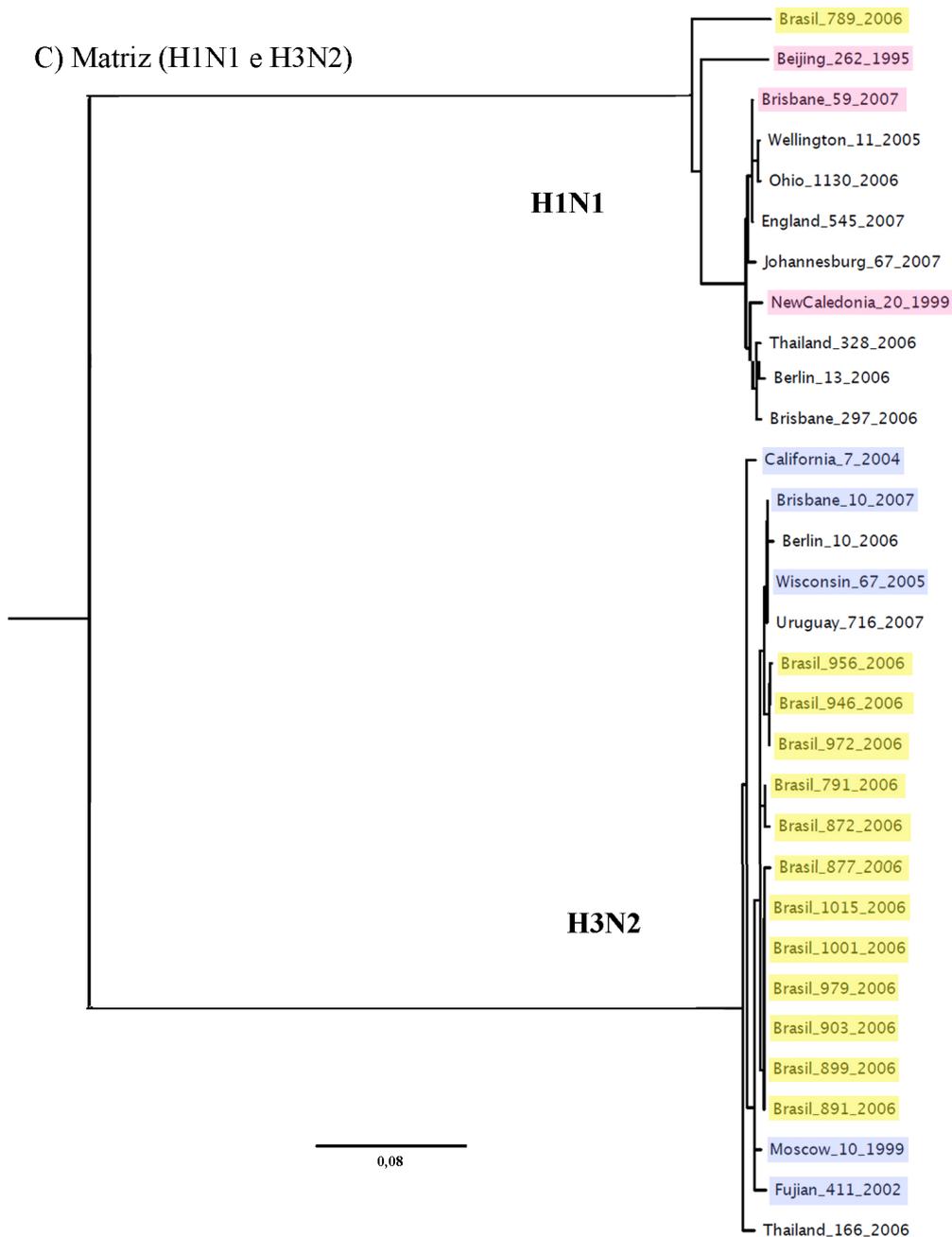


Figura 57 – Topologia das árvores obtidas pelo critério de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo NeighborJoining das seqüências brasileiras do gene da Matriz dos vírus Influenza A. As amostras brasileiras obtidas neste estudo estão representadas em amarelo. **A)** Subtipo (H3N2) mostrando as cepas vacinais em azul; **B)** Subtipo (H1N1) com as cepas vacinais representadas em rosa. As setas representam as cepas vacinais utilizadas em 2006 nos hemisférios Norte e Sul. Os valores de *bootstrap* estão representados nos ramos das árvores; e **C)** Topologia da árvore de 32 sequencias de Influenza A subtipos H1N1 e H3N2

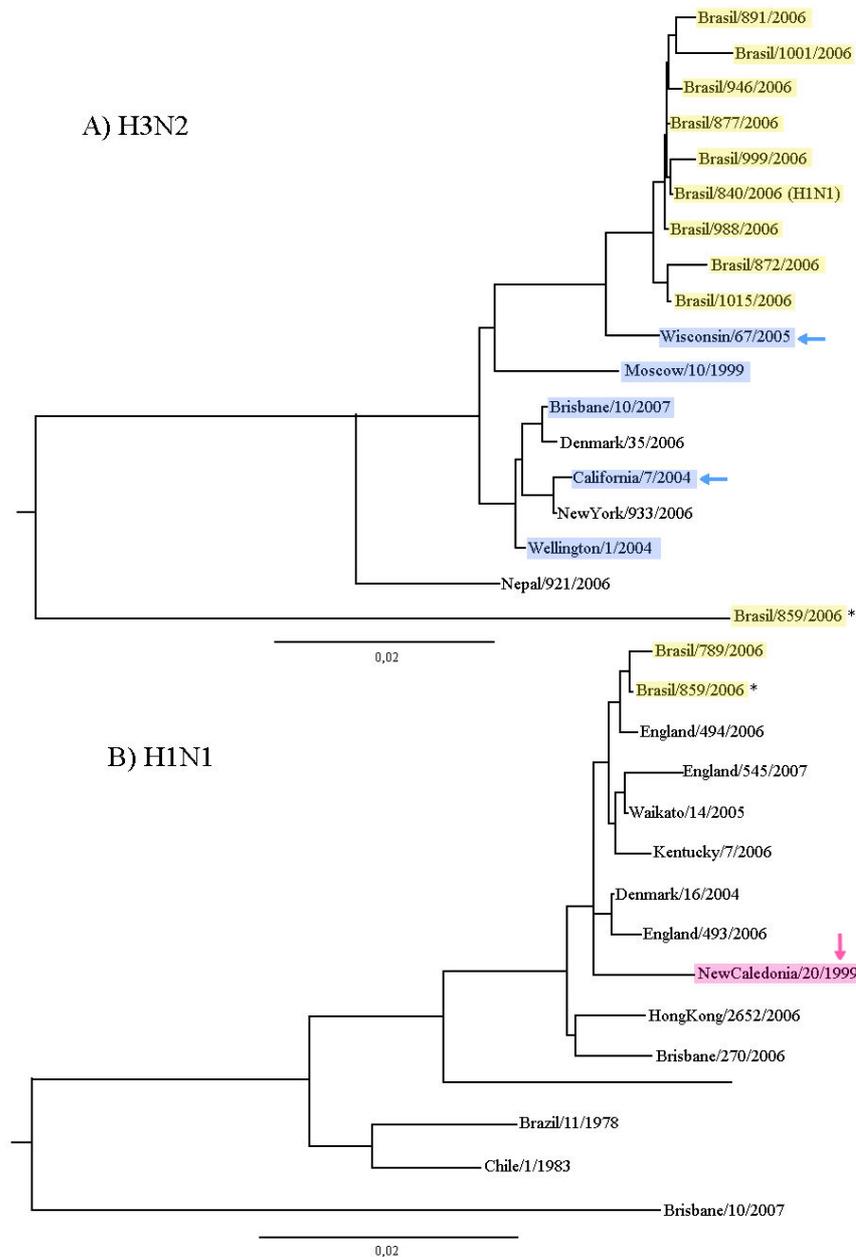


Figura 58 - Topologia das árvores obtidas pelo critério de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo NeighborJoining das seqüências brasileiras da Nucleoproteína dos vírus Influenza A. As amostras brasileiras obtidas neste estudo estão representadas em amarelo. **A)** Subtipo (H3N2) onde as cepas vacinais estão representadas em azul; **B)** Subtipo (H1N1) com as cepas vacinais representadas em rosa. As setas representam as cepas vacinais utilizadas em 2006 nos hemisférios Norte e Sul. Os valores de *bootstrap* estão representados nos ramos das árvores. **C)** Topologia da árvore de 32 sequencias de Influenza A subtipos H1N1 e H3N2 A amostra indicada com (*) indica possibilidade de rearranjo entre genes.

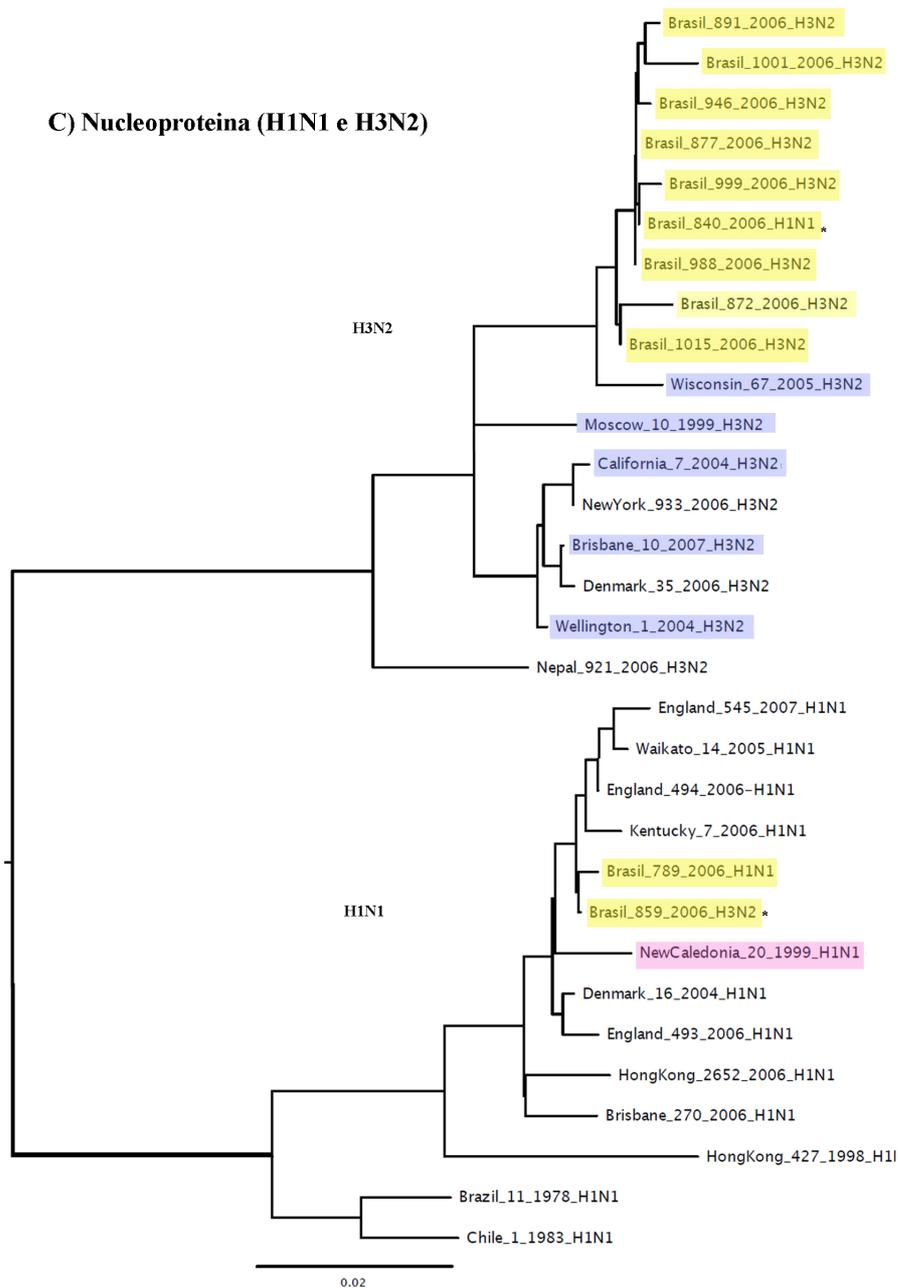


Figura 58 – Topologia das árvores obtidas pelo critério de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo NeighborJoining das seqüências brasileiras da Nucleoproteína dos vírus Influenza A. As amostras brasileiras obtidas neste estudo estão representadas em amarelo. **A)** Subtipo (H3N2) onde as cepas vacinais estão representadas em azul; **B)** Subtipo (H1N1) com as cepas vacinais representadas em rosa. As setas representam as cepas vacinais utilizadas em 2006 nos hemisférios Norte e Sul. Os valores de *bootstrap* estão representados nos ramos das árvores. **C)** Topologia da árvore de 32 sequências de Influenza A subtipos H1N1 e H3N2 A amostra indicada com (*) indica possibilidade de rearranjo entre genes.

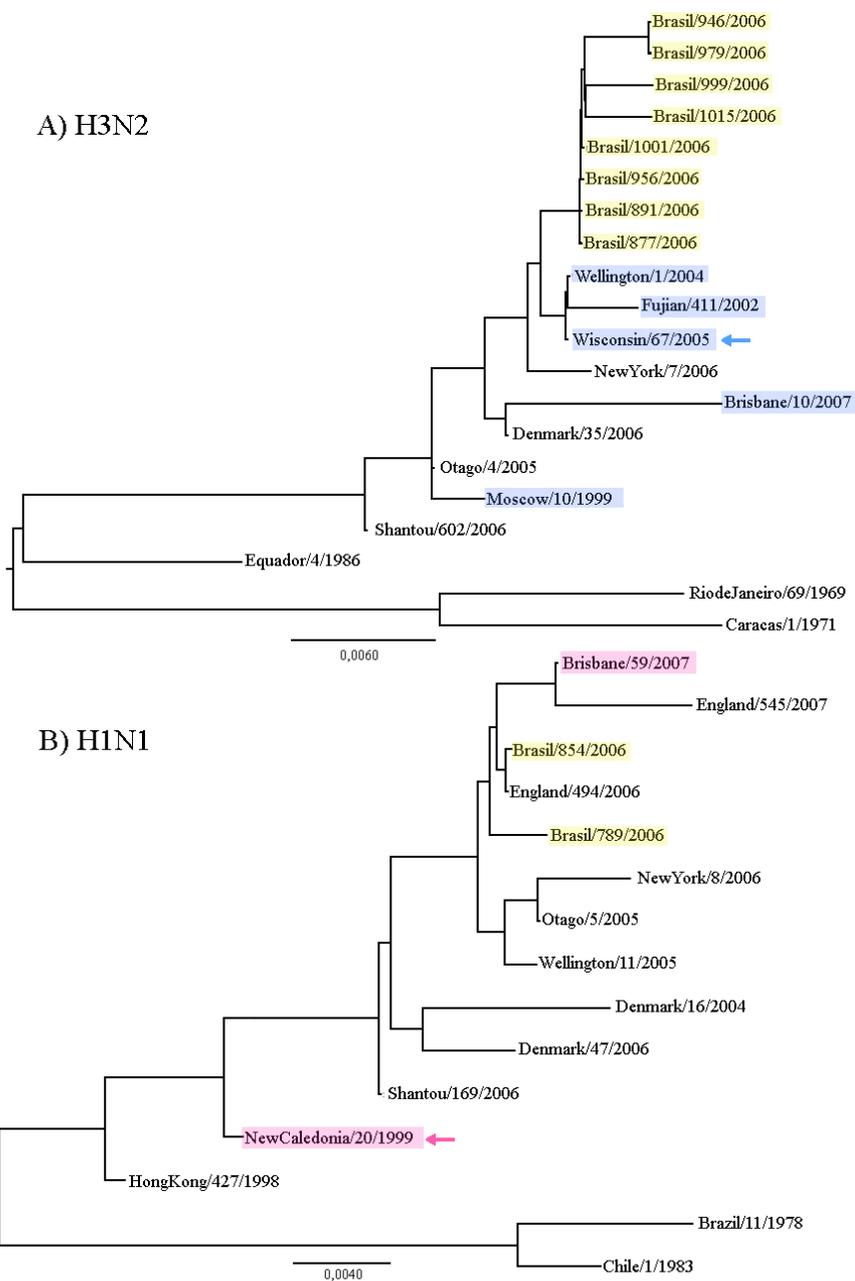


Figura 59 - Topologia das árvores obtidas pelo critério de distâncias evolutivas utilizando o algoritmo NeighborJoining das seqüências brasileiras da Proteína Não Estrutural dos vírus Influenza A. As amostras brasileiras obtidas neste estudo estão representadas em amarelo. **A)** Subtipo (H3N2), onde as cepas vacinais estão representadas em azul **B)** Subtipo (H1N1), onde as cepas vacinais estão representadas em rosa. As setas representam as cepas vacinais utilizadas em 2006 nos hemisférios Norte e Sul.

5 DISCUSSÃO

A gripe é uma doença infecciosa causada pelo vírus influenza que acomete o trato respiratório atingindo, anualmente mais de 100 milhões de pessoas e ocasionando a morte de 20 a 40 mil indivíduos, apenas nos EUA. Uma característica marcante desse vírus é sua extensa e contínua variação antigênica e genética, principalmente no que se refere às suas glicoproteínas de superfície (HA e NA), que associado à facilidade de transmissão do vírus, garante seu sucesso epidemiológico, inserindo o influenza no “hall” de doenças emergentes e reemergentes (TONIOLLO NETO et al., 2003).

No presente estudo um total de 521 amostras foram colhidas, durante o ano de 2006, de crianças menores de 5 anos atendidas no Hospital Universitário da USP, das quais 29 (5,5%) foram positivas pela Duplex-RT-PCR, sendo 25 (87%) positivas para o vírus Influenza A e 4 (13%) para o Influenza B. A baixa porcentagem anual de infecção pelo vírus Influenza em crianças menores de 5 anos é relatada por diversos autores, tanto no Brasil como em outras localidades do mundo que descreveram uma positividade em crianças internadas menores de 5 anos de idade variando entre 2,4% a 10% (ALBUQUERQUE et al., 2009; VIEIRA et al., 2001; THOMAZELLI, 2004; OLIVEIRA, 2004; LEAL, 2005; VEDOVELLO, 2006; COELHO, 2007).

Por outro lado, Neuzil et al. (2002) descreveram porcentagens mais elevadas de infecção anual em crianças em idade escolar (15%) e idade pré-escolar (42%) e Oliveira et al. (2004) descreveram que na cidade de Maceió, no Nordeste de Brasil, a prevalência do vírus de influenza A aumentou gradativamente com aumento da idade dos pacientes investigados, correspondendo a 10% nas crianças entre 5 e 14 anos.

É necessário levar em consideração, entretanto, que as amostras utilizadas nesse estudo fazem parte da coleção do laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB-SP e vêm sendo utilizadas para a execução de um grande projeto, que visa estudar a variabilidade dos diversos vírus respiratórios. Portanto, embora as amostras clínicas fossem colhidas, transportadas e armazenadas da maneira adequada para realizar-se o diagnóstico dos vírus respiratórios (LANDRY, 2011; DWYER et al., 2006), as mesmas podem ter sofrido alguns ciclos de descongelamento e congelamento durante os anos, podendo levar a perda da infectividade e degradação do ácido nucléico, levando a resultados falso negativos pelas técnicas utilizadas. Halfon et al. (1996) já demonstraram a perda de título do HCV (Vírus da Hepatite C, também de RNA) em até 10% em amostras congeladas a -80 °C e 16% de diminuição nesses níveis quando sofreram até 5 ciclos de descongelamento.

No ano de 2006 a circulação do vírus Influenza ocorreu, predominantemente, entre o final do outono e os meses de inverno (figura 22). O vírus de Influenza A circulou durante os meses de maio, junho e julho enquanto que o Influenza B apresentou circulação, embora esporádica, no segundo semestre. Em regiões de clima temperado a incidência do vírus influenza obedece um padrão sazonal característico, com picos bem definidos, ocorridos geralmente nos meses de inverno (de dezembro a abril no hemisfério norte e de junho a setembro no hemisfério sul), seguido de uma redução da atividade do vírus nos meses mais quentes (NELSON, 2006; VIBOUD et al., 2006; PAIVA et al., 2000). Portanto, o período de maior incidência de IA na cidade de São Paulo foi coincidente com o descrito na literatura para locais de clima temperado, com ligeira variação no início do pico. Bellei et al. (2007) descreveram que a atividade do vírus pode variar em diferentes temporadas e entre os grupos de risco. No Brasil, essa atividade pode variar conforme a região e principalmente conforme o clima (ALONSO et al., 2007). Nas regiões Norte/Nordeste, com clima tropical, a sazonalidade normalmente não é bem definida e a circulação do vírus pode ocorrer no decorrer do ano todo, ou ser mais intensa nas estações chuvosas, fevereiro a julho (MOURA et al., 2003), enquanto que nas regiões Sul/Sudeste com clima temperado, o surto ocorre geralmente nos meses de outono/inverno (BELLEI et al., 2007; CINTRA e ARRUDA, 2000). O conhecimento da sazonalidade do vírus mostra-se muito importante, pois o início da campanha nacional de vacinação contra influenza no Brasil, que ocorre geralmente no mês de maio, não parece ser compatível com a circulação do vírus no Nordeste do Brasil, que inicia-se, geralmente, dois a três meses antes (MOURA et al., 2009).

A circulação dos vírus Influenza B foi esporádica e alternada, fenômeno também verificado no ano de 2004, por Vedovello (2006). Sacramento (2010), em estudo retrospectivo da circulação do vírus Influenza em crianças hospitalizadas na cidade de São Paulo durante 10 anos consecutivos, relatou a alternância anual da circulação do vírus influenza B, em 2002, 2004 e 2006. Paiva et al. (2002) e Benfica (2005) também relataram a circulação de IB, Hong Kong-like, em 2002.

Por outro lado, Moura et al. (2009) estudando a circulação dos vírus influenza de 2001 a 2007 na cidade de Fortaleza, localizada no Nordeste do Brasil, com clima tropical, relataram a co-circulação de ambos os gêneros em todos os anos, à exceção de 2006, no qual o IB não foi detectado. Recentemente, um modelo evolutivo de disseminação dos vírus influenza A foi proposto por Rambaut et al. (2008), no qual novas variantes emergem dos trópicos (em particular

do Sudeste asiático) e disseminam-se para as regiões de clima temperado, o que pode ter ocorrido com o Influenza B, no Brasil. Entretanto, Filkeman et al. (2007) não correlacionaram a ocorrência de epidemia de Influenza B com o aumento da latitude em relação aos trópicos, fenômeno observado com Influenza A. Porém relataram que as epidemias por influenza B ocorrem, no hemisfério Norte, sempre após as epidemias causadas pelo H3 e H1.

As amostras de influenza A, detectadas neste estudo, foram subtipadas pela Multiplex-RT-PCR sendo 17 delas positivas para o subtipo H3N2 e 4 para o subtipo H1N1. Paiva et al. (2006) relataram que durante esse ano ocorreu a co-circulação de ambos os subtipos, com predominância do H1N1 em São Paulo. Filkeman et al. (2007), em estudo do padrão global da sazonalidade dos vírus Influenza A (H1N1/H3N2) e B durante 9 anos consecutivos descreveram que o H3 parece ser o subtipo predominante, seguido pelo B e depois pelo H1, sendo que, normalmente, as epidemias pelo IB são mais frequentes, porém menores que as causadas pelo H1. Verificou-se também que o IB pode co-dominar em uma epidemia com o H3 ou o H1, mas a codominância não ocorre entre os subtipos de IA, devido, provavelmente, a interferência por competição entre ambos devido a um maior grau de similaridade genética e imunidade cruzada. No nosso caso não verificamos a co-dominância de nenhum tipo ou subtipo, mas a co-circulação dos três, H1, H3 e IB e com a predominância de H3.

Quatro amostras identificadas como Influenza A não foram subtipadas pela metodologia empregada nesse estudo. Esse fato pode ter ocorrido devido à alta variabilidade dos genes da Hemaglutinina e Neuraminidase. Os vírus RNA, que possuem as enzimas RNA polimerase RNA dependente ou a transcriptase reversa apresentam um número maior de alterações por replicação do que os vírus de DNA (COFFIN, 1992; HOLLAND et al., 1996). Além disso, regiões conservadas nesses genes são escassas, dificultando o desenho dos *primers*. Qualquer alteração de bases nitrogenadas, que ocorre naturalmente nessas seqüências e, com mais frequência do que nos outros genes, impede que ocorra uma ligação específica entre os *primers* e a fita alvo. A frequência de mutações desses vírus, nos genes responsáveis pela codificação das proteínas HA e NA é de cerca de $10^{5,5}$ por replicação (WEBSTER, 1980).

A prevenção e o controle das epidemias e pandemias da gripe requerem esforços nacionais e internacionais para o monitoramento das cepas circulantes, tanto para identificar precocemente o surgimento de uma nova cepa, como para verificar o aparecimento de cepas resistentes aos antivirais, para determinar a correta composição da vacina anual e para elucidar os

mecanismos de evolução do vírus. Este trabalho, portanto, teve por objetivo estudar a diversidade genética dos vírus de Influenza A em São Paulo identificados em crianças atendidas no Hospital Universitário da USP, pelo sequenciamento de cinco genes do vírus: NP, NS, M, HA e NA, seguido da análise das sequências. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências da cepa vacinal empregada no ano de 2006 no Hemisfério Sul, A/California/7/2004 (H3N2) e A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1) para verificar a similaridade com a mesma, principalmente dos genes da HA e NA, com sequências de cepas vacinais recomendadas desde o início da campanha vacinal no Brasil, iniciada em 1999, e com algumas cepas circulantes na América do Sul.

A metodologia para a amplificação dos genes envolveu a utilização de primer universal para a síntese do cDNA e posteriormente a utilização dos *primers* descritos por HOLLFMAN et al. (2006), que são complementares a regiões conservadas no início de cada segmento do vírus Influenza A. Entretanto, embora a padronização da metodologia, utilizando amostras padrão isoladas em cultura de células, tenha ocorrido de maneira satisfatória, quando iniciaram-se os trabalhos com amostras clínicas a amplificação não ocorria. Foi necessário, portanto, o desenho de *primers* internos que permitisse a amplificação de fragmentos menores englobando o gene inteiro. Mesmo assim, várias amostras tiveram os genes amplificados parcialmente, principalmente os genes que codificam as proteínas de superfície, devido, provavelmente, a alta variabilidade genética dos mesmos.

A região HA1 da hemaglutinina é reconhecida por conter vários sítios antigênicos tanto no subtipo H1 como H3, além do sítio responsável pela ligação ao receptor celular (MURPHY e WEBSTER, 2001; WILEY et al., 1981), portanto foi a região escolhida para análise do gene da HA

Apenas duas amostras de H1N1 tiveram o gene da HA parcialmente sequenciado. A análise filogenética revelou que durante o mesmo ano houve a circulação de duas linhagens diferentes. Uma (Br840) pertencente ao mesmo clado da cepa vacinal, A/New Caledonia/20/99 (H1N1), demonstrando ser geneticamente relacionada com a mesma. A OMS relatou que, no geral, entre o início de 2005 e o final de 2006, a maioria dos vírus Influenza A(H1N1) identificados foram estritamente relacionados com a cepa vacinal, não ocorrendo alterações muito significativas no perfil do subtipo circulante (WHO, 2010a). A outra linhagem, que englobou a amostra Br789, agrupou-se com cepas que circularam no final da década de 1990. Essa cepa apresentou alta

divergência em relação à cepa vacinal do ano (com 92,9% de similaridade, em termos de nucleotídeos). Em termos de aminoácidos essa cepa apresentou um total de 32 de mutações ao longo do gene, sendo oito delas presentes nos sítios antigênicos e duas em regiões conservadas do sítio de ligação aos receptores de ácido siálico (figura 45, tabela 19). Entre elas ressaltamos duas alterações: a alteração ocorrida na posição 129 (N129K), presente no sítio antigênico Sa e detectada em algumas cepas após passagem em linhagem celular MDCK (OH et al, 2008) e a alteração na posição 225 (D225G), presente dentro do sítio antigênico Ca. Há dados na literatura que descrevem que essa alteração pode afetar a especificidade de ligação ao receptor celular, principalmente aqueles que têm o ácido N-acetilneuramínico ligado à penúltima galactose por meio da ligação α 2,6, presentes nas células humanas (STEVENS et al., 2006). Essa alteração também foi descrita nos vírus Influenza A (H1N1) pandêmico (CHEN, et al, 2010; ZHENG et al, 2010).

A análise filogenética realizada com os demais genes dessa amostra revelou sua complexidade pois, assim como na HA, o gene da M também apresentou-se mais relacionado às sequências de cepas mais antigas, enquanto que os genes da NP e NS1 apresentaram-se geneticamente relacionados à cepa vacinal, A/NewCaledonia/20/1999, e às cepas mais recentes. Esses dados nos permitem supor que: i) houve co-circulação de diferentes linhagens do mesmo subtipo no mesmo ano, ii) que essa amostra foi gerada por rearranjos ocorridos entre os genes de diferentes linhagens de vírus H1N1, iii) pode ocorrer a permanência de linhagens no decorrer dos anos circulando na população.

Pela análise filogenética realizada com os genes da HA e NP de duas outras amostras brasileiras, Br840 e Br859, também verificou-se a ocorrência de rearranjos entre os genes, porém entre os diferentes subtipos. Ou seja, a amostra 840, que era do subtipo H1N1 (pela multiplex e pela análise do gene HA), apresentou o gene da NP próximo ao subtipo H3, enquanto que a 859, que pela análise do gene da HA foi classificada como H3, pela análise do gene da NP foi classificada como H1. A ocorrência de múltiplos rearranjos envolvendo vários genes de subtipos diferentes e de sublinhagens dentro do mesmo subtipo foi relatada na literatura por diversos autores e em diversas localidades (SCHWEIGER et al., 2006; LINDSTROM et al., 1998; XU et al., 2004; BAR et al., 2005; HOLMES et al., 2006). A importância, portanto, dos rearranjos gênicos como mecanismo evolucionário para os vírus Influenza é inquestionável (SCHWEIGER et al., 2006; HOLMES et al., 2005). Holmes et al. (2005) também descreveram a permanência de

linhagens na população no decorrer dos anos e que os rearranjos entre essas diferentes linhagens, muitas vezes antigenicamente distintas, pode levar a mudanças antigênicas maiores, inclusive causando falhas vacinais.

A análise filogenética realizada com a porção HA1 do gene da HA de 12 amostras de Influenza A (H3N2) demonstrou que as cepas circulantes brasileiras foram geneticamente próximas à cepa vacinal utilizada no ano (A/California/7/2009) (Figura 55). Porém, algumas amostras foram mais relacionadas às cepas vacinais utilizadas nos anos subsequentes (A/Wisconsin/67/2005 e A/Brisbane/10/2007), demonstrando também a co-circulação de diferentes linhagens no mesmo ano.

Em nível de aminoácidos verificamos a ocorrência de um total de 8 substituições em relação à cepa vacinal, demonstrando boa similaridade das cepas circulantes com a vacinal. Entretanto, praticamente todas as amostras brasileiras apresentaram duas substituições dentro do sítio antigênico B em: Serina para Fenilalanina na posição 193 (S193F) e Treonina para Alanina na posição 196 (T196A).

A substituição S193F também foi descrita no Japão por Saito et al. (2006) e por Simonsen et al. (2007). Simonsen et al. (2007) notaram que todas as amostras que apresentavam a substituição S193F, apresentavam também a mutação S31N no gene da M2, que confere resistência à Amantadine. Sugeriram, portanto, que essa mutação é o resultado de uma pressão exercida pelo uso desses antivirais. As amostras brasileiras também apresentaram essas duas mutações concomitantemente.

A substituição T196A foi detectada durante novembro de 2005 a abril de 2006, no Canadá em pacientes que receberam a vacina trivalente de Influenza (SKOWRONSKI et al, 2007) e no Norte da Grécia, entre 2004 e 2008 (MELIDOU et al, 2009). Lu et al. (2006) notaram que a ocorrência dessa mutação (T196A) resulta em significativo aumento de replicação do vírus em ovos embrionados, quando comparados à replicação em linhagem MDCK, sem alterar as características antigênicas do vírus.

Portanto, muitas das alterações ocorreram dentro dos sítios antigênicas, tanto de H1 como de H3. Wilson e Cox (1990) propuseram que *drifts* epidemiológicos importantes, que podem alterar a composição da vacina anual, podem acontecer quando ocorrem 4 ou mais substituições de aminoácidos em pelo menos 2 sítios antigênicas diferentes, demonstrando a importância do monitoramento deste gene.

Embora apenas uma amostra tenha tido o gene da neuraminidase do subtipo H1N1 (Br933) sequenciado verificamos que essa amostra foi mais relacionada às cepas circulantes em 2006 do que à própria cepa vacinal, A/NewCaledonia/20/1999 (H1N1). Entretanto, o número de aminoácidos que apresentaram alterações em relação a essa cepa foi pequeno, apenas 6, sendo que 5 deles foram relatadas anteriormente. A substituição S59N foi descrita por Rotanov et al. (2007) na Rússia, a substituição I267V por KHAN, SHAKIL e LAL (2009) na Índia, E332K na Inglaterra por Bragstad; Nielsen; Fonsgaard (2008) e Rotanov et al. (2007) e a substituição N450D também em Londres (WHO, 2007). A substituição V48I foi detectada em amostras isoladas na China, durante os anos de 2004 a 2007 (CHUM-CHIU et al, 2009) e em isolados que apresentavam resistência ao Oseltamivir (BLOOM, et al., 2010).

As amostras brasileiras sequenciadas neste estudo, pertencentes ao subtipo H3N2, apresentaram um total de 10 substituições de aminoácidos, sendo que 3 foram detectadas em todas as amostras estudadas. Essas 3 substituições (D93N, K172R e K222E) foram relatadas anteriormente em várias regiões do mundo (LIN et al., 2010; RONTANOV et al., 2007; SIMONSEN et al., 2007, BRAGSTAD et al., 2008, BARR et al., 2005, GULAT et al., 2002). A substituição de Lisina para Arginina (K172R) foi identificada em influenza suína, em 2003 (KARASIN et al., 2006). Apenas um sítio que sofreu alteração de aminoácido (S383L) foi previamente identificado por Colman; Varghese; Laver (1983) e Air et al. (1985) como um dos sítios antigênicos da proteína previamente descritos (197, 199, 221, 332 a 339, 370, 385 a 432).

Todos os sítios envolvidos diretamente na atividade catalítica da enzima (D118, D151, R152, R224, E276, R292, R371 e Y406) e os sítios adjacentes que estão implicados na manutenção dessa atividade (E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294, E425) (COLMAN; VARGHESE; LAVER; 1983; BAEK et al., 2009) apresentaram-se conservados nas amostras brasileiras.

Não foram detectadas amostras com genes de resistência aos antivirais Oseltamivir e Zanamivir (YEN et al., 2007; SHEU et al., 2008; EARHART et al., 2009). Esse dado é relevante, tendo em vista que, até a presente data, que não há trabalhos, no Brasil, descrevendo o aparecimento de cepas resistentes de influenza sazonal.

A análise filogenética do gene NA (subtipo N2) revelou que as sequências brasileiras, foram geneticamente mais próximas da cepa vacinal utilizada em 2007, ano subsequente a esse estudo (A/Wisconsin/67/2007). Embora não tenhamos realizado uma análise antigênica dessas

amostras, podemos sugerir baseado, nas análises genéticas da HA e NA, que a alteração da cepa vacinal foi compatível com o que circulava no país.

Duas seqüências do gene da Matriz (M2), do subtipo H1N1, foram alinhadas com cepas vacinais recomendadas pela OMS, disponíveis no GenBank, sendo verificada apenas uma substituição de aminoácido, na amostra Br854, Glicina para o Ácido Aspártico na posição 89 (G89D), não relatada na literatura. Nenhuma das amostras de influenza A (H1N1) demonstrou substituições que conferem resistência aos inibidores dos canais iônicos.

Doze amostras brasileiras foram alinhadas com cepas vacinais e apresentaram a substituição do aminoácido Glutamina para Histidina na posição 90 (Q90H), não relatada por nenhum outro autor e, a substituição Serina para o aminoácido Asparagina na posição 31 (S31N), característica de amostras que apresentam resistência aos antivirais Amantadina e Rimantadina. Não existem estudos brasileiros que relatem a presença cepas resistentes à Amantadina, embora a circulação das mesmas seja relatada no mundo todo, atingindo níveis preocupantes, podendo corresponder aproximadamente de 75% das cepas circulantes (SIMONSEN et al, 2007; ABEB, GOYETTE e BOIVIN, 2005; NELSON et al, 2009; LAPLANTE et al, 2009; PABBARAJU et al., 2008), sendo mais comum no subtipo H3N2 do que H1N1. Ressaltamos que no Brasil não ocorre a utilização rotineira deste antiviral. No entanto, outras localidades da Ásia, Américas e África, nos quais também não há a utilização dos antivirais, tanto de inibidores dos canais iônicos como de inibidores da neuraminidase, detectaram casos de resistência aos antivirais (GARCIA et al., 2009; FOURMENT et al., 2010; NJOUOM et al., 2010). Njouom et al. (2010) sugeriam que pode ocorrer a transmissão de vírus (H1N1) resistentes ao Oseltamivir entre indivíduos, na ausência da pressão da droga e que essas cepas, provavelmente, possuem uma vantagem seletiva epidemiológica que pode promover sua emergência e substituição gradual pelas cepas sensíveis ao Oseltamivir.

Portanto, o elevado percentual de amostras resistentes enfatiza a necessidade de melhorar a vigilância da emergência de cepas resistentes aos antivirais e enfatiza a necessidade de maior cuidado no uso indiscriminado ou, até mesmo recomendar a suspensão temporária do uso desses antivirais até que a susceptibilidade a eles seja restabelecida, assim como foi sugerido em outros países (BRIGTH et al., 2006).

A análise filogenética do gene da Nucleoproteína das cepas do subtipo H1N1 demonstrou uma estreita relação com a cepa vacinal NewCaledona/20/1999 (figura 58B), confirmado pela

alta similaridade em nível de aminoácidos (figura 51), no qual foram verificadas apenas 2 substituições. A primeira no resíduo 423 de Treonina para Alanina (T423A), ainda não descrita em literatura e a segunda, no resíduo 470, de Lisina para Arginina (K470R), detectada também em amostras provenientes da China, em 2009, por LEUNG, WAND e SHAW (2009). A mesma alteração foi verificada nas cepas vacinais utilizadas nos anos de 2007 e 2008, subsequentes ao ano estudado.

Dez sequencias de aminoácidos da NP de amostras de H3N2 foram alinhadas com as sequencias das cepas vacinais e quando comparadas à cepa vacinal A/California/7/2004 (H3N2) apresentaram substituições nas posições 377 de Serina para Glicina (S377G), presente em amostras resistentes à Amantadina (GHEDIN et al, 2009) e detectada por diversos autores (SIMONSEN et al, 2007; BRAGSTAD et al, 2008). Além dessa importante substituição foram identificadas mais duas: K494E, ainda não descrita na literatura e A472T detectada em 1993, em um estudo longitudinal de 1933 até 1990 (SHU, BEAN e WEBSTER, 1993).

Apesar de poucas substituições de aminoácidos serem detectadas na proteína NP, a possibilidade dessas mutações acumularem-se ao longo dos anos não pode ser descartada, principalmente porque epítomos da NP são reconhecidos por linfócitos T citotóxicos (CTLs) e o acúmulo de substituições de aminoácidos, que ocorre nas infecções por vírus, pode ser uma estratégia para o escape desse reconhecimento (OLDSTONE, 1997).

A análise filogenética do gene da proteína Não estrutural de Influenza A(H3N2) e Influenza A(H3N2) demonstrou a circulação de apenas uma linhagem de cada subtipo, no ano de 2006. Na análise de aminoácidos foram detectadas poucas alterações: 3 em H1N1 (L157F, I207T e I217T em H1N1) e 2 em H3N2 (T142P e I150N). Não há descrição destes sítios na literatura nem possíveis consequências devido a essa alteração.

O Brasil se destaca pelo combate à gripe sazonal e pandêmica. As campanhas de vacinação alcançam grande parte da população de risco e são gratuitas. Porém, é necessário um melhor monitoramento dos vírus Influenza que circulam no país, uma melhor compreensão dos mecanismos de disseminação e transmissão dentro da grande extensão e diversidade de climas que o país apresenta. Faz-se necessário o estudo não somente de características antigênicas dos vírus, mas também moleculares, pois estas permitem o entendimento da complexidade dos mecanismos evolucionários desses vírus, permitindo que uma série de medidas preventivas sejam tomadas em tempo hábil para prevenir grandes pandemias. Esse estudo, realizado em local

restrito e com poucas amostras permitiu verificar a ocorrência de vários rearranjos entre subtipos e linhagens, bem como verificar a circulação de cepas resistentes a Amantadina, dando uma amostra de que estudos maiores, envolvendo o genoma inteiro, uma maior amostragem de várias localidades do país, podem contribuir muito com informações sobre a evolução e circulação do vírus no Brasil.

6 CONCLUSÕES

- Na população estudada, a circulação dos vírus Influenza A e B, foi baixa, com co-circulação de ambos os vírus e com prevalência do Vírus Influenza A sobre o Influenza B, no ano de 2006.
- No ano de 2006, o subtipo H3N2 predominou sobre o subtipo H1N1.
- A subtipagem dos vírus influenza, por multiplex-RT-PCR apresenta falhas devido à grande variabilidade nas proteínas HA e NA.
- Todas as amostras brasileiras do subtipo H3N2 identificadas neste estudo apresentaram a mutação S31N, que confere resistência aos inibidores dos canais iônicos da Matriz M2.
- Não foram detectadas nesse estudo, amostras brasileiras que apresentam as substituições de aminoácidos que conferem resistência aos inibidores da ação da Neuraminidase.
- Verificou-se a co-circulação de diferentes linhagens dentro de um mesmo subtipo de vírus influenza no mesmo ano e a permanência de diferentes linhagens circulando no decorrer dos anos.
- As análises filogenéticas realizadas com todos os genes do subtipo H3 demonstraram estreita relação genética entre as cepas brasileiras e as cepas vacinais utilizadas em 2006 ou 2007, demonstrando que a substituição da cepa vacinal de H3, ocorrida em 2007, foi compatível com a circulação.
- Foram detectados dois possíveis rearranjos envolvendo os genes da HA e NP e em duas amostras brasileira: Br 840 e Br 859.
- Análise do genoma completo do vírus e com um número maior de amostras faz-se necessário para elucidar os mecanismos evolucionários e entendimento da circulação do vírus no Brasil,

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

ABED, Y.; GOYETTE, N.; BOIVIN, G. Generation and Characterization of Recombinant Influenza A (H1N1) Viruses Harboring Amantadine Resistance Mutations. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 49, n. 2, p. 556–559, 2005.

AKARSU, H. et al. Structure-based design of NS2 mutants for attenuated influenza A virus vaccines. **Virus. Res.**, v. 155, n. 1, p. 240-24, 2011.

ALBUQUERQUE, M. C. M. et al. Novel Respiratory Virus Infections in Children, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v. 15, n. 5, p. 806-808, 2009.

ALEXANDER, D. J. An overview of the Epidemiology of Avian Influenza. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5637-5644, 2007.

ALONSO, W. J. Seasonality of Influenza in Brazil,: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. **Am. J. Epidemiol.**, v. 165, n. 12, p. 1434-1442, 2007.

AMBROSCH, F.; FEDSON, D. Epidemiology of influenza vaccine distribution. In: **OPTIONS FOR THE CONTROL OF INFLUENZA**, 4., 2000, Crete, Greece. **Abstracts...** Crete, Greece: Elsevier Health Sciences, 2000. p. 126

BAZ, M.; ABED, Y.; MCDONALD, J.; BOIVIN, G. - Characterization of multidrugresistant influenza A/H3N2 viruses shed during 1 year by an immunocompromised child. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 1555–1561, 2006.

BELLEI, N. Patterns of influenza infections among different risk groups in brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 399-402, 2007.

BENFICA, D. **Investigação de metodologia para identificação de infecções por vírus influenza**. 2005. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2005.

BERTOLLI FILHO, C. **A gripe espanhola em São Paulo**. São Paulo: Ciência Hoje, 1989.

BESSELAAR, T. G. et al. Antigenic and molecular analysis of influenza A (H3N2) virus strains isolated from a localised influenza outbreak in South Africa in 2003. **J. Med. Virol.**, v. 73, n. 1, p. 71-78, 2004.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEVERIDGE, W. I. B. **The Chronicle of Influenza Epidemics. Historical and Philosophic Life Sciences.** V. 13, p. 223-235, 1991.

BETAKORA, T. M2 protein-a proton channel of influenza A virus. **Curr. Pharm. Des.;** v. ,3, n. 31, p. 3231-3235, 2007.

BEYER, W.E. - The plea against annual influenza vaccination? 'The hoskins' paradox' revisited. **Vaccine,** v. 16, n. 20, p. 1929-1932, 1998.

BISWAS, S. K.; NAYAK, D. P. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. **J. Virol.,** v. 68, n.3, p. 1819-1826, 1994.

BLAAS, D.; PATZELT, E.; KUECHLER, E. Identification of the cap binding protein of influenza virus. **Nucleic Acids Res.,** v. 10, n. 15, p. 4803-4812, 1982.

BLOOM, J. D. et al. Permissive Secondary Mutations Enable the Evolution of Influenza Oseltamivir Resistance. **Science,** v. 28, n. 5983, p. 1272-1275, 2011.

BRAGSTAD, K. et al. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: A complete genome study. **J. Virol.,** v. 5, n. 40 p. 1-19, 2008.

BOLTZ, D. A. et al. Emergence of H5N1 avian influenza viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors and novel reassortants in Lao People's Democratic Republic. **J. Gen. Virol.,** v. 91, p. 949-959, 2010.

BOUVIER, N. M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. **Vaccine,** v. 26, n. 4, p. 49-53, 2008.

BOYCE, W. M.; SANDROCK, C.; KREUDER-JOHNSON, C.; KELLY, T.; CARDONA, C. Avian Influenza Viruses in Wild Birds: A Moving Target. *Comparative Immunology*, **Microbiol. Infect. Dis.,** v. 32, n. 4, p. 275-286, 2009.

BRIGHT, R. A. et al. Adamantane Resistance Among Influenza A Viruses Isolated Early During the 2005-2006 Influenza Season in the United States. **JAMA,** v. 295, n. 8, p. 891-894, 2006.

BROWN, J. D.; GOEKJIAN, G., POULSON, R., VALEIKA, S.; STALLKNECHT, D. E. Avian Influenza virus in water: infectivity is dependent on ph, salinity and temperature. **Vet. Microbiol.,** v. 136, n. 1-2, p. 20-26, 2009.

BROOKS, G.; BUTEL, J.; MORSE, S. A. Ortomixovírus (Vírus da Influenza). In: BUTEL, J. S.; BROOKS, G. F.; MORSE, S. A. (Ed.). **Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 394-404.

BUONAGURIO, D. A. et al. Genetic stability of live, cold-adapted influenza virus components of the FluMist[®]/CAIV-T vaccine throughout the manufacturing process. **Vaccine**, v. 24, n. 12, p. 2151-2160, 2006.

CALFEE, D. P.; HAYDEN, F. G. New approaches to influenza chemotherapy-neuraminidase inhibitors. **Drugs**, v. 56, p. 537-553, 1998.

CARR, J.; IVES, J.; KELLY, L.; LAMBKIN, R.; OXFORD, J.; MENDEL, D.; TAI, L.; ROBERTS, N. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. **Antiviral Res.**, v. 54, p.79–88, 2002.

CARRAT, F.; FLAHAULT, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. **Vaccine**, v. 25, p. 6852–6862, 2007.

CAUCHEMEZ, S. Estimating the impact of school closure on influenza transmission from sentinel data. **Nature**, v. 452, p. 750-754, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). CDC Recommends Against the use of Amantadine and Rimantadine for the treatment or prophylaxis of Influenza in the United States during the 2005–06 influenza season, 2006. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/flu/han011406.htm>> Acesso em: 05 fev. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Neuraminidase inhibitors for treatment of Influenza A and B infections. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 48, n.4, p. 1-10, 1999.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). Informe Técnico - Influenza Pandêmica H1N1 2009, Fase pós pandêmica – Atualização, 2011. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/influa_h1n1.html> Acesso em: 20 jan. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Neuraminidase inhibitors for treatment of Influenza A and B infections. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 48, n.4, p. 1-10, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Performance of rapid influenza diagnostic tests during two school outbreaks of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 58, n. 37, p. 1029-1032, 2009.

CLASS, E. C. J. et al. Type-specific identification of Influenza Viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.**, v. 39, p. 1-13, 1992

COEN, D. M.; RICHMAN, D. D. Antiviral agents. In: RICHMAN, D. D. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 447–485.

COELHO, M. C. Impact of respiratory infections by Influenza Viruses A and B in pediatrics patients from Federal University of Paraná, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p.220-223, 2007.

COFFIN, J. M. Genetic Diversity and Evolution of Retroviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 176, p. 143–164, 1992.

COLMAN, P. M. A novel approach to antiviral therapy for influenza. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 44, p. 17-22, 1999.

COMPANS, R. W.; MEIER-EWERT, H.; PALESE, P. Assembly of lipid-containing viruses. **J. Supramol. Struct.**, v. 2, n. 2-4, p. 496-511, 1974.

COMPANS, R. W.; CHOPPIN, P.W. Reproduction of Myxoviruses. In: CONRAT, H. F. **Comprehensive Virology**. New York: Plenum-Press, 1975. v. 4, p. 179-252.

CROS, J. F.; PALESE, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. **Virus Res.**, v. 95, n. 1-2, p. 3-12, 2003.

CHEN, C. J. et al. Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. **J. Virol.**, v. 84, n. 19, p. 10051-10062, 2010.

CHEN, G. L.; SUBBARAO, K. Live attenuated vaccines for pandemic influenza. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 333, p. 109-132, 2009.

CHEN, H. et al. Quasispecies of the D225G substitution in the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus from patients with severe disease in Hong Kong, China. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 10, p. 1517-1521, 2010.

CHEN, W. A novel Influenza a virus mitochondrial protein that induces cell death. **Nat. Med.**, v. 7, p.1306–1312, 2001.

CHERIAN, T. et al. Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 623-628, 1994.

CHIU, S. C. et al. The Antigenic and Phylogenetic Analysis of Surface Protein Genes of Influenza A Viruses in Taiwan, 2004-2007. **Research and Diagnostic Center**, v. 25, n. 5, p. 358-369, 2009.

CHU, C. M.; DAWSON, I. M.; ELFORD, W. J. Filamentous forms associated with newly isolated influenza virus. **Lancet**, v. 1, p.602-603, 1949.

DAUM, L. T. et al. Influenza A (H3N2) Outbreak, Nepal Emerging Infectious Diseases. v. 11, n. 8, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/index.htm>> Acesso em: 28 jun. 2010.

DAWOOD, F. S. et al. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1). **N. Engl. J. Med.**, v. 360, p. 2605-2615, 2009.

DU, Q. S. et al. Designing inhibitors of M2 proton channel against H1N1 swine influenza virus. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. 9388, 2010.

DUTKOWSKI, R. Oseltamivir in seasonal influenza: cumulative experience in low- and high-risk patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. ii11-ii24, 2010.

DWYER, D. E.; SMITH, D. W.; CATTON, M. G.; BARR, I.G. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. **Med. J. Aust.**, v. 185, n. 10, p. 48-53, 2006.

EGOROV, A. et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. **J. Virol.**, v. 72, n. 8, p. 6437-6441, 1998.

ENGLUND, J.A. Antiviral therapy of influenza. **Semin. Ped. Infect. Dis.**, v. 13, p. 120-128, 2002.

FINKELMAN, B. S. et al. Global patterns in seasonal activity of influenza A/H3N2, A/H1N1, and B from 1997 to 2005: viral coexistence and latitudinal gradients. **PLoS ONE**, v. 2, n. 12, p. 1296, 2007.

FODOR, E. et al. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. **J. Virol.**, v. 76, n. 18, p. 8989-9001, 2002

FORLEO NETO, E. et al. Influenza. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n.2, p. 267-274, 2003.

FOUCHIER, R. A. M. et al. Characterization of a novel influenza a virus hemagglutinin subtype (h16) obtained from black-headed gulls. **J. Virol.**, v. 79, n. 5, p. 2814-2822, 2005.

FOURMENT, M. et al. Evidence of persistence of and antiviral resistance and reassortment events in seasonal influenza virus strains circulating in Cambodia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, p. 295–297, 2010.

GARCIA, J. et al. Antiviral resistance in influenza viruses circulating in Central and South America based on the detection of established genetic markers. **Influenza Other Respiro Viruses**, v. 3, p. 69–74, 2009.

GASTAMINZA, P. Mutations in the n-terminal region of influenza virus pb2 protein affect virus rna replication but not transcription. **J. Virol.**, v. 77, n. 9, p. 5098-5108, 2003.

GAVIN, P. J.; THOMSON, R. B. J. Review of rapid diagnostic tests for influenza. **Clin. Applied Immunol. Rev.**, v. 4, p. 151-172, 2003.

GHEDIN, E. et al. Mixed Infection and the Genesis of Influenza Virus Diversity. **Journal of Virology**, v. 86, n. 17, p. 8832–8841, 2009.

GOMEZ-PUERTAS, P. et al. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. **J. Virol.**, v. 74, n. 24, p. 11538-11547, 2000.

GONZALEZ, S.; ORTIN, J. Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. **J. Virol.**, v. 73, n. 1, p. 631-637, 1999.

GOTTSCHALK, A. The specific enzyme of influenza virus and vibrio cholerae. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 23, p. 645–646, 1957.

GOVORKOVA, E. A. et al. Immunization with reverse-genetics-produced H5N1 influenza vaccine protects ferrets against homologous and heterologous challenge. **J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 194, p. 159-167, 2006.

GUAN, Y.; PEIRIS, J. S.; LIPATOV, A. S. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 8950-8955, 2009.

GUBAREVA, L. V. et al. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. **J Infect Dis**, v. 178, p.1257–1262, 1998.

GUBAREVA, L. V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. **Virus Research**, v. 103, p.199–203, 2004.

GULATI, U. et al. Antibody Epitopes on the Neuraminidase of a Recent H3N2 Influenza Virus (A/Memphis/31/98). **Journal of Virology**, v. 76, n. 23, p. 12274-12280, 2002.

HAN, G. P. et al. Genetic analysis of JC virus and BK virus from a patient with progressive multifocal leukoencephalopathy with hyper IgM syndrome. **J. Medical Virol.**, v. 76, n. 3, p. 398-405, 2005.

HARMON, M. W. Influenza viruses. In: LENETTE, E. H. (Ed). **Laboratory Diagnosis of Viral Infections**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 515-534.

HASSAN, Z. et al. Genetic Makeup of Amantadine-Resistant and Oseltamivir-Resistant Human Influenza A/H1N1 Viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 1085-1092, 2010.

HAY, A. J. The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the m2 ion channel protein. **Semin. Virol.**, v. 3, p. 21-30, 1992.

HAY, A. J. et al. Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 18, p. 19-29, 1986.

HERRMANN, E. C.; HERRMANN, J. A. A working hypothesis virus resistance development as an indicator of specific antiviral activity. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 284, p. 632-637, 1977.

HILLEMANN, M. R. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. **Vaccine**, v. 20, p. 3068-3087, 2002.

HOFFMANN, E. et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Arch virol**, v. 146, p. 2275-2289, 2001.

HOLMES, E. C. et al. Whole-Genome Analysis of Human Influenza A Virus Reveals Multiple Persistent Lineages and Reassortment among Recent H3N2 Viruses. **PLoS Biol.**, v. 3, n. 9, p. 1579-1589, 2005.

HIRSCH, A. **Handbook of geographical and historical pathology**. London: New Sydenham Society, 1883.

HOLLAND, J. J. Evolving virus plagues [comment]. **Proc. Natl. Acad. SCI. USA.**, v. 93, p. 545-546, 1996.

HONDA, A.; MIZUMOTO, K.; ISHIHAMA, A. Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. **Genes Cells**, v. 4, n. 8, p. 475-485, 1999.

HULSE, D. J. et al. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. **J. Virol.**, v. 78, n. 18, p. 9954-9964, 2004.

ISON, M. G. et al. Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series. **J. Infect. Dis.**, v. 193, p. 760-764, 2006.

IZURIETA, H. S.; THOMPSON, W. W.; KRAMARZ, P. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 232-239, 2000.

JACKSON, D. A. et al. Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. **Nature**, v. 296, p. 366-368, 1982.

KARASIN, A. I.; CARMAN, S.; OLSEN, C. W. Identification of Human H1N2 and Human-Swine Reassortant H1N2 and H1N1 Influenza A Viruses among Pigs in Ontario, Canada (2003 to 2005). **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 3, p. 1123-1126, 2006.

KHAN, A. U.; SHAKIL, S.; LAL, S. K. Efficacy of neuraminidase (NA) inhibitors against H1N1 strains of different geographical regions: an in silico approach. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 370-376, 2009.

KANG, S. et al. Epidemiologic Study of Human Influenza Virus Infection in South Korea from 1999 to 2007: Origin and Evolution of A/Fujian/411/2002-Like Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2177-2185, 2010.

KASH, J. et al. Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. **Virus. Res.**, v. 119, n. 1, p. 111-120, 2006.

KAWAOKA, Y. et al. Orthomyxoviridae. In: FAUQUET, C. et al. (Ed). **Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier Academic Press, 2005. p. 681-693.

KAWAOKA, Y.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R.G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. **J. Virol.**, v. 63, p. 4603-4608, 1989.

KEAWCHAROEN, J. et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2189-2191, 2004.

KENDAL, A. P.; DOWDLE, W. R.; NOBLE, G. R. Influenza viruses. In: Kurstak, E.; KURSTAK, C. (eds.). **Manual of clinical microbiology**. 4th ed. Washington, American Society for Microbiology, 1985. p. 755-762.

KILBOURNE, E. D. Ed. **The influenza viruses and influenza**. Orlando: Academic Press, 1975. p. 449-481.

KISO, M. et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. **Lancet**, v. 364, p. 759-765, 2009.

LANDRYL, M. L. Diagnostic tests for influenza infection. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 23, n. 1, p. 91-97, 2011.

LAPLANTE, J. M. et al. Influenza Antiviral Resistance Testing in New York and Wisconsin, 2006 to 2008: Methodology and Surveillance Data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1372-1378, 2009.

LAMB, R.; HOLSINGER, L.; PINTO, L. The influenza A virus M2 ion channel protein and its role in the influenza virus life cycle. In: WIMMER, E. (Ed.). **Receptor-mediated virus entry into cells**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1994. p. 303-321.

LANDRY, M. L. Diagnostic tests for influenza infection. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 23, n. 1, p. 91-97, 2011.

LATHAM, T.; GALARZA, J. M. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. **J. Virol.**, v. 75, n. 13, p. 6154-6165, 2001.

LAVER, W. G. Influenza virus surface glycoproteins, haemagglutinin and neuraminidase: a personal account. In: POTTER, C. W. (Ed.). **Influenza**. Amsterdam: Elsevier Science, 2002. p. 31-48.

LAVER, W. G.; BISCHOFBERGER, N.; WEBSTER, R. G. Disarming flu viruses. **Sci. Am.**, v. 280, p. 78-87, 1999.

LEUNG, N. G. K. A.; WANG, J. H.; SHAW, P. C. Structure and sequence analysis of influenza A virus nucleoprotein. **Science in China Series**, v. 52, n. 5, p. 439-449, 2009.

LEAL, A. L. **Associação clínico-laboratorial de infecções causadas por vírus respiratórios em crianças com idade inferior a 05 anos atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo**. 2005. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

- LIN, S. C. et al. Molecular epidemiology and antigenic analyses of influenza A viruses H3N2 in Taiwan. **Clinical Microbiol. and Infect.**, v. 17, n. 2, p. 214–222, 2011.
- LIN, Y. P. et al. Neuraminidase Receptor Binding Variants of Human Influenza A(H3N2) Viruses Resulting from Substitution of Aspartic Acid 151 in the Catalytic Site: a Role in Virus Attachment. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6769-6781, 2010.
- LU, B. et al. Single amino acid substitutions in the hemagglutinin of influenza A/Singapore/21/04 (H3N2) increase virus growth in embryonated chicken eggs. **Vaccine**, v. 24, n. 44, p. 6691-6693, 2006.
- LYNCH, J. P.; WALSH, E. E. Influenza: evolving strategies in treatment and prevention. **Respir. Crit. Care. Med.**, v. 28, p. 144-158, 2007.
- MACAULEY, J. L.; ZHANG, K.; MCCULLERS, J. A. The effects of influenza A virus PB1-F2 protein on polymerase activity are strain specific and do not impact pathogenesis. **J. Virol.**, v. 84, n. 1, p. 558-564, 2010.
- MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. real time PCR in virology. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.
- MATLIN, K.S. et al. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. **J. Cell. Biol.**, v. 91, n. 3, n.1, p. 601-613, 1981.
- MELIDOU, A. et al. Molecular and phylogenetic analysis and vaccine strain match of human influenza A(H3N2) viruses isolated in Northern Greece between 2004 and 2008. **Virus Research**, v. 145, p. 220-226, 2009.
- MENDEL, D. B.; ROBERTS, N. A. *In-vitro* and *in-vivo* efficacy of influenza neuraminidase inhibitors. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 11, p. 727-732, 1998
- MONTO A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. **Am. J. Med.** v. 112, n.1, p. 4-12, 2002.
- MOSCONA, A. Neuraminidase inhibitors for influenza. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 1363-1367, 2005.
- MOURA, F. E. A.; PERDIGÃO, A. C. B.; SIQUEIRA, M. M. Seasonality of influenza in the tropics: a distinct pattern in northeastern brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 1, p. 180–183, 2009.

- MUNOZ, F. M. Influenza virus infection in infancy and early childhood. **Pediatr. Respir. Rev.**, v. 4, p. 99-104, 2003.
- MUNSTER, V. J. et al. Spatial, Temporal, And Species Variation In Prevalence Of Influenza A Viruses In Wild Migratory Birds. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. 61, 2007.
- MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. **Orthomyxoviruses**. In: FIELDS, N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Fields Virology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p.1397-1445.
- MYAO, C. R. et al. Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. **Jornal de pediatria**, v. 75, p. 334-343, 1999.
- NAFFAKH, N. et al. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 1283–1291, 2000.
- NEUMANN, G.; HUGHES, M. T.; KAWAOKA, Y. Influenza a virus ns2 protein mediates vrnv nuclear export through nes-independent interaction with hcrl1. **Embo. J.**, v. 19, n. 24, p. 6751-6758, 2000.
- NELSON, M. I. et al. The origin and global emergence of adamantane resistant A/H3N2 influenza viruses. **Virology**, v. 388, p. 270–278, 2009.
- NEUZIL, K. M. - Illness among schoolchildren during influenza season: effect on school absenteeism, parental absenteeism from work, and secondary illness in families. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 156, n. 10, p. 986-991, 2002.
- NEUZIL, K. M.; REED, G. W.; MITCHEL, E. F. Impact of influenza on acute cardiopulmonary hospitalizations in pregnant women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 148, p. 1094-1102, 1998.
- NIJOU, R. et al. Circulation of human influenza viruses and emergence of Oseltamivir-resistant A(H1N1) viruses in Cameroon, Central Africa. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 56, 2010.
- OH, D. Y. et al. MDCK-SIAT1 Cells Show Improved Isolation Rates for Recent Human Influenza Viruses Compared to Conventional MDCK Cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 7, p. 2189–2194, 2008.
- OLIVEIRA, J. F.; SÁ, J. P. O.; CRUZ, M. E. M. Influenza virus A and B Identification and monitoring in the population of Maceió. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 1, p. 241-246, 2004.
- OLSEN, B. et al. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science*, v. 312, n. 5772, p. 384-388, 2006.

OLDSTONE, M. B. A. How viruses escape from cytotoxic T lymphocytes: molecular parameters and players. **Virology**, v. 234, p. 179–185, 1997.

OXFORD, J. S.; LAMBKIN, R. Targeting influenza virus neuraminidase – a new strategy for antiviral therapy. **Drug. Discov. Today**, v. 3, p. 448-456, 1998.

PABBARAJU, K. et al. Adamantane resistance in circulating human influenza A viruses from Alberta, Canada (1970-2007). **Antiviral. Res.**, v. 79, n. 2, p. 81-86, 2008.

PAIVA, T. M. Outbreak of Influenza type a (H1N1) in Iporanga, São Paulo state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, p. 311-315, 2001.

PAIVA, T. M. Epidemiological study of Influenza vírus in Brazil from 1996-1998. **J. Brazilian Society for Virology**, v. 5, n. 1, p. 51-63, 2000.

PAIVA, T. M. Influenza virus surveillance by institute adolfo lutz during 2006. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 17., 2006, Campos do Jordão. **Abstracts...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 2006. p. 167-168, res. 165pp - flu5.

PALESE, P.; SHAW, M. L. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication.. In: FIELDS, N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. cap. 48.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO), Facts About the Definition of the Pandemic Influenza (H1N1) 2009 and Vaccine Safety. 2009. Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=8001&Itemid=> Acesso em: 10 jan. 2011.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO), PAHO Information-Vaccine Procurement and Vaccination Advances: Report on the progress of the A H1N1 Influenza Vaccination. 2010. Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=2527&Itemid=2030&lang=em> Acesso em: 10 jan. 2011.

PEIRIS, J. S.; JONG, M. D.; GUAN, Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, n. 2, p. 243-267, 2007.

PIELAK, R. M.; CHOU, J. J. Flu channel drug resistance: a tale of two sites. **Protein Cell**, v. 1, n. 3, p. 246-258, 2010.

PIELAK, R. M.; CHOU, J. J. Influenza M2 proton channels. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 2, p. 522-529, 2011.

PODDAR, S. K. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (rt-pcr) and agarose gel electrophoresis. **J. Virol. Methods.**, v. 99, p. 63-70, 2002.

PONTORIERO, A. V. et al. Antigenic and genomic relation between human influenza viruses that circulated in Argentina in the period 1995-1999 and the corresponding vaccine components. **J. Clin. Virol.**, v. 28, p. 130-140, 2003.

PORTELA, A.; DIGARD, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 723-734, 2002.

POTTER, C. W. A History of Influenza. **J. App. Microbiol.**, v. 91, p. 572-579, 2001.

PUZELLI, S. et al. Serological Analysis of Serum Samples from Humans Exposed to Avian H7 Influenza Viruses in Italy between 1999 and 2003. **B R I E F R E P O R T. J. Infec. Dis.**, v. 195, p. 1318-1322, 2005.

RENNELS, M. B.; MEISSNER, H. C.; COMMITTEE ON INFECTION DISEASES. Technical Report: reduction of the influenza burden in children. **Pediatrics**, v. 110, n. 6, p. 1246-1252, 2002.

RICHT, J. A.; GARICIA-SATRE, A. Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 333, p. 177-195, 2009.

ROTANOV, M. et al. Molecular-genetic analysis of epidemical strains of influenza a virus based on the neuraminidase and M2 protein gene sequence. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**, v. 23, n. 2, p. 83-88,

ROTHBERG, M. .; HAESSLER, S.; BROWN, R. Complications of Viral Influenza. **The American Journal of Medicine**, v. 121, n. 4, 2008.

SACRAMENTO, P. R. **Diversidade genética da Neuraminidase (na) de vírus influenza isolados na cidade de São Paulo, de 1995 a 2006.** 2010. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Butantan-Internidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SAITO, R. et al. An off-seasonal amantadine-resistant H3N2 influenza outbreak in Japan. **Tohoku. J. Exp. Med.**, v. 210, n. 1, p. 21-27, 2006.

SALOMON, R.; WEBSTER, R. G. The influenza virus enigma. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 402-10, 2009.

SALTER, A.; LAIO, B.; CROWLEY, B. Emergence and Phylogenetic Analysis of Amantadine-Resistant Influenza A Subtype H3N2 Viruses in Dublin, Ireland, over Six Seasons from 2003/2004 to 2008/2009. **Intervirology**, v. 5, 2011.

SCHANELL, J. R.; CHOU, J. J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. **Nature**, v. 451, p. 591-595, 2008.

SCHULTZ, C. S.; JONES, J. C. Influenza vaccines: the good, the bad, and the eggs. **Adv. Virus Res.**, v. 77, p. 63-84, 2010.

SCHMIDTKE, M. et al. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. **J. Virol.**, v. 49, n. 5, p. 286-93, 2006.

SCHMITT, A. P.; LAMB, R. A. Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. **Adv. Virus Res.**, v. 64, p. 383-416, 2005.

SCHNELL, J. R.; CHOU, J. J.; Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. **Nature**, v. 31, n. 451, p. 532-533, 2008.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, Informe Influenza H1N1. dez. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/>. Acesso em: 15 ago. 2010

SHEU, T. G. et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 3284-3292, 2008.

SHINYA, K. et al. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. **Virology**, v. 320, p. 258-266, 2004.

SHU, L. L.; BEAN, W.J.; WEBSTER, R. G. Analysis of the Evolution and Variation of the Human Influenza A Virus Nucleoprotein Gene from 1933 to 1990. **J. Virol.**, v. 67, n. 5, p. 2723-2729, 1993.

SMITH, D. J. et al. Mapping the Antigenic and Genetic Evolution of Influenza Virus. **Science**, v. 305, p. 371-376, 2006.

SONG, J. et al. The PA protein directly contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses in domestic ducks. **J. Virol.**, 2010 Dec 22. [Epub ahead of print].

- STIVER, G. The treatment of influenza with antiviral drugs. **CMAJ**, v. 168, p. 49-57, 2003.
- STOCKTON, J. et al. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2990-2995, 1998.
- STOUFFER, A. et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. **Nature**, v. 451, p. 596-599, 2008.
- STUDAHL, M. Influenza virus and CNS manifestations. **J. Clin. Virol.**, v. 28, p. 225-232, 2003.
- SUBBARAO, K. et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. **Science**, v. 279, p. 393-396, 1998.
- SUI, J. et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 3, p. 265-273, 2009.
- SHU, L. L.; BEAN, W. J.; WEBSTER, R. G. Analysis of the Evolution and Variation of the Human Influenza A Virus Nucleoprotein Gene from 1933 to 1990. **Journal of Virology**, v. 67, n. 5, p. 2723-2729, 1993.
- SIMONSEN, L. et al. The Genesis and Spread of Reassortment Human Influenza A/H3N2 Viruses Conferring Adamantane Resistance. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, n. 8, p.1811–1820, 2007.
- SKEHEL, J. J; WILEY, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 531–569, 2000.
- SKOWRONSKI, D. M. et al. Estimating vaccine effectiveness against laboratory-confirmed influenza using a sentinel physician network: Results from the 2005–2006 season of dual A and B vaccine mismatch in Canada. **Vaccine**, v. 25, n. 15, p. 2842-2851, 2007.
- TALAVERA, G. A. Influenza: historia de una enfermedad. **Rev. Bioméd.**, v. 10, n. 1, p. 57-61, 1999.
- TANG, J. W. et al. Emergence of adamantane-resistant influenza A(H3N2) viruses in Hong Kong between 1997 and 2006. **J. Med. Virol.**, v. 80, n. 5, p. 895-901, 2008.
- TAUBENBERGER, J. K. et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. **Nature**, v. 437, p. 889-893, 2005.

TISONCIK, J. R.; GUO, Y.; CORDERO, K.; YU, J.; WANG, J.; CAO, Y.; RONG, L. Identification of critical residues of influenza neuraminidase in viral particle release. **Viol. J.**, v. 8, n. 1, p. 14, Jan 2011. [Epub ahead of print]

THIR, Y. E. et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 1, p. 25-31, 2007.

THOMAZELLI, L. M. **Vigilância epidemiológica de vírus respiratórios humanos em amostras clínicas pela técnica de genescan-rt-pcr.** 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TONIOLLO NETO, J. **A História da Gripe: A influenza em todos os tempo e agora.** São Paulo: Mundial Editora e Gráfica, 2001.

TOSH, P. K.; JACOBSON, R. M.; POLAND, G. A. Influenza vaccines: from surveillance through production to protection. **Mayo. Clin. Proc.**, v 85, n. 3, p. 257-273, 2010.

TREANOR, J. J. et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza. **JAMA**, v. 283, p. 1016-1024, 2000.

UNGCHUSAK, K. et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 4, p. 333-340, 2005.

UZUKI, Y. et al. Epidemiologic study of influenza infection in Okinawa, Japan, from 2001 to 2007: changing patterns of seasonality and prevalence of amantadine-resistant influenza A virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 3, p. 623-629, 2009.

VALDEZ, A. R. Pandemia de gripe Sinaloa, 1918-1919. **Elementos: ciencia y cultura**, v. 9, n. 47, p. 37-43, 2002.

VAN REETH, K. Avian and Swine Influenza Viruses: our current understanding of the zoonotic risk. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 243-260, 2007.

VEDOVELLO, D. **Detecção, tipagem e subtipagem dos vírus influenza a e b em crianças de São Paulo.** 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

VIBOUD, C.; ALONSO, W. J.; SIMONSEN, L. Influenza in tropical regions. **PLoS Med.**, v. 3, n. 4, p. 89, 2006.

VIEIRA, S. E. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in Sao Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 125-131, 2001.

VIJAYKRISHNA, D. et al. Reassortment of Pandemic H1N1/2009 Influenza A Virus in Swine. **Science**, v 18, n. 5985, p. 1529, 2010.

VON ITZSTEIN, M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 967-974, 2007.

WANG, M. Z.; TAI, C. Y.; MENDEL, D. B. Mechanism by which mutations at His274 alter sensitivity of influenza A virus N1 neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, p. 3809–3816, 2002.

WANG, T.; PALESE, P. Universal epitopes of influenza virus hemagglutinins. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 3, p. 233-234, 2009.

WANITCHANG, A.; JENGARD, J.; JONGKAEWWATTANA, A. The N terminus of PA polymerase of swine-origin influenza virus H1N1 determines its compatibility with PB2 and PB1 subunits through a strain-specific amino acid serine 186. **Virus Res.**, v. 155, n. 1, p. 325-333, 2011.

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 152-179, 1992.

WEBSTER, R. G.; LAVER, W. G. Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on hong kong (h3n2) influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. **Virology**, v. 104, p. 139–148, 1980.

WILSON, I. A.; COX, N. J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 737–771, 1990.

WILEY, D. C.; WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. **Nature**, v. 289, n. 5796, p. 373-378, 1981.

WINTER, G.; FIELDS, S. The structure of the gene encoding the nucleoprotein of human influenza virus A/PR/8/34. **Virology**, v. 114, p. 423–428, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – Global Alert and Reponse. Availability of a new recombinant H5N1 vaccine virus. 2009. Disponível em:
<http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/H5N1virus26May/en/index.html> Acesso em: 10 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Weekly update - Influenza - update 115, ago 2010e
Disponível em <http://www.who.int/csr/don/2010_08_27/en/index.html> Acesso em: 29 ago. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) weekly update - Pandemic (H1N1) 2009b - update 112.
Disponível em <http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/> Acesso em: 29 ago. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO, 2010f. Disponível em:
<http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_01_20/en/index.html>
Acesso em: 30 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Influenza - Overview, fact sheet n° 211, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>> Acesso em: 20 ago. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Influenza - update 114, 2010d. Disponível em:
<http://www.who.int/csr/don/2010_08_20/en/> Acesso em: 20 ago. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Influenza (Seasonal), fact sheet n° 211, 2009a.
Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>> Acesso em: 15 jan. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Pandemic (H1N1) 2009, Current WHO phase of pandemic alert for Pandemic (H1N1) 2010d. Disponível em
<<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/phase/en/>> Acesso em: 29 ago. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. *Weekly epidemiological record*. 2009b. Disponível em
<<http://www.who.int/wer/2009/wer8449/en/index.html>> Acesso em 20 jan 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2011 southern hemisphere influenza season. 2010d. Disponível em
<<http://www.who.int/csr/disease/influenza/recommendations2011south/en/index.html>> Acesso em: 10 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2011 southern hemisphere influenza season, 2010g. Disponível em
<http://www.who.int/csr/disease/influenza/201009_Recommendation.pdf> Acesso em: 10 jan 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record, 2011. Vol. 86, n. 1, p. 1–16. Disponível em <http://www.who.int/wer/2011/wer8601_02/en/index.html> Acesso em: 10 jan 2011.

WRIGHT, P. F.; WEBSTER, R. G. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (Ed.). **Fields virology**. 4th ed. New York: Raven Press, 2001. p. 1533-1579.

WRIGHT, P.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed) **Fields Virology**. 5rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1691-1740.

XU, X. Genetic variation in neuraminidase genes of influenza a (h3n2) viruses. **Virology**, v. 224, p. 175-183, 1996.

YAVARIAN, J. et al. Analysis of the Hemagglutinin and Neuraminidase genes of human Influenza A/H3N2 viruses circulating in Iran between 2005 and 2007: Antigenic and Phylogenetic relationships to vaccine strains. **Intervirology**, v. 53, n. 2, p. 133-140, 2010.

YEN, H. L.; HOFFMANN, E.; TAYLOR, G.; SCHOLTISSEK, C.; MONTO, A. S.; WEBSTER, R. G.; GOVORKOVA, E. A. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. **J. Virol.**, v. 80, p. 8787-8795, 2006.

YEWDELL, J. W.; HACKETT, C. J. Specificity and function of T lymphocytes induced by influenza A viruses. In: KRUG, R. M. (Ed.). **The influenza viruses**. New York: Plenum, 1989. p. 361-429.

YUKI, F. et al. Reversion of Influenza A (H3N2) Virus from Amantadine Resistant to Amantadine Sensitive by Further Reassortment in Japan during the 2006-to-2007 Influenza Season. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 3, p. 841-844, 2009.

ZARAKET, H. et al. Genetic Makeup of Amantadine-Resistant and Oseltamivir-Resistant Human Influenza A/H1N1 Viruses. **J. Clinic. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 1085-1092, 2010.

ZARAKET, H. et al. Genomic events contributing to the high prevalence of amantadine-resistant influenza A/H3N2. **Antivir. Ther.**, v. 15, n. 3, p. 307-319, 2010.

ZENG, Y. et al. Hospitalized children with 2009 influenza a (H1N1) infection in Shenzhen, China, november-december 2009. **Pediatr. Pulmonol.**, 2010 Oct 20. [Epub ahead of print].

ZHENG, B. et al. D225G mutation in hemagglutinin of pandemic influenza H1N1 (2009) virus enhances virulence in mice. **Exp. Biol. Med.**, v. 235, n. 8, p. 981-988, 2010.

WOLF, Y. et al. Long intervals of stasis punctuated by bursts of positive selection in the seasonal evolution of influenza A virus. **Biology Direct**, v. 1, n. 34, p. 1186-1745, 2006.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: Diversidade genética dos vírus Influenza A isolados de crianças em São Paulo

Seu filho está sendo convidado a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos (ou estaremos) fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(à) seu (sua) filho(a).

Eu , RG , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) nascido(a) em ____ / ____ /____ , seja voluntário do estudo “**Diversidade genética dos vírus Influenza A isolados de crianças em São Paulo**”. Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

- I) O estudo é necessário para que se possa descobrir as possíveis causas e/ou o tratamento, se apropriado, da doença denominada “**doenças respiratórias**”;
- II) Serão feitas colheitas de aspirado de nasofaringe e swab nasal do(a) meu(minha) filho(a);
- III) Estas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o tratamento de meu (minha) filho(a); sem provocar danos ou dor
- IV) A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim;
- V) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho(a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médicos a que ele(ela) estiver sendo submetido;

VII) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados;

VIII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo;

IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP -, no Fone 3091.7733 ou (telefone do pesquisador) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

OBS: Assinalar abaixo com (x):

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Paciente / Responsável

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Dr. RESPONSÁVEL

ANEXO B – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa, envolvendo Seres Humanos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 04 de outubro de 2007.

PARECER 808/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, em sua 79ª reunião realizada em 03.10.07, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Diversidade genética dos vírus Influenza A isolados de crianças de São Paulo".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão o referido projeto foi **aprovado** por esta Comissão.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **03 de outubro de 2008**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilima, Sra.
Danila Vedovello de Jesus
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

ANEXO C – Lista de Amotras colhidas no Hospital Universitário, durante o ano de 2006

Amostra	Sexo	Idade (meses)	Duplex	Multiplex	Internação	Enfermaria (dias)	UTI (dias)	ATB	HD Inicial
789	F	1,32	IA	(H1N1)	NI	0	0		
791	M	4,11	RSV+IA	(H3N2)	11/5/2006	2	0	S	
840	F	7,33	IA	(H1N1)	20/5/2006	8	0	S	
842	F	26,2	IA	NS	21/5/2006	7	0	S	
854	M	12	IA	(H1N1)	24/5/2006	6	0	S	Pneumonia+BCE
859	M	3,48	IA	NS	26/5/2006	2	0	S	BCP+BCE
864	M	1,27	RSV+IA	NS	26/5/2006	6	0	S	bronquiolite+pneumonia
872	M	0,69	IA	(H3N2)	30/5/2006	7Ber	0	S	Pneumonia
875	F	0,9	IA	NS	30/5/2006	5Ber	0	S	FSSL
877	M	1,18	IA	(H3N2)	31/5/2006	2	0	N	bronquiolite
891	M	0,89	IA	(H3N2)	3/6/2006	5Ber	0	S	FSSL
899	M	5,59	IA	(H3N2)	3/6/2006	3	0	S	BCP+BCE
903	M	3,19	RSV+IA	(H3N2)	6/6/2006	3	0	S	bronquiolite+pneumonia
933	M	2,5	IA	(H1N1)	15/6/2006	10	0	S	pneumonia
939	M	12,3	IA	(H3N2)	16/6/2006	6	0	S	pneumonia+DP
946	M	4,6	IA	(H3N2)	15/6/2006	3	5	N	DDA+desidratação
956	F	14,37	IA	(H3N2)	17/6/2006	6	0	S	pneumonia+BCE
972	M	4,14	IA	(H3N2)	25/6/2006	2	2	S	pneumonia+BCE
979	F	4,08	IA	(H3N2)	NI	0	0		
994	M	8,88	IA	(H1N1)	NI	0	0		
988	F	41,49	IA	(H3N2)	23/6/2006	4	2	S	BCP+BCE
999	M	12,59	IA	(H3N2)	29/6/2006	3	0	S	DDA+desidratação+BCP
1001	F	2,76	IA	(H3N2)	NI	0	0		
1007	M	13,68	RSV+IB	NR	2/7/2006	20	11	S	BCP+BCE
1015	F	8,91	IA	(H3N2)	3/7/2006	4	0	S	BCP+BCE
1026	F	20,42	IA	(H3N2)	1/7/2006	7	0	S	atelectasia
1082	F	20,75	IB	NR	NI	0	0		
1113	M	9,86	IB	NR	6/10/2006	11	0	S	OMA+BCP
1297	M	2,99	IB	NR	17/11/2006	2	0	S	BCP+BCE
		8,7				4,7	0,7		

IA - Influenza A

IB Influenza B

RSV - vírus respiratório sincial

NI - não internada

NS - não subtipado

NR - não realizado

BER - BERÇÁRIO

Anexo D - Lista de Sequencias utilizadas para comparação com as amostras brasileiras

Hemaglutinina: Cepas Vacinais

A/New Caledonia/20/1999(H1N1) - GI:148475356
 A/Brisbane/59/2007(H1N1) - GI:292486388
 A/England/545/2007(H1N1) - GI:212381577
 A/Solomon Islands/3/2006 - GI:EU124137.1
 A/Wellington/11/2005(H1N1) - GI:113170881
 A/Denmark/16/2004(H1N1) - GI:158830228
 A/Beijing/262/1995(H1N1) - GI:194304859
 A/Brazil/140/01(H1N1) - GI:84796556
 A/California/7/2004(H3N2) - GI:110825890
 A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) - GI:133722651
 A/Wellington/1/2004(H3N2) - GI:109915204
 A/Brisbane/10/2007(H3N2) - GI:226955240
 A/Fujian/411/2002(H3N2) - GI:145284453
 A/Sydney/5/1997(H3N2) - GI:226955221

Nucleoproteína: Cepas Vacinais

A/Brisbane/59/2007(H1N1) - GI:292486390
 A/England/545/2007(H1N1) - GI:212381579
 A/Wellington/11/2005(H1N1) - GI:113170888
 A/Denmark/16/2004(H1N1) - GI:158830424
 A/Beijing/262/1995(H1N1) - GI:194304866
 A/Wisconsin/67/2005(H3N2) - GI:194352339
 A/Wellington/1/2004(H3N2) - GI:109915211
 A/Brisbane/10/2007(H3N2) - GI:208343862
 A/Moscow/10/1999(H3N2) - GI:158830418
 A/Sydney/5/1997(H3N2) - GI:226955228

Neuraminidase: Cepas Vacinais

A/Brisbane/59/2007(H1N1) - GI:292486392
 A/England/545/2007(H1N1) - GI:182411818
 A/Wellington/11/2005(H1N1) - GI:113170886
 A/Denmark/16/2004(H1N1) - GI:158830174
 A/Beijing/262/1995(H1N1) - GI:194304864
 A/California/7/2004(H3N2) - GI:157104165
 A/Wisconsin/67/2005(H3N2) - GI:194352337
 A/Wellington/1/2004(H3N2) - GI:109915209
 A/Brisbane/10/2007(H3N2) - GI:208343860
 A/Sydney/5/1997(H3N2) - GI:226955226

Neuraminidase: Resistentes ao Oseltamivir

A/Texas/12/2007(H3N2) - GI:208609595
 A/Tilburg/43659/2005(H3N2) - GI:208609896
 A/Bethesda/956/2006(H3N2) - GI:290745577

Matriz: Cepas Vacinais

A/Brisbane/59/2007(H1N1) GI:292486394
 A/England/545/2007(H1N1) GI:212381581
 A/Wellington/11/2005(H1N1) GI:113170883
 A/Denmark/16/2004(H1N1) GI:158830518
 A/Beijing/262/1995(H1N1) GI:194304861
 A/Wisconsin/67/2005(H3N2) - GI:194352334
 A/Wellington/1/2004(H3N2) - GI:109915206
 A/Brisbane/10/2007(H3N2) - GI:226955242
 A/Fujian/411/2002(H3N2) - GI:110810267
 A/Moscow/10/1999(H3N2) - GI:158830495
 A/Sydney/5/1997(H3N2) - GI:226955223

Matriz: Resistentes a Amantadina

A/Canterbury/53/2001 (H1N1) - GI:90572355
 A/Hanfang/411/2001 (H1N1) - GI:293597860
 A/Sichuan/401/1997 (H1N1) - GI:293599360
 A/Hong Kong/2652/2006 (H1N1) - GI:187935882
 A/Sendai/TU101/2006 (H1N1) - GI:290755661
 A/Shaanxi-Beilin/1106/2007 (H1N1) - GI:293598658
 A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) - GI:194304804
 A/WSN/1933 (H1N1) - GI:194352372
 A/Dunedin/8/2002 (H3N2) - GI:109914974
 A/Beijing/30/2005 (H3N2) - GI:293600017
 A/Canterbury/200/2004 (H3N2) - GI:251831247
 A/Malaysia/434/2004 (H3N2) - GI:110810279
 A/Beijing-Xicheng/148/2007(H3N2) - GI:293600674

Não Estrutural: Cepas Vacinais

A/Brisbane/59/2007(H1N1) - GI:292486397
 A/England/545/2007(H1N1) - GI:212381584
 A/Wellington/11/2005(H1N1) - GI:113170890
 A/Denmark/16/2004(H1N1) - GI:158830601
 A/Beijing/262/1995(H1N1) - GI:194304868
 A/Wisconsin/67/2005(H3N2) - GI:194352341
 A/Wellington/1/2004(H3N2) - GI:109915213
 A/Brisbane/10/2007(H3N2) - GI:208343864
 A/Fujian/411/2002(H3N2) - GI:169880972
 A/Moscow/10/1999(H3N2) - GI:158830583
 A/Sydney/5/1997(H3N2) - GI:226956

