

PRISCILA COMONE

**Diversidade genética da Hemaglutinina (HA) de
vírus Influenza A, entre 1995 e 2006**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2011

PRISCILA COMONE

**Diversidade genética da Hemaglutinina (HA) de vírus Influenza
A, entre 1995 e 2006**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Fongaro
Botosso

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

Comone, Priscila.

Diversidade genética da hemaglutinina (HA) de vírus influenza A, entre 1995 e 2006 / Priscila Comone. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Viviane Fongaro Botosso.

Dissertação (Mestrado) – 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: Diversidade genética de vírus.

Versão do título para o inglês: Genetic diversity of hemagglutinin (HA) of influenza A virus, from 1995 to 2006.

Descritores: 1. Influenza 2. *Orthomixoviridae* 3. Sequenciamento genético 4. Virologia molecular 5. Evolução molecular 6. Genoma
I. Botosso, Viviane Fongaro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB083/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Priscila Comone.

Título da Dissertação: Diversidade genética da hemaglutinina (HA) de vírus influenza A, entre 1995 e 2006.

Orientador(a): Viviane Fongaro Botosso.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../.....,

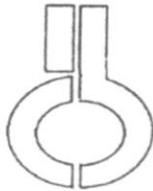
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



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, 11 de abril de 2006.

PARECER 700/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em 64ª Reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Diversidade genética da hemaglutinina (HA) de vírus influenza isolados na cidade de São Paulo, 1995-2005*".

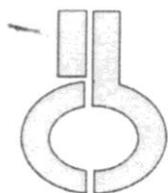
Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

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

Ilma. Sra.
PRISCILA COMONE
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP



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) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

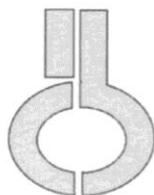
Decl. CEP SH. 078.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 700/CEP, de 11.04.06, por solicitação da pesquisadora PRISCILA COMONE, responsável pelo projeto de pesquisa, autorizo a inclusão de amostras colhidas no ano de 2006", alterando o título para "***Diversidade genética da hemaglutinina (HA) de vírus influenza isolados na cidade de São Paulo, 1995-2006***", não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 14 de agosto de 2009.

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP



**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) (011) 3091 7733 - telefax: (55) (011) 3091 8405

Decl. CEP SH. 028.11

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 700/CEP, de 11.04.06, informo que o título do Projeto foi alterado para ***"Diversidade genética da Hemaglutinina (HA) de vírus influenza A, entre 1995 e 2006"*** não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 28 de abril de 2011.

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

*À minha mãe Heloisa e
meu pai Renato (in
memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai. Tenho a absoluta certeza que lá “de cima” ele segurou minha mão e me guiou sempre pelo melhor caminho. Fez de mim forte e corajosa para enfrentar tudo de cabeça erguida. Ele estaria tão orgulhoso de mim hoje...

A minha orientadora Dra Viviane Fongaro Botosso. Obrigada por abrir as portas do seu laboratório recém inaugurado e ainda sem “habitantes”. Por toda a confiança quando me deixou fazer parte do VGDN. Pelos inúmeros ensinamentos e aprendizados. Por tornar aqueles minúsculos tubos cheios de “água” a coisa mais fantástica do mundo. Pela maneira delicada de puxar a orelha. Por ter sempre uma palavra animadora e de incentivo quando pensava que não daria mais. Por toda a sua compreensão. Vivi, só tenho a te agradecer, obrigada por tudo!

A minha mãe. Minha musa inspiradora. Por ser meu exemplo de garra e coragem. Por ser minha amiga, antes de ser minha mãe. Por mostrar que por pior que fosse o tombo sempre era possível levantar e recomeçar. Por sempre me colocar no caminho certo. Pelos conselhos e por todas as palavras de apoio. Obrigada simplesmente por existir em minha vida.

A minha irmã que apesar de mais nova muitas vezes fez o papel da mais velha. Pelo colo sempre pronto a me acolher. Por sua amizade e companhia. Pelas risadas, por fazer doces gostosos quando a ansiedade tomava conta de mim. Obrigada Magricela, você é meu tudo!

Ao meu namorado. Obrigada por ter entrado em minha vida. Por agüentar meu mau humor e minha tensão infinita enquanto terminava esse trabalho. Por receber todas as “patadas” que não merecia. Por sempre me incentivar e apoiar. Por todo seu carinho, companheirismo e amor.

A Dra Maria Luísa Barbosa. Malu, obrigada por ter me acolhido “lá atrás”, obrigada por toda sua paciência ao me ensinar a “andar” dentro do laboratório.

A Cosue Miyaki, Pesquisadora do Laboratório de Influenza, pela oportunidade do “primeiro emprego”. Por ter depositado em mim confiança mesmo antes de me conhecer. Obrigada pelos muitos ensinamentos, não apenas profissionais, mas por me ajudar a amadurecer como pessoa.

Ao Maurício Meros, responsável pelo Laboratório de Influenza, por sempre acreditar que tudo daria certo. E não é que deu!? Obrigada por todo carinho, confiança e apoio.

Ao Prof. Dr. Edison Luís Durigon por permitir que eu fizesse parte da sua equipe e pela gentileza ao ceder às amostras para que fosse possível a realização desse sonho.

A minha avó querida que mesmo sem saber ao certo o que eu estava fazendo torcia por mim e vibrava a cada nova conquista.

À minha madrinha e meu tio que sempre torceram por mim. Pelos muitos recortes de jornais e revistas trazendo sempre novidades úteis para escrever esse trabalho.

Ao meu cunhado. Que adorava me tirar do sério quando eu não podia. Por me azucrinar até que eu perdesse a linha do alinhamento e tinha que começar tudo de novo (isso o deixava feliz). Por me fazer rir todos os dias. Obrigada querido.

A Danila Vedovello. Obrigada por todas as vezes que me fez rir quando eu queria chorar. Por apoiar minha vontade de fugir e largar tudo e ao mesmo tempo segurar minha mão e não me deixar desanimar. Por me dar colo, mesmo quando era você quem mais precisava. Por estar sempre pronta quando ouvia meu grito de “socorro”. Pelos muitos conselhos, pela companhia noturna “on line”. Dan obrigada por sua amizade.

Aos amigos de trabalho e amigos para vida toda, Sr João, Rí e Edu. Obrigada pelos momentos de distração e por terem sempre uma palavra amiga. Por agüentarem minha cara feia e meu mau humor toda manhã. Por tornarem a produção divertida e por todas as vezes que rimos juntos de tanto nervoso e assim nosso “instinto assassino” ia embora e tudo ficava bem. Por me ensinarem que se tá “ruim” pode ficar pior, mas que isso não será motivo para desistir. E que o “bicho é feio”, mas sempre somos capazes de vencê-lo. Obrigada por formarmos “O Quarteto”.

As meninas e menino do “Laboratório da Vivi” Pati Sacramento, Pri Perrini, Mari Durigan e César. Obrigada pela companhia durante todos esses anos. Por todo apoio e por toda ajuda que nunca me foi negada. Vocês tornaram todos esses anos muito especiais.

As meninas Vilany, Julliana e Fernanda e aos meninos Gustavo e Hugo, do Laboratório de Influenza, por entenderem minha ausência quando estava terminando esse trabalho.

A turma do Laboratório de Influenza, Camila, Clayton, Tiago e Antônio, pelas piadas e boas risadas na hora do café.

Aos criadores de FarmVille e CityVille que me proporcionaram momentos de distração. Enquanto pensava o que iria plantar ou onde iria colocar minha casa nova, esquecia das cobranças, das responsabilidades e voltava a me sentir a criança mais feliz do mundo.

Ao criador do Facebook que me permitiu gritar para todo mundo ouvir quando eu tive vontade.

A Fábria, Eliane e Marco (da secretária da BIOTEC) por estarem sempre prontos para auxiliar no que fosse necessário.

A Mônica (da biblioteca do ICB) por transmitir tanta calma e pela enorme paciência em ajudar na formatação desse trabalho

A todos que mesmo sem saber tornaram possível a realização desse trabalho.

*O futuro tem muitos nomes.
Para os fracos é o inalcançável.
Para os temerosos é o desconhecido.
Para os valentes é a oportunidade.*

(Victor Hugo)

RESUMO

COMONE, P. **Diversidade genética da Hemaglutinina (HA) de vírus Influenza A, entre 1995 e 2006.** 2011. 134 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os *Influenzavirus* podem ser classificados de acordo com suas glicoproteínas externas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), ambas apresentando alta variabilidade genética e antigênica. No presente estudo foi realizada análise molecular do gene HA, do vírus influenza A (IA) em amostras colhidas de crianças e lactentes com sintomatologia respiratória atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP), durante os anos de 1995 a 2006. Um total de 3.009 amostras foram analisadas por duplex RT-PCR e 4,38% (n=132) foram positivas, sendo 12,1% (n=16) Influenza B e 87,9% (n=116) IA, das quais 9% (n=9) eram H1N1, 91% (n=91) eram H3N2 e 13,8% (n=16) não foram subtipadas. A região HA1 do gene HA de 39 amostras foi sequenciada e as sequências comparadas com as cepas vacinais e circulantes dos respectivos anos. A região de ligação ao receptor foi conservada em todas as amostras e foram verificadas alterações de aminoácidos principalmente nos sítios antigênicos e arredores. No geral, as cepas vacinais foram compatíveis com as circulantes em São Paulo.

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

ABSTRACT

Comone, P. **Genetic diversity of hemagglutinin (HA) of Influenza A virus from 1995 to 2006.** 2011. 134 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The *Influenzavirus* can be classified according to their external glycoproteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), both showing high genetic and antigenic variability. In the present study was carried out molecular analysis of the HA gene of influenza A (IA) in samples harvested from children and infants, with respiratory symptoms attended at University Hospital, University of Sao Paulo (USP), during the years 1995 to 2006. A total of 3,009 samples were analyzed by duplex RT-PCR and 4.38% (n = 132) were positive, being 12.1% (n = 16) Influenza B and 87.9% (n = 116) IA, where which 9% (n = 9) were H1N1 and 91% (n = 91) were H3N2 and 13.8% (n = 16) did not subtyped. The HA1 region of HA gene of 39 samples were sequenced and the sequences compared with vaccine strains and circulating strains in those years. The receptor-binding region was conserved in all samples and aminoacid changes were observed mainly in the antigenic sites and surroundings. Overall, the vaccine strains were consistent with those circulating in Sao Paulo.

Keywords: Influenza. *Orthomixoviridae*. Molecular Virology. Genetic sequencing. Molecular Evolution. Genome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama da partícula do vírus influenza.....	25
Figura 2 – Estrutura primária da hemaglutinina.....	29
Figura 3 - Estrutura molecular da hemaglutinina.....	30
Figura 4 - Estrutura do tetrâmero da neuraminidase.....	31
Figura 5 - Diagrama esquemático do ciclo replicativo do vírus influenza exibindo as etapas e proteínas envolvidas no processo.....	33
Figura 6 - Distribuição dos subtipos de hemaglutinina e neuraminidase do vírus Influenza A entre as diferentes espécies animais.....	35
Figura 7 – Rearranjo do vírus influenza: Origem do vírus influenza A H1N1 pandêmico, em 2009.....	39
Figura 8 - Circulação mundial de influenza vírus. No. total de espécies positivas para influenza por subtipo. Dados da semana 06 de março de 2011 a 12 de março de 2011.....	40
Figura 9 – Esquema do emparelhamento dos <i>primers</i> utilizados na PCR e <i>nested</i> ou <i>semi-nested</i> PCR para amplificação da hemaglutinina, subtipo H1.....	57
Figura 10 - Esquema do emparelhamento dos <i>primers</i> utilizados na PCR e <i>nested</i> ou <i>semi-nested</i> PCR para amplificação da hemaglutinina, subtipo H3.....	58
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da <i>duplex</i> RT-PCR utilizando os <i>primers</i> Fow A – Rev A e Fow B – Rev B, para verificação da amplificação de um fragmento de 190 pb (a) ou de 241 pb (b) do gene NS1 dos <i>Influenzavirus</i> A e B, respectivamente.....	68
Figura 12 - Distribuição do vírus Influenza por mês durante o período de 1995 a 2006.....	70
Figura 13 - Quantidade de casos positivos causados pelo vírus influenza em diferentes faixas etárias.....	70
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da <i>multiplex</i> RT-PCR, utilizando os <i>primers</i> HI1R – H1F e HI3R – HI3F para verificação da amplificação de um fragmento de 165 pb ou 231 pb do gene da hemaglutinina (HA) de IA subtipo 1 (H1) ou do subtipo 3 (H3), respectivamente, e de 427 pb ou 176 pb do gene da neuraminidase (NA) do subtipo 1 (N1) ou do subtipo 2 (N2), utilizando os <i>primers</i> N1R – N1F e NI2R1 – NI2F respectivamente.....	71
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da <i>nested</i> PCR para amplificação do gene da Hemaglutinina, subtipo H1 e H3, padronizada utilizando as amostras controles - (A/Brasil/133/2001 (H1N1) e A/Brasil/125/2001 (H3N2)).....	73

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da <i>nested</i> PCR das amostras clínicas, utilizando os <i>primers</i> H14 – H114 (a) e H110 – H2 (b) para verificação da amplificação de um fragmento de 1040 pb e 739 pb do gene da hemaglutinina (HA).....	74
Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos amplificados do gene da Hemaglutinina (H1) utilizando os <i>primers</i> : HAFwd e HA2, HA3 e HA4, HA5 e HA6 e HA7 e HA-rev.....	74
Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da <i>nested</i> ou <i>semi nested</i> PCR das amostras clínicas, utilizando os <i>primers</i> H33+H34 – H315 (a) e H310 – H2 (b) para verificação da amplificação de um fragmento de 1056 pb e 841 pb do gene da hemaglutinina (HA).....	75
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos amplificados do gene da Hemaglutinina (H3) utilizando os <i>primers</i> : HAFwd e HA2, HA3 e HA4, HA5 e HA6 e HA7 e HA-rev.....	75
Figura 20 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos da HA de 2 amostras de <i>Influenzavirus</i> A, subtipo H1N1, obtidas no período de 1995 à 2006. Foi incluída no alinhamento a cepa vacinal recomendada para o período.....	77
Figura 21 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos da HA de 34 amostras de <i>Influenzavirus</i> A, subtipo H3N2, obtidas no período de 1995 à 2006. Foram incluídas no alinhamento as cepas vacinais utilizadas no período de 1999 à 2006.....	78
Figura 22 - Topologia da árvore obtida pelo método de Máxima Verossimilhança das sequências brasileiras de <i>Influenzavirus</i> A, H3N2. Os valores de <i>bootstrap</i> estão representados sobre os ramos. As amostras brasileiras estão representadas da mesma cor que a cepa vacinal utilizada no período (quadro 9). Cepas: A/Sydney/5/97 , A/Moscow/10/99 , A/Fujian/411/2002 , A/Wellington/1/2004 , A/California/7/2004	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação do número total de amostras colhidas de pacientes atendidos no Hospital Universitário da USP, do número de amostras de Influenza positivas e do número de amostras de <i>Influenzavirus</i> A e B por ano (de 1995 a 2006).....	69
Tabela 2 - Subtipagem das amostras positivas para Influenza A e circulação dos subtipos H3N2 e H1N1 no período de 1995 a 2006.....	72
Tabela 3 - Relação das alterações de aminoácidos quando comparado à cepa vacinal do <i>Influenzavirus</i> A subtipo H1N1.....	91
Tabela 4 - Relação das alterações de aminoácidos quando comparado à cepa vacinal do <i>Influenzavirus</i> A subtipo H3N2.....	92
Tabela C.1 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da hemaglutinina e respectivos fragmentos amplificados. Os <i>amplicons</i> seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco.....	127
Tabela C.2 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da hemaglutinina e respectivos fragmentos amplificados. Os <i>amplicons</i> seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco.....	128
Tabela C.3 - Relação de amostras submetidas à amplificação utilizando os <i>primers</i> HAFwd e HA2, HA3 e HA4, HA5 e HA-6, HA7 e HA-rev para amplificação do gene da hemaglutinina e respectivos fragmentos amplificados. Os <i>amplicons</i> seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco.....	129
Tabela C.4 - Distribuição das amostras sequenciadas de <i>Influenzavirus</i> A subtipo H3N2, número de nucleotídeos e região compreendida.....	130
Tabela D.1 – Distribuição das amostras positivas na <i>Duplex</i> RT-PCR utilizadas com idade e sexo da criança, procedência da amostra colhida e tipo do vírus Influenza.....	131
Tabela E.1 – Distribuição por mês das amostras positivas para o <i>Influenzavirus</i> A e B durante os anos de 1995 a 2006.....	134

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Organização do genoma do vírus da influenza.....	26
Quadro 2 - Organização dos grupos que devem ser considerados de risco de complicações em caso de infecção pelo vírus influenza.....	42
Quadro 3 - Relação dos <i>primers</i> utilizados na <i>duplex</i> RT-PCR, sua localização no genoma viral, polaridade, sequência de nucleotídeos e o tamanho do produto amplificado.	54
Quadro 4 - Relação dos <i>primers</i> utilizados na <i>multiplex</i> RT-PCR (Vedovello, 2006), com modificações baseadas nas sequências mais recentes disponíveis no <i>GenBank</i>	55
Quadro 5 - Relação dos <i>primers</i> utilizados para a padronização da PCR e <i>Nested</i> ou <i>Semi-nested</i> PCR para o gene HA e amplificação das amostras clínicas, sua polaridade, sequência de nucleotídeos (5'– 3'), localização no genoma viral e o tamanho dos produtos amplificados.....	59
Quadro 6 - Padronização da PCR para amplificação do gene HA, subtipos H1 e H3 - Relação das diferentes concentrações de MgCl ₂ , dNTP e <i>primers</i> utilizadas na PCR.....	62
Quadro 7 - Padronização da <i>nested/semi nested</i> PCR para amplificação do gene HA, subtipos H1 e H3 - Cada um dos produtos da PCR (obtidos conforme descrito no quadro 6) foram submetidos a reações com diferentes concentrações de MgCl ₂ , <i>primers</i> , e quantidade do produto de PCR.....	62
Quadro 8 - Relação dos <i>primers</i> , subtipo HA, polaridade, sequência de nucleotídeos 5'– 3' e região dos <i>primers</i> utilizados no sequenciamento do gene da HA.....	64
Quadro 9 - Relação das variantes de <i>Influenzavirus A</i> , H3N2 e H1N1, recomendados pela OMS para composição das vacinas utilizadas no Hemisfério Sul, durante o período de 1999 a 2006.....	66
Quadro B.1 - Relação dos <i>primers</i> utilizados na <i>multiplex</i> RT-PCR, sua localização no genoma, e tamanho do produto amplificado.....	126

LISTA DE SÍMBOLOS

AMINOÁCIDOS

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

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Nome	Abreviação
Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido dextribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos (do inglês: <i>Deoxynucleoside triphosphates</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HA	Hemaglutinina
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFI	Imunofluorescência indireta
M	Molar
mL	Mililitro (10^{-3} litro)
mM	Milimolar (10^{-3} molar)
mRNA	RNA mensageiro
NA	Neuraminidase
nt	Nucleotídeos
°C	Graus Celsius
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
pmol	Picomol (10^{-12} moles)
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
μ l	Microlitro (10^{-6} litro)

SUMÁRIO

1 Introdução.....	23
1.1 Histórico.....	23
1.2 Estrutura do vírus.....	23
1.3 Replicação viral.....	31
1.4 Epidemiologia.....	33
1.5 Transmissão e Sintomatologia.....	40
1.6 Diagnóstico.....	42
1.7 Tratamento e Prevenção.....	44
2 Objetivos.....	50
3 Materiais e Métodos.....	52
3.1 Casuística.....	52
<i>3.1.1 Amostras de coleção.....</i>	<i>52</i>
3.2 Colheita das amostras.....	52
3.3 Extração do RNA total.....	53
3.4 Obtenção do cDNA.....	53
3.5 Duplex RT-PCR para detecção e tipagem.....	54
3.6 Multiplex RT-PCR para subtipagem das amostras positivas para Influenzavirus A.....	55
3.7 Amplificação do gene da hemaglutinina.....	56
<i>3.7.1 Relação dos primers.....</i>	<i>56</i>
<i>3.7.2 Padronização da amplificação do gene – PCR/nested ou semi nested PCR.....</i>	<i>59</i>
<i>3.7.3 Alternativa para amplificação do gene da hemaglutinina.....</i>	<i>61</i>
<i>3.7.4 Análise dos produtos amplificados.....</i>	<i>63</i>
3.8 Purificação dos produtos amplificados.....	63
3.9 Quantificação do DNA.....	63
3.10 Sequenciamento.....	64
3.11 Processamento e alinhamento das sequências.....	65
3.12 Reconstruções filogenéticas.....	66
4 Resultados.....	68
4.1 Duplex RT-PCR para detecção e tipagem dos vírus Influenza A e B.....	68
4.2 Multiplex RT-PCR.....	71
4.3 Amplificação do gene da hemaglutinina para sequenciamento.....	72
4.4 Sequenciamento do gene da hemaglutinina.....	76

4.5 Reconstruções Filogenéticas.....	94
5 Discussão.....	96
6 Conclusões.....	104
Referências.....	106
Anexos.....	124
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	124
ANEXO B - Multiplex RT-PCR para subtipagem das amostras positivas para <i>Influenzavirus A</i>.....	126
ANEXO C – Tabelas de resultados.....	127
ANEXO D – Relação das amostras utilizadas no trabalho.....	131
ANEXO E – Distribuição das amostras positivas durante os anos de 1995 a 2006.....	134

1 Introdução

1.1 Histórico

A influenza, mais conhecida no Brasil como “gripe” é uma doença infecciosa aguda de origem viral que acomete o trato respiratório e a cada inverno atinge mais de 100 milhões de pessoas (HERRMANN; LARSSON; ZWEYGBERG, 2001; FORLEO NETO et al., 2003; ALONSO et al., 2007; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTIO, 2010a). Estima-se que, anualmente, cerca de 10% da população mundial apresente um episódio de influenza (FORLEO NETO et al., 2003; BOON et al., 2008).

O primeiro relato de uma epidemia de gripe foi feito por Hipócrates, em 412 a.C., como uma doença respiratória que matou um grande número de pessoas em poucas semanas e depois desapareceu (GRANATO e BELLEI, 2007; ANDRADE et al., 2009). O termo influenza surgiu na Idade Média, na Itália, quando se acreditava que os sinais clínicos de febre, tosse e calafrio seriam influências planetárias. Em 1933, o vírus responsável por esses quadros, foi isolado e recebeu o nome de Influenza (MURPHY e WEBSTER, 2001; JAWETZ et al., 2009; COUCEIRO, 2002).

1.2 Estrutura e Classificação do Vírus

Os vírus da influenza acometem homens e animais e pertencem à família *Orthomyxoviridae*, sendo que o termo “myxo” se refere ao fato desses vírus interagirem com as mucinas (glicoproteínas). Esta família está dividida em 3 gêneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, baseado principalmente nas diferenças dos epítomos específicos da nucleoproteína (NP) e da proteína de matriz (M) (MURPHY e WEBSTER, 2001).

O sistema de nomenclatura da Organização Mundial da Saúde (OMS) inclui o gênero a que pertencem, a origem geográfica do isolamento, o número da amostra e o ano de isolamento. Adicionalmente, no caso do vírus influenza A, são representados entre parênteses os subtipos de suas estruturas de superfície (HA e NA) (ex. A/Brasil/2/78 (H3N2)) (JAWETZ et al., 2009; MARTINS, 2001; COUCEIRO, 2002).

As partículas virais, quando adaptadas em culturas celulares, geralmente são esféricas. Cepas recém isoladas são pleomórficas podendo, também, ter características filamentosas. As partículas são compostas de 0,8% a 1% de RNA, 70% de proteína, 20% de lipídios, 5 a 8% de carboidratos. Seu genoma é constituído de RNA fita simples, segmentado e de polaridade negativa (MURPHY e WEBSTER, 2001). Os vírus influenza podem ser conservados de 0 a 4 °C durante várias semanas, sem perda de viabilidade. O vírus é sensível ao calor (56 °C – 30 minutos), éter e os desnaturantes protéicos destroem a infecciosidade (JAWETZ et al., 2009; COUCEIRO, 2002).

Os genomas dos vírus do tipo A e B possuem 8 segmentos que codificam pelo menos 11 proteínas, enquanto o genoma do tipo C possui 7 segmentos que codificam nove proteínas (Quadro 1) (JAWETZ et al., 2009; NEUMANN et al., 2000). Os primeiros 12 – 13 nucleotídeos da extremidade de cada segmento genômico são conservados em todos os segmentos de RNA (JAWETZ et al., 2009).

As partículas virais contêm de oito a nove proteínas estruturais diferentes, dependendo do gênero do vírus e uma proteína não estrutural (NS1). Cada um dos 8 segmentos de RNA dos *Influenzavirus A* e *B* e dos 7 segmentos do *Influenzavirus C* estão envolvidos, independentemente, pela nucleoproteína (NP) formando um complexo denominado ribonucleoproteína (RNP). Ligadas a essa RNP encontram-se três proteínas: PB1 (polimerase básica 1), PB2 (polimerase básica 2) e PA (polimerase ácida) (Figura 1). Englobando as RNPs há a matriz protéica, formada pela proteína M1, que corresponde a aproximadamente 40% de toda a proteína viral e desempenha importante papel na morfogênese das partículas do vírus. Finalmente este complexo está envolvido por um envelope lipoprotéico, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira infectada pelo vírus (MARTINS, 2001; MURPHY e WEBSTER, 2001), no qual estão inseridas duas estruturas glicoprotéicas – a hemaglutinina e neuraminidase (HA e NA) e a proteína formadora do canal iônico, M2. A nucleoproteína NP e a proteína de matriz M1, embora desempenhem a mesma função nos vírus influenza A e B, não são relacionadas imunologicamente. Portanto, essas proteínas são utilizadas na diferenciação entre os tipos de vírus (COUCEIRO, 2002; JAWETZ et al., 2009; MARTINS, 2001; MURPHY e WEBSTER, 2001) (Figura 1).

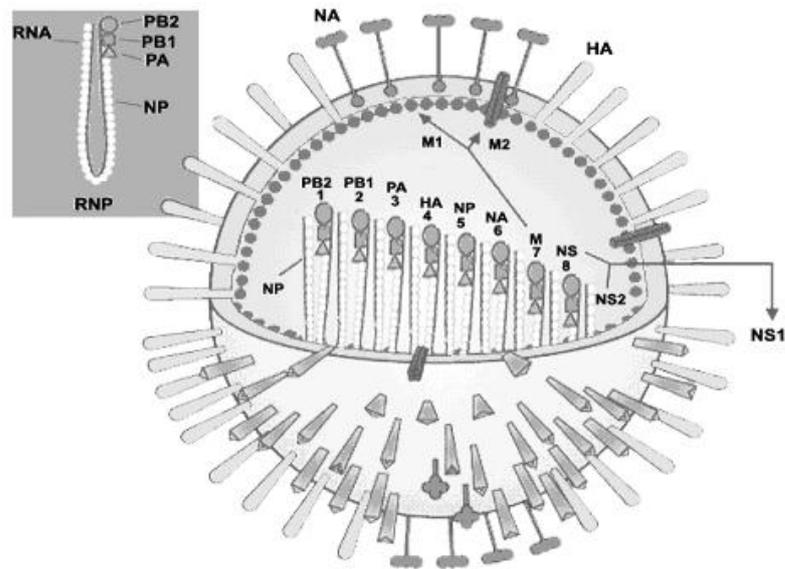


Figura 1 - Diagrama da partícula do vírus Influenza A. A Hemaglutinina, a Neuraminidase e a proteína da Matriz M2, são inseridas ao envelope lipídico. A Matriz (M1) encontra-se subjacente ao envelope e a proteína não estrutural NS2 (NEP), também se encontra associada ao vírus. Os segmentos de RNA viral são revestidos com a nucleoproteína e estão vinculados ao complexo das polimerases.

Fonte: Fields (2007)

Quadro 1 - Organização do genoma do vírus da influenza.

Número do segmento ^{*b}	Tamanho RNA viral (nt)	Proteína codificada		Peso Molecular	Descrição e Função
		IA	IB		
1	2341	PB2	PB2	85.700	Componentes da polimerase viral
2	2341	PB1,	PB1	86.500	
3	2233	PA	PA	84.200	
4	1778	HA	HA	61.500	Glicoproteína de superfície, medeia a fixação do vírus às células. É ativado por clivagem, e possui atividade de fusão em pH ácido.
5	1565	NP	NP	56.100	Associada ao RNA viral e as polimerases. Estrutura helicoidal.
6	1413	NA	NA, NB	50.000	Enzima neuraminidase. Permite a expansão da infecção por facilitar o acesso da partícula viral à superfície das células alvo.
7	1027	M1	M1	27.800	Proteína da matriz, principal componente do vírion, reveste o lado interno do envoltório.
		M2	BM2	11.000	Proteína de membrana integral, canal de íons.
8 ^{*d}	890	NS1	NS1	26.800	Não estrutural, inibe a exportação nuclear de mRNA
		NS2 ^{*c}	NS2	14.200	Componente menor de vírions, função desconhecida.

Fonte: Adaptado de Jawetz et al., 2009.

*b. Os segmentos de RNA são numerados de acordo com seus tamanhos decrescentes.

*c. Atualmente a NS2 recebeu o nome de NEP ("nuclear export protein") desde que se observou tratar-se de uma proteína estrutural.

*d. Influenza vírus C não possui esse segmento de RNA. Os 7 segmentos de RNA desse vírus codificam as proteínas descritas a seguir:

- Segmento 1,2 e 3 codificam as 3 polimerases do vírus denominadas P1, P2 e P3.
- Segmento 4 codifica a proteína HEP, que compreende as funções de HA e NA.
- Segmento 5 codifica a NP,
- Segmento 6 codifica a M1 e CM2
- Segmento 7 codifica as proteínas NS1 e NS2 (NEP).

A proteína PB2, com peso molecular de aproximadamente 85,7 KDa, formada por 759 resíduos de aminoácidos (aa), está envolvida na replicação viral (PALESE e SHAW, 2007; GASTAMINZA et al., 2003) e é responsável pela ligação do cap nas moléculas de pré-RNAm (ANSALDI et al., 1982; JAWETZ et al., 2009; NEUMANN; HUGHES; KAWAOKA, 2000; MARTINS, 2001; MURPHY e WEBSTER, 2001). A PB1, com peso molecular de 96 KDa formada por 757 aminoácidos é codificada pelo segmento 2, que contém 2341 nucleotídeos (nt), tem a função de adicionar os nucleotídeos durante o alongamento do RNA (LAMB e CHOPPIN, 1976). Ela apresenta regiões conservadas características da RNA-polimerase/RNA-dependente (ANSALDI 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; RAO; KRUG, 1998). 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 apoptose celular (CHEN, 2001).

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).

A nucleoproteína (NP) é encontrada em grande quantidade, 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). É o principal componente estrutural dos capsídeos, revestindo o RNA e dando forma à estrutura da ribonucleoproteína (RNP). As diferenças na composição antigênica da NP permitem a classificação nos três gêneros: *Influenzavirus A*, *B* e *C* (MARTINS, 2001).

As proteínas M1 e M2 são produtos da tradução do segmento 7 do RNA. A proteína de matriz M1 (248 aa) está localizada na face interna da dupla camada lipídica, 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; HUI; BARMAN, 2004; SCHMITT e LAMB, 2005). É altamente conservada dentro de cada tipo. A proteína M2 está presente em pequena quantidade no vírion, embora seja muito expressa na membrana plasmática

da célula infectada, formando canais iônicos que facilitam a passagem de íons de sódio através das membranas das células (SCHROEDER et al., 1994). É um tetrâmero homogêneo, em que cada cadeia tem 97 aminoácidos, com 24 resíduos expostos para fora da célula, 19 resíduos na região trans-membrana (formando o poro propriamente dito) e 54 resíduos como caudas intracitoplasmáticas. A sua função 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 (MARTINS, 2001).

O oitavo segmento, formado por 890 nucleotídeos, codifica as proteínas NS1 e NS2. A NS1 é uma proteína dímica, nuclear, altamente expressa em células infectadas, com múltiplas funções para o processo de infecção viral, incluindo a replicação do RNA viral e síntese das proteínas virais, além de estar envolvida na inibição da resposta imune do hospedeiro (HALE et al., 2008). 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 (ROBB et al., 2009).

A hemaglutinina juntamente com a neuraminidase, determinam o aspecto do envelope viral, caracterizado pela presença de aproximadamente 500 projeções radiais de HA. A proporção HA:NA é de 4 a 5 hemaglutininas para cada neuraminidase (MARTINS, 2001). A hemaglutinina é muito estudada devido sua importância na patogenicidade do vírus e para a resposta imunológica do indivíduo (JAWETZ et al., 2009; MURPHY e WEBSTER, 2001). O segmento 4 do RNA genômico (com 1742 a 1778 nt) codifica a hemaglutinina. A proteína é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso como um polipeptídeo único, HA₀, com PM de ≈76.000 Da e com 562 a 566 resíduos de aminoácidos (aa) (MARTINS, 2001). O processamento após tradução envolve mecanismos de glicosilação, adição de ácidos graxos e clivagem proteolítica pelas proteases celulares, sendo a última essencial para a patogenicidade e infecciosidade do vírus. A clivagem desse precursor resulta em duas subunidades, HA1 (PM ≈ 47.000 Da) e HA2 (PM ≈ 29.00 Da) que permanecem unidas por ligações dissulfeto (LEE e CHEN, 2004; XIU et al., 2008). Essa clivagem é necessária para que a partícula viral seja infecciosa (JAWETZ et al., 2009; MARTINS, 2001; FERREIRA et al., 2010).

A subunidade HA1 (formada por 319 a 326 aa) corresponde à porção aminoterminal da proteína e é externa ao envelope viral. A subunidade HA2 (composta de 221 a 222 aa) permanece

ancorada no interior do envelope viral. Dependendo do subtipo da hemaglutinina o número de resíduos de aminoácidos perdidos durante a clivagem proteolítica varia de 1 a 6 (MARTINS, 2001; MURPHY e WEBSTER, 2001; LEE e CHEN, 2004) (Figura 2).

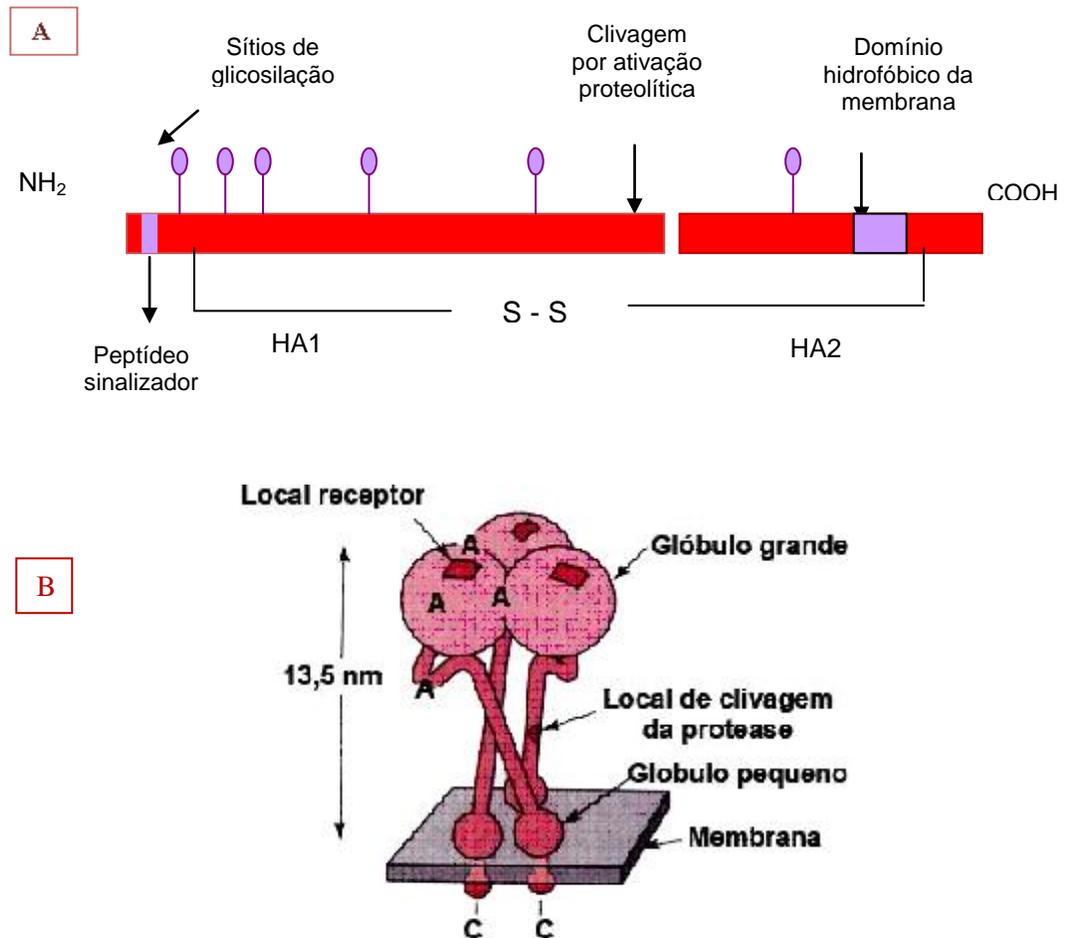


Figura 2 – A) Estrutura primária da hemaglutinina. As regiões HA1 e HA2 estão representadas pelas barras em vermelho. Os sítios de glicosilação estão representados por círculos roxos. B) Estrutura do trímero da hemaglutinina como ocorre na partícula viral ou na superfície da célula infectada. O glóbulo grande e a fração superior da haste (localizada acima do sítio de clivagem) correspondem à região HA1 (amino terminal – A), externa à membrana. A fração carboxi terminal (C) interna à membrana, compreende a região HA2 que se estende até a parte inferior ao sítio de clivagem.

Fonte: Jawetz et al., 2009.

A análise de variantes virais possibilitou a identificação de cinco sítios antigênicos na região HA1 da hemaglutinina, denominados pelas letras A a E, para a região HA1 do vírus influenza do subtipo H3 e Ca2, Sb, Sa, Ca1 e Cb para a região HA1 do vírus influenza do subtipo

H1, que são passíveis de sofrer mutações, sendo portanto, as regiões de maior variabilidade da HA (Figura 3). Esses sítios estão dispostos na sua superfície e estão envolvidos na neutralização viral pelos anticorpos. Já outras regiões são mais conservadas em todos os vírus isolados, cuja seqüência foi estabelecida, concluindo-se que são necessárias para que a molécula mantenha a sua estrutura e função (WILEY; WILSON; SKEHEL, 1981; JAWETZ et al., 2009; MARTINS, 2001; MURPHY e WEBSTER, 2001).

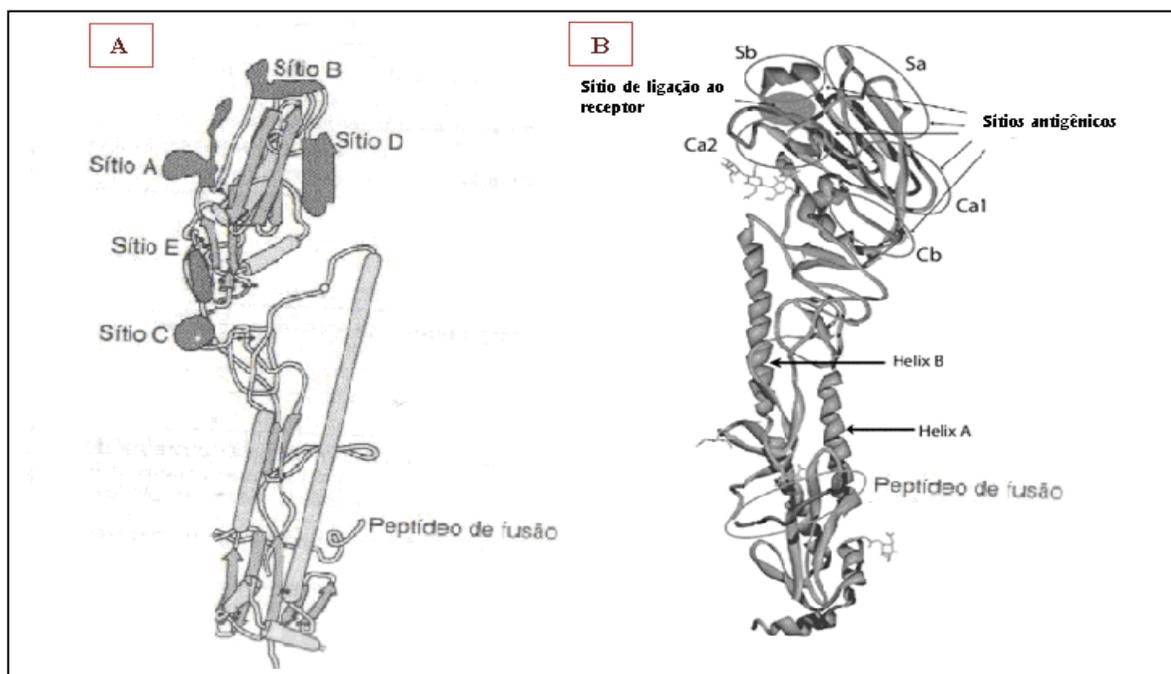


Figura 3 – A) Estrutura molecular da hemaglutinina (subtipo H3) no qual estão identificados os cinco sítios antigênicos (A-E), presentes na região HA1. Próximo à membrana está indicado o peptídeo de fusão, **B)** Estrutura molecular da hemaglutinina do Vírus da gripe Espanhola (H1N1), de 1918. Estão indicados os cinco sítios antigênicos (Ca2, Sb, Sa, CA1 e Cb) que cercam os sítios de ligação aos receptores dos ácidos siálicos. Próximo à membrana está indicado o peptídeo de fusão, e acima as hélices A e B

Fonte: Fields, 2009, Jawetz et al., 2009.

A hemaglutinina é responsável pelos processos de adsorção a receptores celulares de ácido siálico existentes na superfície celular (pela porção HA1) e pela fusão da partícula viral endocitada com a membrana endossomal, permitindo o acesso ao citoplasma (MARTINS, 2001; COUCEIRO, 2002). A hemaglutinina confere também a capacidade de aglutinação ao muco do sistema respiratório. (MARTINS, 2001).

A neuraminidase é codificada pelo segmento 6 do RNA viral. É um tetrâmero, em forma de cogumelo, é responsável pelos processos de clivagem de ácidos siálicos, permitindo a disseminação da infecção por facilitar o acesso da partícula viral à superfície das células alvo, tanto pela degradação do ácido siálico do muco extracelular como pela destruição dos receptores de HA na superfície das células hospedeiras, impedindo que as partículas virais geradas no processo fiquem imobilizadas na superfície das células infectadas (Figura 4) (MARTINS, 2001 COUCEIRO, 2002).

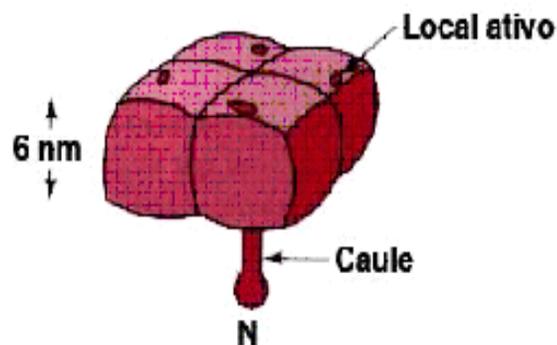


Figura 4 - Estrutura do tetrâmero da neuraminidase. Cada molécula de neuraminidase exibe um local ativo em sua superfície superior. A região aminoterminal (N) dos polipeptídios fixa o complemento na membrana.

A hemaglutinina e a neuraminidase são proteínas imunogênicas, sendo a hemaglutinina o primeiro alvo da neutralização de anticorpos (ZOU; STANSFIELD; BRIDGE, 1998; FORLEO NETO et al., 2003; PONTORIERO et al., 2003).

1.3 Replicação viral

Os vírus só podem se replicar em células vivas. A replicação do vírus influenza na célula hospedeira é um processo que ocorre em várias etapas: em primeiro lugar o vírus precisa entrar

na célula em seguida produzir cópias de RNA e proteínas, “montar” os componentes das novas partículas virais e sair da célula hospedeira (SMITH e HELENIUS, 2004; BOUVIER; LOWEN; PALESE, 2008).

O ciclo replicativo do vírus Influenza inicia-se quando uma partícula viral entra em contato com a célula-alvo. A ligação entre o vírus e a célula é possível devido à afinidade que a hemaglutinina possui com uma mucoproteína presente na superfície das células epiteliais, geralmente, na mucosa nasal, garganta e pulmões dos mamíferos e nos intestinos das aves, que contém resíduos de ácido siálico (CONNOR et al., 1994; WAGNER et al., 2000; STEINHAEUER e SKEHEL , 2002; NICHOLLS et al., 2007).

A ligação da hemaglutinina aos receptores vai induzir a entrada do vírus na célula por endocitose mediada por receptores formando um endossoma. Os endossomas vão ser acidificados no citoplasma até pH = 5,0, provocando a clivagem dos monômeros da hemaglutinina levando à formação de dois polipeptídeos, o HA1 e o HA2, que se mantêm ligados por pontes dissulfeto. Com a clivagem, a hemaglutinina sofre uma mudança conformacional que expõe o peptídeo de fusão presente na extremidade N-terminal da subunidade HA2. (SKEHEL e WILEY, 2000; PALESE e SHAW, 2007; BOUVIER; LOWEN; PALESE, 2008).

A proximidade entre o peptídeo de fusão da hemaglutinina e do envelope lipídico com a membrana do endossoma provoca a fusão das duas membranas. A acidificação do endossoma ativa os canais iônicos, as proteínas M2, que transportam os íons H⁺ para a região interna do virion, desestabilizando a M1, facilitando a liberação das RNPs virais para dentro do citoplasma da célula (MARTIN-BENITO et al., 2001; PALESE e SHAW, 2007). As RNPs livres da M1 são muito grandes para passarem por difusão passiva para o núcleo. Portanto, a importação ocorre normalmente através dos poros nucleares, por um processo ativo envolvendo sinais de localização nuclear (nuclear localizaton signals (NLS), presentes nas proteínas da RNP e a maquinaria de importação nuclear da célula hospedeira (NIETO et al., 1994; WEBER et al., 1998; CROS e PALESE, 2003). No núcleo, o RNA viral de fita negativa é transcrito em RNAm através de um mecanismo conhecido como primer-dependente. A replicação ocorre em duas etapas: primeiro, é feita uma cópia positiva complementar, que a seguir será usada como molde para a síntese do RNA genômico viral de fita negativa. Todas essas reações são catalisadas pelo mesmo complexo de polimerases virais, embora as funções distintas de cada subunidade sejam

empregadas em diferentes passos (FODOR et al., 2002 ; NEUMANN; HUGHES; KAWAOKA, 2000).

As novas RNPs virais são exportadas do núcleo para o citoplasma com ajuda das proteínas M1 e NEP. Finalmente, as proteínas de membrana (HA, NA e M2), de matriz (M1) e as RNPs virais são transportadas para o local de montagem na membrana plasmática onde as partículas do vírus são construídas e liberadas para o exterior da célula (PORTELA e DIGARD, 2002; CHEN e KRUG, 2000; SUOMALAINEN, 2002). (figura 5).

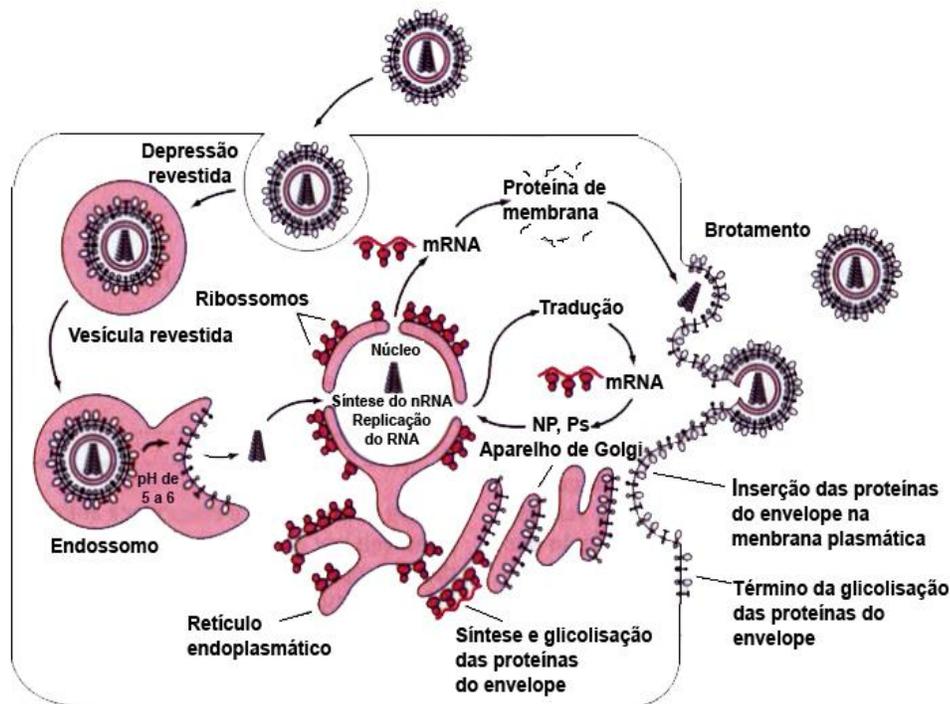


Figura 5 – Diagrama esquemático do ciclo replicativo do vírus influenza exibindo as etapas e proteínas envolvidas no processo.

Fonte: Jawetz et al., 2009

1.4 Epidemiologia

As gripes são mais frequentes nos meses de inverno, quando juntamente com a pneumonia bacteriana secundária são responsáveis por um número significativo hospitalizações e mortes, principalmente entre idosos maiores de 65 anos de idade, portadores de doenças crônicas de coração, pulmão, diabetes, imunocomprometidos e crianças menores de 5 anos (STOCKTON et

al., 1998; JAWETZ et al., 2009; HERRMANN; LARSSON; ZWEYGBERG, 2001; PONTORIERO et al., 2003).

A influenza ocorre de forma epidêmica e ocasionalmente pandêmica. Epidemias de influenza de gravidade variável têm ocorrido de maneira sistemática a cada 1 a 3 anos, predominantemente no inverno em países de clima temperado, tanto no Hemisfério Norte, com surtos ocorrendo entre os meses de novembro e março, como no Hemisfério Sul, com maior ocorrência nos meses de maio a setembro. 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; MARTINS, 2001; FORLEO NETO et al., 2003; JAWETZ et al., 2009). A importância do clima na sazonalidade do vírus foi sugerida por diferentes autores (ALONSO et al., 2007; LOWEN et al., 2006), pois o mesmo tem uma influência direta na sobrevivência do vírus. As temperaturas e umidade relativa do ar baixas, em torno de 5 °C e 20 a 35%, respectivamente, observadas durante os meses de inverno em países de clima temperado podem favorecer a permanência do vírus em suspensão no ambiente, facilitando o contágio direto, hospedeiro para hospedeiro, via aerossol. Em contrapartida, foi sugerido que a transmissão via aerossol pode ser bloqueada com a umidade relativa do ar em torno de 80% e temperaturas em torno de 30 °C (LOWEN et al., 2006). 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; HOFFMANN; PREISER, 2006; WRIGHT et al., 1995).

No Brasil, durante os anos de 1995 e 1998, a maior incidência de influenza ocorreu nas estações do outono e do inverno, com início das epidemias no mês de março. Entretanto, o vírus pode ser detectado durante todos os meses do ano, indicando circulação constante (PAIVA et al., 2000).

Alonso e colaboradores, em 2007, analisaram os padrões sazonais da gripe em todas as regiões do Brasil, demonstrando um efeito em cascata, em direção ao sul, com início da circulação viral 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. Assim diversos fatores, tanto sociais, como demográficos e ambientais, podem contribuir para os

padrões sazonais da gripe. As crianças, em idade escolar, são consideradas “peças-chaves” na transmissão da gripe entre familiares e escolares (ALONSO et al., 2007).

Informações concretas sobre sazonalidade são cruciais para o desenvolvimento de uma efetiva prevenção contra a influenza sazonal, assim como para medidas de controle eficazes durante uma pandemia (MOURA, 2010).

Os vírus da influenza A e B apresentam relevância clínica em humanos, sendo que o vírus influenza A, além de acometer homens, pode ser encontrado em aves aquáticas, consideradas hospedeiros naturais, em aves domésticas, em mamíferos aquáticos, porcos, cavalos e outras espécies de mamíferos. As infecções nas aves aquáticas são, comumente, inaparentes e podem ser causadas por um ou mais subtipos simultaneamente. Os vírus podem ser eliminados por longos períodos, facilitando a disseminação global dos vírus (OLIVEIRA Jr. et al., 2001). Por outro lado, os tipos B e C são restritos aos humanos, com raros relatos de isolamento do influenza B em focas e do C em porcos (WRIGHT et al., 1995; BOON et al., 2001; MARTINS, 2001; FORLEO NETO et al., 2003; ANDRADE et al., 2009; CDC, 2010a).

As glicoproteínas da superfície do vírus tipo A apresentam maior variabilidade antigênica quando comparadas as do tipo B e C (MARTINS, 2001). Os isolados do vírus influenza A são classificados de acordo com suas glicoproteínas externas (HA e NA). Até o presente foram descritos 16 tipos de hemaglutininas (H1, H2, H3...) e 9 tipos de neuraminidases (N1, N2, N3...) identificadas em vírus que acometem diferentes espécies animais (FOUCHIER et al., 2005, ZAMBON e POTTER, 2009). Todas as hemaglutininas e neuraminidases foram encontradas nos vírus influenza aviária (figura 6). A porcentagem de similaridade de aminoácidos entre as frações de HA1 das diferentes hemaglutininas gira em torno de 30% (LIU et al., 2003).

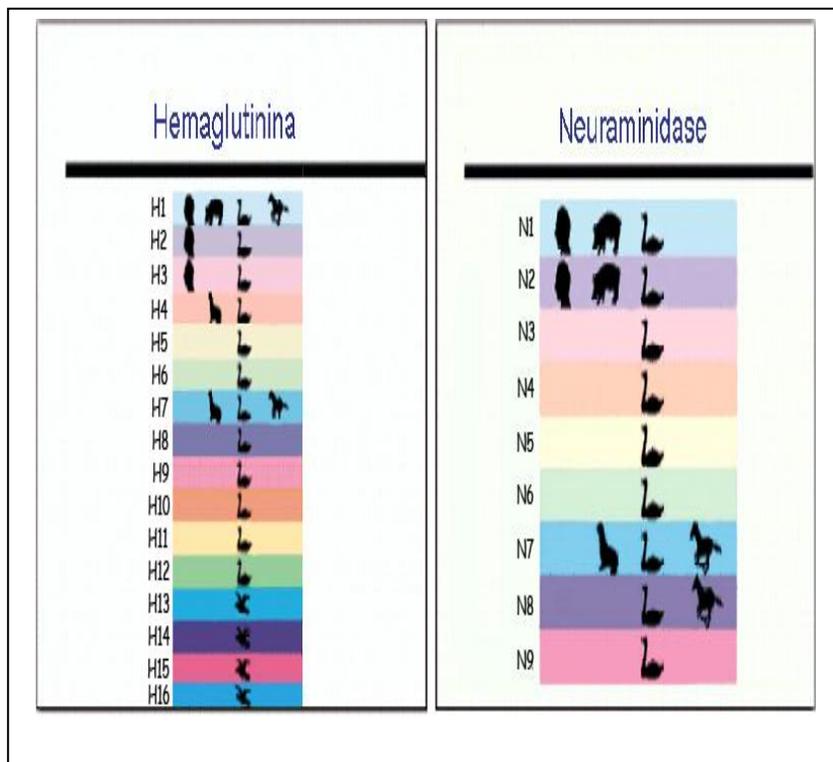


Figura 6 - Distribuição dos subtipos de hemaglutinina e neuraminidase do vírus Influenza A entre as diferentes espécies animais.
Fonte: Zambon e Potter, 2009.

Embora já tenham sido descritos casos humanos com H1, H2, H3, H5, H7 e H9, N1 e N2, atualmente duas hemaglutininas (H1 e H3) e duas neuraminidasas (N1 e N2) estão adaptadas para infectar seres humanos e continuam em circulação (PODDAR, 2002; FORLEO NETO et al., 2003; ZAMBON e POTTER, 2009). Os subtipos do vírus influenza A de maior prevalência em humanos circulantes atualmente são H1N1, H1N2 e H3N2 (CLAAS et al., 1992; DAUM et al., 2002; BOON et al., 2008). O subtipo H3N2 foi o predominante durante os últimos 20 anos (BOON et al., 2008), porém nos anos de 2009 e 2010 houve predominância do subtipo H1N1. Apenas um tipo de hemaglutinina e um tipo de neuraminidase são conhecidos no vírus influenza B (MOURA, 2010).

A hemaglutinina do vírus influenza B possui taxa de mutação menor. A linhagem B/Victoria/2/87, por exemplo, circulou durante a década de 80 enquanto a linhagem B/Yamagata/16/88 circulou durante a década de 90. A linhagem Victoria continua em circulação

na China e Ásia, mas não foi encontrada em outras partes do mundo durante o período de 1991 até 2001, quando voltou a circular no Canadá e Estados Unidos (ANSALDI et al., 2003).

Os vírus influenza estão sujeitos a dois tipos de variações antigênicas, as menores ou *antigenic drift* e as variações maiores, chamadas também de *antigenic shift*. As variações antigênicas menores ocorrem a cada dois ou três anos para os subtipos do vírus A e a cada 5 ou 6 anos para os vírus do tipo B. Tais variações se devem a mutações pontuais nos segmentos do genoma viral que resultam em mudanças nos aminoácidos que compõem, principalmente, as glicoproteínas de superfície, permitindo muitas vezes o escape de anticorpos neutralizantes (MARTINS, 2001; FORLEO NETO et al., 2003).

As variações antigênicas maiores (*shifts*) ocorridas apenas nos vírus influenza A são gerados por rearranjos de segmentos dos genomas de vírus que acometem diferentes espécies durante a coinfeção de uma célula hospedeira. Esses rearranjos podem gerar vírus novos, formados por proteínas diferentes do vírus original, sendo críticas quando ocorre alteração da hemaglutinina ou da neuraminidase ou ainda das duas glicoproteínas de superfície, originando vírus imunologicamente diferente dos circulantes (COUCEIRO, 2002; PONTORIERO et al., 2003). A maioria da população não tem imunidade para esses novos vírus e a doença dissemina-se rapidamente, afetando indivíduos de todas as faixas etárias, podendo resultar em pandemias (FORLEO NETO et al., 2003; PONTORIERO et al., 2003).

Uma pandemia, portanto, 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). A China e os demais países do Sudeste asiático são considerados verdadeiras usinas geradoras de novos vírus, uma vez que albergam grande número de aves aquáticas migratórias e imensas criações de aves de corte ao lado de fazendas com milhões de suínos suscetíveis aos vírus aviários (GRANATO e BELLEI, 2007). Porém, em praticamente todas as regiões do mundo, o vírus da influenza aviária tem sido isolado de aves silvestres, cuja migração pode possibilitar a disseminação da doença e, portanto, a ocorrência de epidemias e pandemias (OLIVEIRA Jr. et al., 2001).

Outro possível mecanismo para a ocorrência de uma nova linhagem pandêmica seria a transmissão direta de uma linhagem de vírus influenza aviária aos seres humanos. Em

1918-1919 aconteceu uma das maiores pandemias da história, a qual conhecemos por “Gripe Espanhola”, ocasionada pela transmissão direta do vírus H1N1 para humanos (TAUBENBERGER et al., 2005; ANDRADE et al., 2009). A pandemia teve grande impacto em todo mundo, com estimativa de 50% da população mundial infectada e cerca de 30 milhões de óbitos (BLACK e ARMSTRONG, 2006).

O subtipo H1N1 circulou até 1957 quando houve o surgimento do subtipo H2N2 causador da segunda grande pandemia do século passado, cujo vírus foi gerado pela incorporação dos genes codificadores da HA, NA e PB1 (polimerase) de vírus aviários nos vírus humanos circulantes. Em 1968 esse subtipo foi substituído pelo subtipo H3N2 (gripe Hong Kong), cujo vírus foi formado pela incorporação dos genes de vírus aviário (HA e PB1) em vírus humanos circulantes (COUCEIRO, 2002; PONTORIERO et al., 2003). Essas duas pandemias mataram juntas mais de 1,5 milhões de pessoas, além de gerar uma perda econômica de proporções mundiais, com a diminuição de produtividade e despesas com medicamentos e internações. Em 1977 houve o ressurgimento da linhagem H1N1 (gripe Russa) que acometeu principalmente crianças e jovens. Esses subtipos, H3N2 e H1N1, circulam juntos na população humana desde esta época (MURPHY e WEBSTER, 2001; IBIAPINA; COSTA; FARIA, 2005; ANDRADE et al., 2009).

Em 1997 e em 2003/2004, em Hong Kong, o influenza vírus aviário, H5N1, foi transmitido de aves migratórias para aves domésticas, particularmente os patos, pela contaminação da água com fezes de animais infectados. Dos patos foram transmitidos às galinhas e posteriormente ao homem, sendo altamente patogênico para ambos. Foi responsável por uma grave epidemia na Ásia, com elevada mortalidade e morbidade e com grandes perdas econômica, tanto pela morte de milhões de galinhas (diretamente pela doença ou sacrificadas) como pelas medidas de isolamento adotadas para controlar a disseminação da doença (MURPHY e WEBSTER, 2001; IBIAPINA; COSTA; FARIA, 2005; ANDRADE et al., 2009).

Embora todos os genes sejam de origem aviária, o H5N1, causador da epidemia de 2004, é antigenicamente diferente daquele isolado em Hong-Kong, nos anos de 1997 e 2003, o que sugere uma série de rearranjos entre vírus aviários que acometiam diferentes espécies, gerando um vírus pandêmico altamente patogênico para as aves domésticas e para algumas aves aquáticas migratórias, como por exemplo os gansos (CHEN et al., 2001; IBIAPINA; COSTA; FARIA,

2005). Dados da Organização Mundial de Saúde relatam a ocorrência de casos humanos nessas 2 ocasiões: em 1997 com 18 casos e 6 óbitos, e no último surto que teve início em 2003, com 1 caso na China e 3 no Vietnã, e que se estendeu até os dias de hoje, totalizando 507 casos e 302 óbitos, uma mortalidade de aproximadamente 60% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010c).

A última pandemia ocorrida teve início em abril de 2009, quando o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC/Atlanta/EUA) confirmou dois casos de influenza A em crianças residentes no sul da Califórnia, EUA, sem contato conhecido com suínos. Os vírus, porém, não foram subtipados pelas técnicas usualmente utilizadas. Simultaneamente, irrompeu no México um surto de doença respiratória aguda grave que se disseminou rapidamente. Esse surto foi ocasionado por um vírus idêntico ao isolado na Califórnia (DUARTE et al., 2009; MACHADO, 2009; SÃO PAULO, 2009a; YANG; CARNEY; STEVENS, 2010). Os vírus isolados apresentaram os genes: PB1, PB2, PA, HA, NS e NP similares ao vírus de Influenza suíno H1N1 norte americano (formado por um triplo rearranjo entre cepas de origem humana, aviária e suína) e a NA e M mais intimamente relacionados à linhagem suína na Eurásia (ZELL et al., 2009; CDC, 2010a) (Figura 7).

Em 11 de junho de 2009, a Organização Mundial de Saúde elevou o nível de alerta pandêmico mundial para a fase 6 (última fase), caracterizando uma pandemia, com evidência de transmissão comunitária disseminada do vírus influenza A/H1N1, novo subtipo viral em pelo menos dois continentes. Esta ação foi motivada pela rápida propagação do vírus e não pela gravidade da doença. (DUARTE et al., 2009; YANG; CARNEY; STEVENS, 2010).

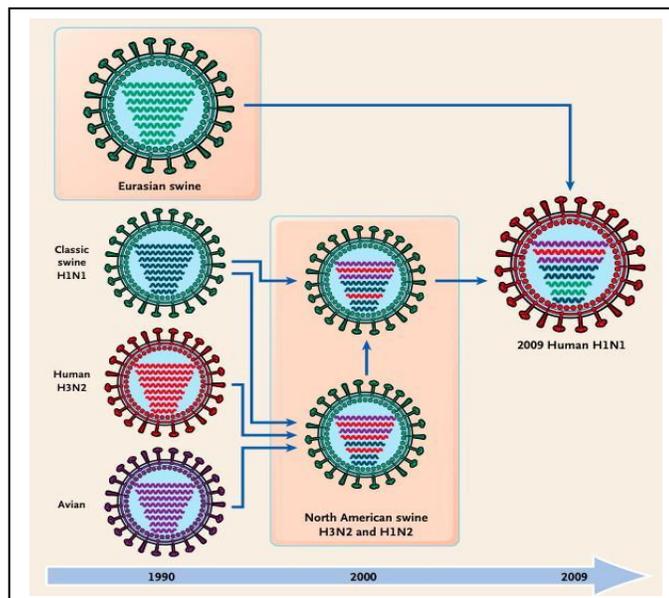


Figura 7 – Rearranjo do vírus influenza: Origem do vírus influenza A H1N1 pandêmico, em 2009.
Fonte: Racaniello, 2009.

No Brasil, desde a declaração de transmissão sustentada do vírus de Influenza A (H1N1) Pandêmico, ocorrida em 16 de julho de 2009, somente os casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), que são caracterizados por febre, tosse e dispnéia, foram considerados de notificação compulsória imediata. Em agosto de 2009, já figurava como um dos países com maior número absoluto de óbitos e protocolos governamentais e institucionais foram criados com a finalidade de atender a grande demanda de casos suspeitos e orientar a conduta médica (VERRASTRO et al., 2009). O último Informe Epidemiológico da Influenza Pandêmica, H1N1, da Secretaria da Vigilância do Ministério da Saúde do Brasil data de dezembro de 2009, sendo confirmados 30.055 casos de SRAG causados por vírus influenza, sendo que a proporção de influenza pandêmica foi de 93% (27.850/30.055) e de influenza sazonal foi de 7% (2.205/30.055) (SÃO PAULO, 2009b). No Estado de São Paulo, o último Informe Técnico de Influenza Pandêmica H1N1 do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da Secretaria da Saúde do Estado, de janeiro de 2011, relatou que entre 2009 e 2010 foram confirmados 12.091 casos de Influenza A H1N1 com 598 óbitos, com 99% dos casos concentrados no ano de 2009.

Embora vários surtos localizados em diferentes locais do mundo e de diferentes magnitudes, continuassem a ocorrer em 2010, a Organização Mundial de Saúde mudou, em 10 de agosto de 2010, o nível de alerta para período pós pandêmico (WHO, 2010d). No geral um total de 214 países relataram casos confirmados de Influenza A, H1N1 pandêmico, incluindo aproximadamente 18.500 mortes (WHO, 2010a). Dados recentes indicam que 38% de todos os

vírus detectados nas Américas, correspondem ao vírus influenza A(H1N1) pandêmico. Na Europa, durante o mês de março, cerca de 70% dos vírus detectados corresponde ao vírus influenza A (H1N1) pandêmico enquanto 28% correspondem a IB. Dados indicam que não há transmissão do vírus influenza A(H1N1) pandêmico no Norte da África e não há circulação do vírus influenza B na Tunísia e Argélia. Atualmente verifica-se a co-circulação do vírus Influenza A (H1N1 pandêmico), A (H3N2) e influenza B, sendo cerca de 76,7% dos casos de IA subtipados são influenza A(H1N1) pandêmico (figura 8). Os vírus influenza circulantes no decorrer do último ano foram caracterizados como sendo similares às cepas vacinais utilizadas. (WHO, 2011a)

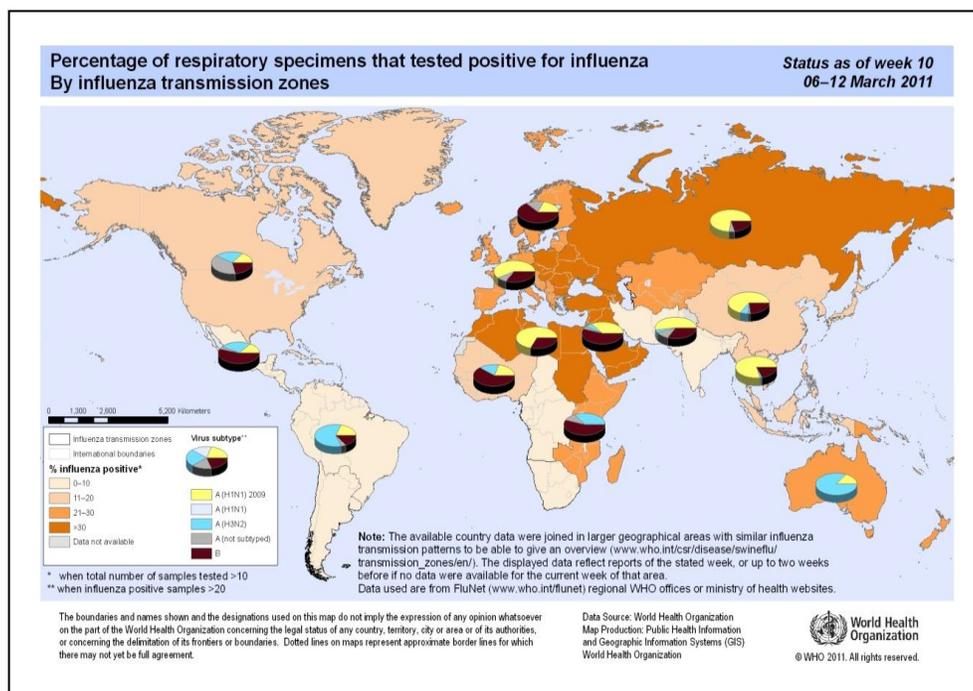


Figura 8 - Circulação mundial de influenza vírus. No. total de espécies positivas para influenza por subtipo. Dados da semana 06 de março de 2011 a 12 de março de 2011.

Fonte: WHO, 2011

1.5 Transmissão e Sintomatologia

Em pássaros aquáticos a replicação do vírus influenza ocorre no trato gastrointestinal, e esses animais geralmente não apresentam sintomatologia da doença. Por outro lado em humanos e suínos os vírus se replicam nas células epiteliais colunares do trato respiratório, misturam-se às secreções respiratórias e são espalhados por partículas de aerossol geradas durante o ato de espirrar ou tossir (GRANATO e BELLEI, 2007).

O período de incubação da influenza mostra-se bastante curto (1 a 4 dias) e um único indivíduo infectado pode transmitir a doença para grande número de pessoas susceptíveis (JAWETZ et al., 2009; FORLEO NETO et al., 2003).

Os vírus da influenza A e B causam sintomas que variam desde infecções suaves do trato respiratório inferior à pneumonia. O tipo A está mais frequentemente associado às doenças (BOON et al., 2001). A gravidade da doença, durante as epidemias e pandemias é bastante variável, causando desde quadros de rinofaringite leve até pneumonia viral com complicações fatais. A presença de febre acompanhada de manifestações respiratórias e sintomas sistêmicos, como dores musculares, calafrios ou fadiga, auxiliam muito na distinção da influenza de outras infecções respiratórias, como o resfriado comum (FORLEO NETO et al., 2003). Infecções associadas ao vírus influenza C são limitadas ao trato respiratório superior (JAWETZ et al., 2009).

Os sintomas da gripe causada pelo vírus influenza A H5N1, também apresentam manifestações inespecíficas, o que dificulta o diagnóstico. Pode ocorrer febre, rinorreia, mialgia, cefaleia, dor de garganta, tosse, diarreia, vômito e dor abdominal. A maioria dos casos, no entanto, apresenta pneumonia grave, que evolui rapidamente para a insuficiência respiratória (IBIAPINA; COSTA; FARIA, 2005; ANDRADE et al., 2009).

Os sinais e sintomas da infecção causada pelo vírus influenza suína clássico em humanos são frequentemente indistinguíveis daqueles da infecção com vírus influenza humano (MACHADO, 2009). As manifestações clínicas da infecção pelo vírus influenza A (H1N1), pandêmico, são semelhantes às da gripe comum, com febre, tosse, mialgia, fadiga, cefaleia, rinorreia, vômitos e diarreia (VERRASTRO et al., 2009). Entretanto, podem ocorrer manifestações mais graves, incluindo insuficiência respiratória e morte, principalmente nos pacientes pertencentes aos grupos

de risco descritos no Quadro 2. A OMS estima que no mundo cerca de 1,2 bilhões de pessoas enquadram-se no grupo de “alto risco”: 385 milhões de idosos acima de 65 anos de idade, 140 milhões de crianças e 700 milhões de crianças e adultos com problema de saúde subjacente crônica. Além disso, 24 milhões de trabalhadores de saúde podem propagar a doença para a população de alto risco (WHO, 2009a).

Quadro 2 - Organização dos grupos que devem ser considerados de risco de complicações em caso de infecção pelo vírus influenza.

Pessoas com risco de complicações em caso de infecção pelo vírus Influenza
Pessoas com mais de 50 anos de idade
Moradores de asilos
Adultos e crianças com doenças pulmonares ou cardiovasculares crônicas
Adultos e crianças com doenças metabólicas crônicas, disfunção renal, hemoglobinopatia ou imunossuprimidas (incluindo HIV)
Crianças (6 meses a 18 anos) que fazem tratamento com uso prolongado de aspirina
Grávidas (2º ou 3º trimestres da gravidez) durante o período de elevada incidência de gripe.
Pessoas que podem transmitir gripe para outros de alto risco
Profissionais da saúde
Funcionários de asilo
Empregados de residências de pessoas com doenças crônicas
Familiares em casas de pessoas com doenças crônicas
Outros grupos a serem considerados
Pessoas com doenças crônicas que viajam para locais nos quais há surtos de gripe
Pessoas que trabalham em locais que fornecem serviços comunitários essenciais
Estudantes ou outras instituições fechadas

1.6 Diagnóstico

Os quadros clínicos de infecções respiratórias virais podem ser provenientes de muitos vírus diferentes, portanto, o diagnóstico laboratorial de influenza é um importante instrumento de controle de propagação do vírus, além de permitir a utilização de terapia antiviral específica (ANSALDI et al., 2004).

O diagnóstico baseia-se no isolamento do vírus seguido da identificação dos antígenos virais, na detecção direta de antígenos ou do ácido nucléico viral nas células dos pacientes ou, ainda, na demonstração de uma resposta imunológica específica pelo paciente (CLAAS et al., 1992; ELLIS; FLEMING; ZAMBON, 1997; ZAMBON e POTTER, 2009; JAWETZ et al., 2009).

O isolamento do vírus em cultura de células ou em ovos embrionados, seguido de detecção dos antígenos virais utilizando anticorpos específicos, é uma metodologia bastante sensível e específica, porém, além de requerer laboratórios com infraestrutura e pessoal especializados é uma técnica muito demorada (cerca de 10 dias) (JAWETZ et al., 2009; MURPHY e WEBSTER, 2001; ZAMBON e POTTER, 2009).

Métodos alternativos de diagnóstico mais rápido são utilizados, como ensaios de inumofluorescência (IFA) e imunoenzimático (ELISA) (REINA et al., 1996), reação de hemaglutinação e de inibição de hemaglutinação e amplificação de ácidos nucleicos (HERRMANN; LARSSON; ZWEYGBERG, 2001). A PCR (reação em cadeia pela polimerase) vem sendo utilizada para detecção de numerosos patógenos, sendo uma técnica sensível e específica (detectando poucas cópias de DNA alvo). A utilização da RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa), seguida ou não de nested é descrita por vários autores para detecção e tipagem do vírus influenza e subtipagem do vírus influenza A (CLAAS et al., 1992; STOCKTON et al., 1998; HERRMANN; LARSSON; ZWEYGBERG, 2001; ANSALDI et al., 2004; ZAMBON e POTTER, 2009).

A multiplex PCR usa uma combinação de diferentes *primers* na mesma reação de amplificação, com o objetivo de produzir diferentes amplicons específicos, dependendo do “DNA molde” presente na amostra. Inicialmente essa metodologia foi utilizada no diagnóstico de desordens genéticas, como a distrofia muscular de Duchenne, que está associada com mutações em múltiplos loci. Entretanto, a multiplex PCR vem sendo utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas em geral, tanto na detecção de diferentes patógenos como para tipagem de maneira simples e rápida, utilizando apenas um tubo de reação (STOCKTON et al., 1998; BESSELAAR et al., 2004).

Vários autores descrevem a utilização da multiplex PCR para a detecção dos vírus influenza A, B, C e, posteriormente, para subtipagem do vírus influenza A utilizando *primers* específicos para os genes da HA ou da NA (PONTORIERO et al., 2003; WRIGHT et al., 1995).

A PCR em tempo real apresenta vantagens em relação à técnica tradicional por ser um método que apresenta rapidez, maior sensibilidade, reprodutividade e redução do risco de contaminação durante o procedimento (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

Para se obter o máximo de sensibilidade e especificidade diagnóstica utilizando as técnicas moleculares mencionadas anteriormente é necessário que exista um amplo conhecimento sobre as sequências de interesse. Segmentos do genoma altamente conservados são geralmente escolhidos como alvo para amplificação. Portanto, no caso do vírus Influenza, os dois principais alvos para a detecção do vírus por PCR são os genes codificadores da matriz (M) e da proteína não estrutural (NS1). No entanto, para a subtipagem os genes de escolha para a amplificação são os codificadores das proteínas de superfície, HA e NA, altamente variáveis. Portanto, para o sucesso desta técnica faz-se necessário uma atualização constante dos *primers* baseando-se em sequências dos genes de novas variantes obtidas em bancos de dados (ZAMBON e POTTER, 2009).

1.7 Tratamento e Prevenção

Devido aos graves problemas médicos e sociais em todo o mundo, grandes esforços são realizados para monitorar os vírus circulantes (LEE e CHEN, 2004). Para tanto a Organização Mundial da Saúde iniciou em 1947, a Rede de Vigilância Epidemiológica da Gripe, que inclui 110 laboratórios em 80 países. Os vírus colhidas em várias regiões do mundo são classificadas de acordo com o tipo antigênico (A, B e C) e com o subtipo de influenza vírus A (H1N1, H3N2 etc.).

No Brasil, desde 1995 essa vigilância é realizada por três laboratórios nacionais de Influenza – Instituto Adolfo Lutz (IAL), Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz) e Instituto Evandro Chagas (IEC). Desde o início das atividades até 2001 foram caracterizadas 9 diferentes variantes do vírus influenza A em circulação, sendo 4 do subtipo H1N1 e 5 de H3N2, ao passo que de 1995 a 1999 houve a circulação de uma única variante do vírus influenza B – B/Beijing/184/93. A partir do inverno de 2000 iniciou-se a co-circulação de B/Sichuan/379/99 (FORLEO NETO et al., 2003).

Com base nos dados colhidos no mundo, um comitê se reúne duas vezes ao ano e se encarrega de analisá-los e recomendar as cepas a serem incluídas na formulação da vacina da próxima temporada de gripe, nos hemisférios Norte e Sul. (PONTORIERO et al., 2003; FORLEO NETO et al., 2003; LEE e CHEN, 2004; GRANATO e BELLEI, 2007). Além disso, o conhecimento dos diferentes padrões sazonais da gripe e o impacto em localidades de clima equatorial, tropical e temperado podem ajudar na otimização da seleção da cepa viral vacinal (ALONSO et al., 2007).

Desde 1977, os vírus influenza A/H1N1, A/H3N2 e B estão em circulação mundial e estes três vírus, inativados, são incluídos atualmente como componentes vacinais. De um modo geral, as vacinas fornecem proteção quando os antígenos vacinais apresentam alto grau de similaridade nas proteínas HA e NA com os vírus circulantes (LEE e CHEN, 2004; CDC, 2010a). A vacina de vírus inativado pode ser administrada em pessoas com idade superior a 6 meses de vida, mesmo em pessoas grávidas ou que tenham algum problema de saúde crônico. Duas doses da vacina podem ser administradas, com intervalo de um mês entre cada aplicação, em crianças com idade entre 6 meses e 8 anos, desde que estejam sendo imunizadas pela primeira vez. Uma única dose da vacina é adequada para imunizar os indivíduos adultos saudáveis (WHO, 2009a; CDC, 2010a).

A vacina contra a gripe sazonal é usada principalmente no mundo desenvolvido para proteger idosos e imunodeprimidos. Desde dezembro de 2008, 35 dos 43 países e territórios americanos tiveram a vacinação sazonal introduzida. Na América do Sul, apenas o Equador e Venezuela usam a vacina formulada para o hemisfério Norte (CDC, 2010a).

A vacina contra o vírus influenza é considerada a primeira defesa para proteger as populações. Porém, são poucos os produtores da Vacina de Influenza, sendo que a maioria dos laboratórios está localizada no hemisfério Norte e sua capacidade produtiva, estimada em 350 milhões de doses da vacina trivalente inativada, não supre o mercado mundial. Para os próximos 2 a 3 anos um plano de expansão para produção extra da vacina pode elevar esse número para 780 milhões de doses. Ainda assim, em caso de uma pandemia, a capacidade está muito aquém da necessária para atender a população mundial, que está estimada em 6,3 bilhões de pessoas (WHO, 2009b; CDC, 2010a).

No Brasil, desde 2000, a recomendação da vacinação é direcionada aos idosos com idade

igual ou superior a 60 anos (CUNHA; CAMACHO; SANTOS, 2005; TONIOLO-NETO, 2001).

Atualmente, apenas o Brasil, entre os países tropicais localizados na América Latina tem a capacidade de produzir a vacina contra o vírus influenza. Com o apoio do Governo Federal e do Estado de São Paulo, o Instituto Butantan, ligado à Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, construiu um laboratório para a produção da vacina contra a gripe do tipo fragmentada e inativada, através de um convênio de transferência de tecnologia, assinado com uma empresa privada. Além disso, o Instituto qualificou o setor de formulação, controle de qualidade e envase.

A produção brasileira é importante, pois além de suprir as necessidades atuais do mercado nacional, há a possibilidade de com o aumento da produção, o Governo expandir a vacinação para outros grupos não inclusos na atual campanha. A independência dos produtores internacionais é outro ponto de grande interesse, pois com o surgimento de novas cepas, ocasionando possíveis pandemias, já estaríamos preparados para tal produção.

Desde o isolamento do vírus H5N1 e da cepa pandêmica, Influenza A, H1N1, foram desenvolvidas vacinas que possibilitem a prevenção da sua disseminação. A vacina contra a gripe H5N1 pode minimizar os efeitos de uma possível nova pandemia, retardando a progressão e diminuindo a mortalidade.

Devido à alta patogenicidade do vírus H5N1 em aves domésticas, a produção da vacina, que utiliza ovos embrionados de galinhas, é difícil pois o vírus pode ser letal para o embrião ou apresentar baixo rendimento, o que dificulta a confecção da vacina (ANDRADE et al., 2009). Para resolver esse problema foi utilizada a metodologia de genética reversa visando a obtenção de uma cepa vacinal com baixa patogenicidade e que atendesse a demanda. Para tanto, utilizou-se um sistema de 12 plasmídeos nos quais 6 plasmídeos continham genes: PA, PB1, PB2, NP, M e NS, obtidos de um vírus adaptado para o crescimento em ovo, o vírus A/PR8/34, denominado como PR8, 2 plasmídeos continham os genes codificadores das proteínas HA e NA e, para diminuir sua patogenicidade, foram utilizados 4 plasmídeos adicionais auxiliares que expressavam proteínas do vírus PR8 (PA, PB1, PB2 e NP). Com essa mesma finalidade o gene HA foi manipulado geneticamente visando eliminar o segmento polibásico de aminoácidos, presente no sítio de clivagem da hemaglutinina. Os plasmídeos foram transfectados em células VERO (linhagem aprovada para produção de vacinas humanas). O vírus formado foi secretado

no sobrenadante da cultura celular e amplificado por 2 passagens em ovos embrionados. A segunda passagem em ovos foi designada como sendo a “nova cepa vacinal” (WHO, 2003).

Durante o período de pandemia, cerca de nove vacinas contra a Influenza A H1N1 foram qualificadas pela OMS, sendo basicamente de 2 tipos: o primeiro tipo consistiu em uma vacina inativada, cujas indicações para a aplicação são as mesmas das utilizadas para vacinação contra a gripe sazonal. Nesse caso, a vacina contra a gripe é aprovada para imunização de indivíduos maiores de 6 meses de idade, incluindo pessoas saudáveis, pessoas com doenças crônicas e mulheres grávidas. A vacina é fabricada com ou sem o uso de adjuvantes. Já o segundo tipo consistiu em um *spray* nasal, também conhecido como LAIV (do inglês – *live attenuated influenza vaccine* - vacina de gripe viva e atenuada), indicada para pessoas saudáveis, de 2 a 49 anos de idade, que não estejam grávidas. Cerca de 2 semanas após a vacinação, os anticorpos que fornecem proteção contra a infecção pelo Influenza A H1N1 irão se desenvolver.

Durante a campanha de vacinação contra Influenza A H1N1, iniciada no Brasil em 08/03/2010, 89.619.881 pessoas foram vacinadas. Do total de pessoas vacinadas, 2,59% (n=2.324.911) eram mulheres grávidas; 30,89% (n=27.688.897) eram portadores de doença crônica e 5,80% (n=5.202.073) eram crianças de 2 à 4 anos (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DO PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES, 2010).

Atualmente, a circulação do subtipo H1N1 sazonal foi praticamente substituída pelo vírus de Influenza A H1N1 pandêmico. Portanto, as vacinas, que serão utilizadas, no Hemisfério Sul, a partir de fevereiro de 2011, deverão conter, obrigatoriamente, três tipos de vírus em combinação: um vírus similar ao vírus influenza A/California/7/2009 (H1N1), um vírus similar ao vírus influenza A/Perth/16/2009 (H3N2) e um vírus similar ao vírus influenza B/Brisbane/60/2008 (WHO, 2011a).

Além da vacinação, existem 2 classes de antivirais que proporcionam uma alternativa para o tratamento e/ou para a profilaxia das infecções causadas pelo vírus Influenza. A primeira classe consiste de drogas conhecidas como inibidores dos canais M2, amantadina (Symmetrel; Endo Pharmaceuticals, Chads Ford, PA) e rimantadina (Flumadine; Forest Pharmaceuticals, St Louis, MO), que só possuem efeito contra os vírus Influenza A. Sendo assim, esses antivirais clássicos apresentam certas limitações, como o rápido desenvolvimento de resistência viral, o espectro de

ação restrito e reações adversas no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal (CALFEE e HAYDEN, 1998; LAVER; BISCHOFBERGER; WEBSTER, 1999; OXFORD e LAMBKIN, 1998). Nos últimos anos, o vírus influenza vem demonstrando uma resistência aos inibidores dos canais M2, no mundo todo, com um aumento da taxa de resistência de 1,9% para 12,3% (CDC, 2006b). Durante a epidemia de gripe ocorrida em 2005-06, foi recomendado a não utilização dos inibidores de canais M2, devido aos altos níveis de resistência à droga (CDC, 2006b).

A segunda geração de antivirais são os inibidores de neuraminidase, oseltamivir (Tamiflu; Roche Laboratories, Nutley, NJ) e zanamivir (Relenza; GlaxoSmith-Kline, Research Triangle Park, NC), que possuem efeito sobre os *Influenzavirus A* e *B* (CALFEE e HAYDEN, 1998; LAVER; BISCHOFBERGER; WEBSTER, 1999; OXFORD e LAMBKIN, 1998).

Os inibidores da neuraminidase são mais eficazes quando é feito um rápido diagnóstico, idealmente nas primeiras 36 horas do início das manifestações da gripe (OXFORD e LAMBKIN, 1998; TREATOR et al., 2000). Entretanto, apesar de eficientes já há casos de pacientes resistentes ao tratamento por oseltamivir, devido mutações na neuraminidase, tanto para as cepas sazonais como para a cepa pandêmica (MONTO, 2006, ROBERTS, 2001; WHITLEY et al., 2001; TAMURA et al., 2009, NJOUOM et al., 2010).

O tratamento antiviral ainda é considerado uma técnica cara quando utilizada em larga escala, além disso, em crianças e mulheres grávidas ele apresenta restrições por manifestar efeitos colaterais (WHO, 2000; CDC, 2010a). Entretanto, em casos de epidemias provocadas por vírus emergentes, a manufatura e a distribuição das vacinas podem demorar de 6 a 8 meses, sendo mais eficaz, nesses casos, o uso dos antivirais para a contenção das epidemias (LONGINI et al., 2004).

Tendo em vista a importância do vírus influenza e devido aos graves problemas médicos e sociais causados e sua extensa e contínua variação genética e antigênica, 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, este trabalho foi desenvolvido visando verificar a diversidade genética do gene HA dos vírus de influenza circulante em crianças internadas no hospital Universitário da USP/São Paulo, durante os anos de 1995 até 2006.

2 Objetivos

Objetivo geral

Verificar a diversidade genética do gene da hemaglutinina dos vírus de Influenza A circulantes em crianças atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, de 1995 a 2006.

Objetivos específicos

- ✓ Detectar os *Influenzavirus A e B* em amostras de crianças por duplex RT-PCR e subtipar, utilizando uma multiplex RT-PCR, as amostras de *Influenzavirus A*;
- ✓ Amplificar e sequenciar o gene da hemaglutinina das amostras positivas para o *Influenzavirus A*;
- ✓ Comparar as sequências obtidas com as cepas vacinais correspondentes aos respectivos anos de estudo;
- ✓ Verificar o aparecimento de mutações na proteína que estejam relacionadas às regiões antigênicas ou de ligação com o receptor da célula hospedeira.

3 Materiais e Métodos

3.1 Casuística

3.1.1 Amostras de Coleção

As amostras utilizadas neste projeto fazem parte de um grande projeto que visa o estudo da diversidade genética de vírus respiratórios detectados em crianças menores de cinco anos de idade durante 10 anos consecutivos na cidade de São Paulo.

As amostras foram colhidas de crianças internadas na Enfermaria, Unidade de Terapia Intensiva (UTI) ou na Retaguarda do Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP), com sintomatologia respiratória, durante o período de 1995 a 2006, com idade entre 0 e 15 anos, durante os anos de 1995 e 1996 e menores de 5 anos de idade nos anos subsequentes. As amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Edison Luiz Durigon (Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo - ICB II - USP). A colheita dessas amostras foi realizada após consentimento dos responsáveis legais, que assinaram um Termo de Consentimento Pós-Informado (ANEXO A), solicitado pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os dados sobre o histórico do paciente foram colhidos junto aos prontuários médicos na Instituição.

3.2 Colheita das amostras

Os espécimes clínicos consistem de *swab* nasal e aspirado de nasofaringe. As amostras foram colhidas conforme Miyao et al. (1999) e encaminhadas, em gelo, para o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo (ICB II - USP). Foram separadas quatro alíquotas de cada amostra: uma contendo antibióticos (1000 U/mL de penicilina e 1000 µg/mL de estreptomicina) para cultivo, uma para imunofluorescência indireta, uma para armazenamento em freezer -70 °C, após adição de meio de congelamento e uma última alíquota contendo 75% de Trizol LS (*InvitrogenTM*) (250 µL da amostra e 750 µL de Trizol) para diagnóstico molecular. As amostras foram processadas segundo Vieira et al., 2001 e a alíquota estocada com 75% de Trizol e armazenada em freezer a -70 °C foi utilizada para a realização deste estudo.

3.3 Extração do RNA total

Todo o processo de extração foi realizado em banho de gelo, com reagentes gelados e centrífuga refrigerada. Após a homogeneização por agitação vigorosa por 15 segundos e incubação por 5 minutos em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas a 15.294 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa, ou sobrenadante, foi transferida para outro tubo, sendo o RNA precipitado pela adição de isopropanol (Merck) gelado, volume a volume, seguido de nova homogeneização, incubação em banho de gelo por 15 minutos e centrifugação a 15.294 x g por 15 minutos a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 800 µL de etanol a 75% (Merck) gelado, seguido de centrifugação a 8.225 x g por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram secos em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. O precipitado (*pellet*) foi ressuspensionado em 50 µL de água ultra PURE (*InvitrogenTM*).

Em todas as extrações um controle negativo, composto de 250 µL de água ultra PURE (*InvitrogenTM*) e 750 µL de Trizol e controles positivos que consistiram das amostras de Influenza A - A/Brazil/125/2001(H3N2) e A/Brazil/133/2001(H1N1) e de Influenza B - B/Brazil/017/2000, anteriormente isoladas e identificadas pelo Laboratório de Virologia Clínica Molecular - ICBII/USP foram submetidos a processo idêntico realizado paralelamente,.

3.4 Obtenção do cDNA

O cDNA foi obtido utilizando o kit *High Capacity Archive* (*Applied Biosystems*, Inc, EUA), seguindo as instruções 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 *RNAseOUTTM* (inibidor de RNAse), 10 µL de *Random primer* (10x), água ultra PURE (*InvitrogenTM*) para completar o volume de 50 µL de amostra. A extensão foi realizada em termobloco *ThermoStat plus* (*Eppendorf*) a 25 °C por 10 minutos, seguido a 37 °C por 2 horas.

Com a finalidade de otimizar as reações de amplificação do gene da HA, o cDNA também foi sintetizado com um *primer* específico, descrito por Hoffman et al. (2001), para os genes de

Influenzavirus A, Uni 12 – 5' AGCAAAAGCAGG – 3'. Portanto, para cada amostra obteve-se 75 µL de cDNA com o *Random primer*, para a realização da Duplex RT-PCR e multiplex RT-PCR e 25 µL de cDNA com o *primer* Uni 12. As reações foram realizadas, conforme descrito anteriormente, guardando as devidas proporções de cada um dos reagentes.

Os cDNAs dos controles, negativos e positivos, foram sintetizados concomitantemente em cada reação realizada.

3.5 Duplex RT-PCR para detecção e tipagem

Para realização da *duplex* RT-PCR foram utilizados *primers* complementares ao gene NS dos *Influenzavirus A* e B, seguindo a metodologia descrita por Claas et al. (1992), modificada por Vedovello (2006). A localização de cada *primer* no genoma viral, a polaridade, a sequência de nucleotídeos 5' - 3' e o tamanho do produto amplificado estão representados no quadro 3.

Quadro 3 - Relação dos *primers* utilizados na *duplex* RT-PCR, sua localização no genoma viral, polaridade, sequência de nucleotídeos e o tamanho do produto amplificado.

<i>Primer</i>	Polaridade	Sequência de nucleotídeos / 5' - 3'	Localização no genoma*	Produto amplificado
Fow A	<i>Sense</i>	AAG GGC TTT CAC CGA AGA GG	467 - 486	
Rev A	<i>Anti-sense</i>	CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC	656 - 637	190 pb
Fow B	<i>Sense</i>	ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC	746 - 755	
Rev B	<i>Anti-sense</i>	TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG	986 - 967	241 pb

* Cepas Influenza: A/Puerto Rico/8/34(H1N1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/956533>) e B/Lee/40- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/956543>) foram utilizadas como molde para localização dos *primers*

Para realização desta reação, foram adicionados 2,5 µL de *Standart Buffer* (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 2 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), 0,4 mM de dNTPs, 10 pmoles de cada *primer*, 1 U de *Taq DNA polymerase* (*Thermus thermophilus*) (*Biotools*), 2,5 µL de amostra (cDNA) e água ultra PURE (*Invitrogen*TM) para completar 25 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf Mastercycler Personal* ou no *GeneAmpPCR System 9700*, a 94 °C por 2 minutos para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos compostos de 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 1 minuto a 54 °C para hibridização dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final foi obtida a 72 °C por 10

minutos.

3.6 Multiplex RT-PCR para subtipagem das amostras positivas para *Influenzavirus*

A

Primers complementares aos genes que codificam as proteínas HA (H1, H3) e NA (N1 e N2) foram utilizados para a realização da subtipagem do *Influenzavirus* A pela *multiplex* RT-PCR, conforme descrito por Vedovello (2006). A localização de cada *primer* no genoma viral, a polaridade, a sequência de nucleotídeos 5'–3' e o tamanho do produto amplificado estão descritas no quadro 4.

Quadro 4 - Relação dos *primers* utilizados na *multiplex* RT-PCR (Vedovello, 2006), com modificações baseadas nas sequências mais recentes disponíveis no *GenBank*.

<i>Primer</i>	Subtipo	Polaridade	Sequência de nucleotídeos / 5' - 3'	Localização no genoma	Produto amplificado
HI1R		<i>Anti-sense</i>	CTA CAG AGA CAT AAG CAT TTT C	655 - 635	
H1F	H1	<i>Sense</i>	AAT TTG CTA TGG CTG ACG GG	490 - 509	165 pb
HI3R		<i>Anti-sense</i>	GCA TAG TCA CGT TCA ATG CTG	503 - 485	
HI3F	H3	<i>Sense</i>	GCA AAG CCT ACA GCA ACT GTT	272 - 292	231 pb
N1R		<i>Anti-sense</i>	TCT GTC CAT CCA TTA GGA TCC	1157 - 1137	
N1F	N1	<i>Sense</i>	ACC ATA ATG ACC GAT GGC CC	730 - 749	427 pb
NI2R1		<i>Anti-sense</i>	AGC ACA CAT AAC TGG AAA CAT TG	972 - 953	
NI2F	N2	<i>Sense</i>	GGA AAA TCG TTC ATA TTA GCA CA	796-818	176 pb

A *multiplex* RT-PCR foi feita utilizando 2,5 µL do cDNA diluído em tampão de reação (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 2 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), (*Biotools*), 0,4 mM de dNTPs, 5 pmoles dos *primers* H1F, HI1R, N1F e N1R e 10 pmoles dos *primers* HI3F, HI3R, NI2R1 e NI2F, 1 U de *Taq* DNA polymerase (*Biotools*) e água ultra PURE (*Invitrogen*TM), totalizando um volume de 25 µL.

A amplificação foi feita em termociclador *Eppendorf Mastercycler Personal*, a 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 58 °C

(com rampa de 1 °C por segundo) para hibridização dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final obtida a 72 °C por 10 minutos.

3.7 Amplificação do gene da hemaglutinina

3.7.1 Relação de primers

A estratégia de amplificação do gene da HA envolveu uma primeira amplificação, PCR, utilizando os *primers* H1 ou BmHA (*sense*) e H2 (*anti- sense*), 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-primer design* – <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>, utilizando como modelo as sequências dos respectivos genes publicados no *GenBank*: A/England/545/2007(H1N1) e A/Auckland/589/2000(H3N2) (No. de acesso geneBank GI:212381592 e GI:152963266, respectivamente), ou ainda *primers* gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Schutten da Erasmus Medical Center, Department of Virology, Rotterdam, Netherlands.

A descrição dos *primers*, sua polaridade, sequência 5' – 3', sua localização no genoma e o tamanho do produto amplificado estão descritos no quadro 5 e esquematizados nas figuras 9 e 10 para o subtipo H1 e H3 respectivamente.

A) Gene HA *Influenzavirus* H1 – Primeira PCR



B) Gene HA *Influenzavirus* H1 – Nested ou Semi-Nested PCR

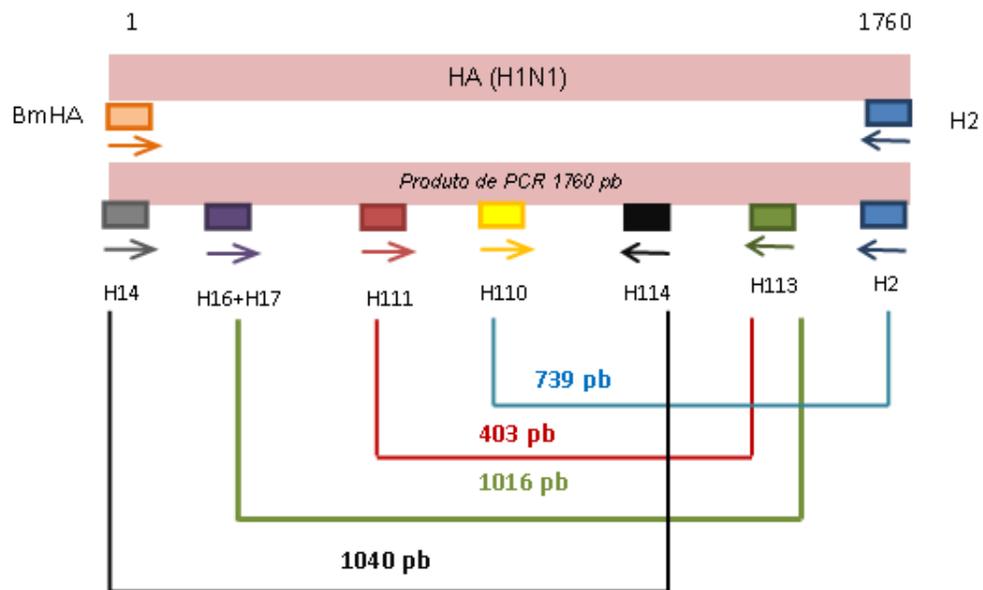
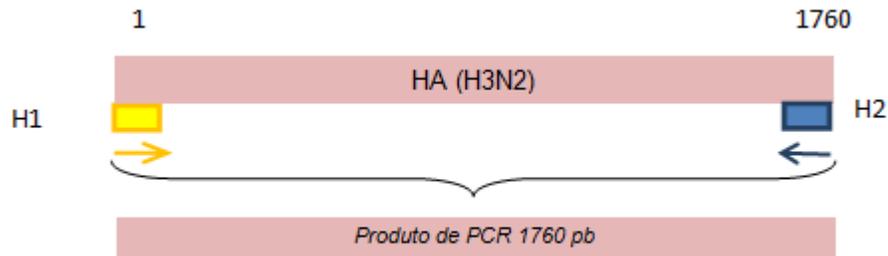


Figura 9 - Esquema do emparelhamento dos *primers* utilizados na PCR e *nested ou semi-nested* PCR para amplificação da hemaglutinina, subtipo H1. A fita alvo está representada em rosa e os quadrados coloridos indicam a localização dos *primers* e seu emparelhamento com a fita alvo. As setas coloridas indicam a polaridade dos *primers*. Os tamanhos esperados dos amplicons para cada uma das reações estão indicados na parte inferior do esquema. **A)** esquema da PCR. Na parte superior da fita alvo está representado o tamanho do gene (em nucleotídeos). Os quadrados laranja e azul representam os *primers* BmHa e H2 respectivamente. **B)** Esquema do emparelhamento dos *primers* utilizados na *nested ou semi-nested* PCR para amplificação da hemaglutinina subtipo H1 – a fita alvo, correspondente ao produto da PCR, está representada em rosa. Os *primers* H14/H114 representados por quadrados cinza e preto, os *primers* H110/H2 em amarelo e azul, *primers* 16+H17/H113 em roxo e verde e H111/H113 em vermelho e verde.

A) Gene HA *Influenzavirus* H3 – Primeira PCR



B) Gene HA *Influenzavirus* H3 – Nested ou Semi-Nested PCR

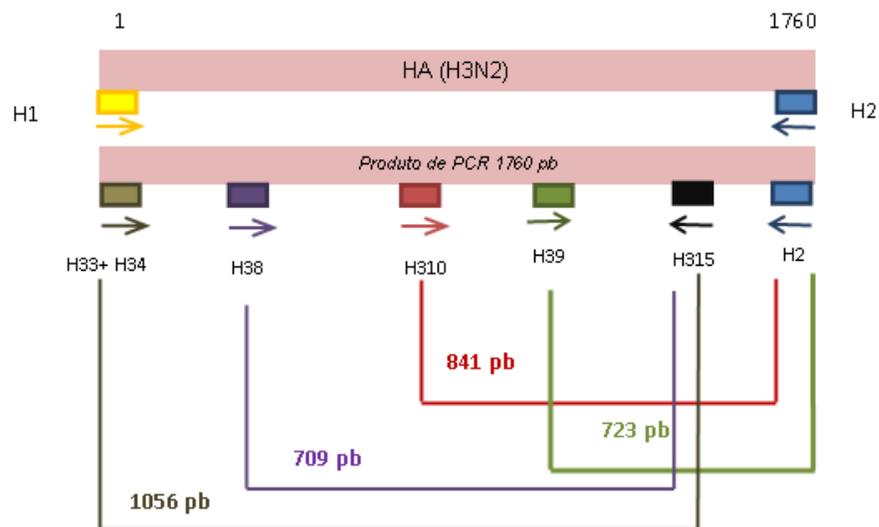


Figura 10 - Esquema do emparelhamento dos *primers* utilizados na PCR e *nested* ou *semi-nested* PCR para amplificação da hemaglutinina, subtipo H3. A fita alvo está representada em rosa e os quadrados coloridos indicam a localização dos *primers* e seu emparelhamento com a fita alvo. As setas coloridas indicam a polaridade dos *primers*. Os tamanhos esperados dos amplicons para cada uma das reações estão indicadas na parte inferior do esquema. **A)** esquema da PCR - na parte superior da fita alvo está representado o tamanho do gene (em nucleotídeos). Os quadrados amarelo e azul representam os *primers* H1 e H2, respectivamente. **B)** Esquema do emparelhamento dos *primers* utilizados na *nested* ou *semi-nested* PCR para amplificação da hemaglutinina subtipo H3 – a fita alvo, correspondente ao produto da PCR, está representada em rosa. Os *primers* H38/H315

representados por quadrados roxo e preto, os *primers* 39/H2 em verde e azul, *primers* 33+34/H315 em marrom e preto e H310/H2 em vermelho e azul.

Quadro 5 - Relação dos *primers* utilizados para a padronização da PCR e *Nested* ou *Semi-nested* PCR para o gene HA e amplificação das amostras clínicas, sua polaridade, sequência de nucleotídeos (5'– 3'), localização no genoma viral e o tamanho dos produtos amplificados.

<i>Primer</i>	Subtipo	Polaridade	Sequência de nucleotídeos / 5' - 3'	Localização no genoma	Produto amplificado
Utilização – PCR					
BmHA	H1/H3	<i>Sense</i>	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG G	1-16	
H1	H1/H3	<i>Sense</i>	AGC AAA AGC AGG GGA T	1-16	1760 pb
H2	H1/H3	<i>Anti-sense</i>	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT	1760-1743	
Utilização - Nested PCR/SemiNested PCR					
H14	H1	<i>Sense</i>	AGC AAA AGC AGG GGA AAA T	1-19	1040 pb
H114		<i>Anti-sense</i>	CTT AGT CCT GTA ACC ATC CT	1040-1021	
H16 +		<i>Sense</i>	CAT ACG CAG ACA CAA TAT GT	75-95	
H17	H1	<i>Sense</i>	CAT AYG CAG ACA CAA TAT GT	75-95	1016 pb
H113		<i>Anti-sense</i>	AAA CCG GCA ATG GCT CCA AA	1091-1072	
H111	H1	<i>Sense</i>	CAC CCC AGA AAT AGC CAA AA	688-708	403 pb
H113		<i>Anti-sense</i>	AAA CCG GCA ATG GCT CCA AA	1091-1072	
H110	H1	<i>Sense</i>	AGG ATG GTT ACA GGA CTA AG	1040-1021	739 pb
H2		<i>Anti-sense</i>	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT	1760-1743	
H310	H3	<i>Sense</i>	GCA TCA CTC CAA ATG GAA GC	919-938	841pb
H2		<i>Anti-sense</i>	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT	1760-1743	
H39	H3	<i>Sense</i>	GCG GAA TGT ACC AGA GAA AC	1037-1056	723 pb
H2		<i>Anti-sense</i>	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT	1760-1743	
H38	H3	<i>Sense</i>	CAG CAA AGC YTA CAG CAA CTG T	347-366	709 pb
H315		<i>Anti-sense</i>	GTT TCT CTG GTA CAT TTC GC	1056-1037	
H33 +		<i>Sense</i>	AGC AAA AGC AGG GGA TAA T		
H34	H3	<i>Sense</i>	AGC AAA AGC AGG GGA TAW T	1-19	1056 pb
H315		<i>Anti-sense</i>	GTT TCT CTG GTA CAT TTC GC	1056-1037	

3.7.2 Padronização da amplificação do gene – PCR/nested ou semi nested PCR

As padronizações foram realizadas utilizando os controles positivos de influenza descritos no item 3.3, A/Brazil/125/2001(H3N2) e A/Brazil/133/2001(H1N1).

Para a padronização da PCR para amplificação do gene da hemaglutinina, subtipos H1 e H3, foram realizados testes variando, as concentrações de *primers* (para os subtipos H1 e H3, descritos no quadro C), MgCl₂, dNTP e amostra conforme esquematizado no quadro 6 compreendendo um total de 24 diferentes reações. Os testes foram feitos utilizando tampão de reação (10x) (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄) e 1,25 U de *Taq* DNA Polymerase (*Biotoools*) para um volume final de 50 µL. Após os testes com diferentes concentrações de *primers*, dNTP, amostra e MgCl₂, a PCR para amplificação da hemaglutinina 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), 0,20 mM de dNTP, 2,5 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 reação foi padronizada de igual maneira para subtipo H1 e H3.

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, cada um dos produtos das PCRs obtidos conforme reações esquematizadas no quadro 6, foram submetidos a *nested PCR* ou *semi-nested-PCR* para amplificação dos genes da hemaglutinina, subtipos H1 e H3, utilizando os *primers* específicos descritos no quadro 5 e seguindo os esquemas descritos nas figuras 9 e 10, respectivamente. Resumindo, os *primers* utilizados para a *nested* ou *semi-nested* PCR, para amplificação do gene HA, subtipo H1, foram: H14 e HA114 (produto de 1040 pb), *primers* H110 e H2 (produto de 739 pb), *primers* H111 e H113 (produto de 403 pb), H16+H17 e H113 (produto de 1016 pb) (quadro 5 – figura 9B). Os *primers* utilizados para a realização da *Semi-Nested* PCR, para amplificação do gene HA, subtipo H3, foram: H33+H34 e H315 (produto de 1056 pb), *primers* H310 e H2 (produto de 841 pb), *primers*, H38 e H315 (produto de 709 pb) e *primers* H39 e H2 (produto de 723 pb) (quadro 5 – figura 10B).

Para a padronização *nested* ou *semi-nested* PCR foram realizados um total de 27 testes para cada par de *primers*, nos quais foram variadas as concentração de *primers* (10, 20 e 30 pmol), MgCl₂ (2, 2,5 e 3 mM) e a concentração de amostra em 1 µL, 2,5 µL e 5 µL conforme quadro 7.

Após os testes, a reação de amplificação, para ambos os subtipos, consistiu de 1,0 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 (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 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.

3.7.3 Alternativa para amplificação do gene da Hemaglutinina

Como alternativa para amplificação do gene da hemaglutinina, foram utilizados os *primers*: HAFwd e HA2, HA3 e HA4, HA5 e HA6 e HA7 e HAreV, gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Schutten da Erasmus Medical Center, *Department of Virology, Rotterdam, Netherlands*, que amplificavam fragmentos de aproximadamente 500 pb cada, compreendendo o gene inteiro. Portanto, cada amostra foi submetida a 4 PCRs distintas para amplificação do gene inteiro da hemaglutinina. A reação foi composta de uma mistura com volume de 40 µL, que continha 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 (*InvitrogenTM*). A essa mistura foram adicionados 2 µL de mix-*primer* [20 pmol de cada] e 8 µL de cDNA diluído em água ultra PURE (*InvitrogenTM*), na proporção 1:4, 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 inicial a 95 °C por 15 min, seguida de 35 ciclos de 15 segundos a 94 °C para desnaturação das fitas, 30 segundos a 55 °C para a hibridização dos *primers* e 45 segundos a 72 °C para extensão, seguidos de uma etapa final a 72 °C por 7 min para completar a extensão.

3.7.4 Análise dos produtos amplificados

A detecção dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose (*Invitrogen™*) a 2% (*Duplex* PCR e *Multiplex* PCR) ou 1,0% (amplificação do gene da hemaglutinina) 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*) e 1 Kb (DNA *Mass Ladder* - *Biotoools*) (para o gene da HA) 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-It™* (*Imaging System*).

3.8 Purificação dos produtos amplificados

Após a amplificação, as amostras foram purificadas pela técnica de precipitação com acetato de potássio e etanol conforme descrito a seguir: ao produto de *nested* ou *SemiNested* PCR foi adicionado 10% de acetato de potássio 3 M e 2 vezes o volume de etanol absoluto gelado. Após incubação a - 20 °C por no mínimo uma hora as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 15.294 x g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo seco em temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 250 µL de etanol 70% gelado e a seguir foram centrifugados a 15.294 x g a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos permaneceram virados sob um papel toalha até secar bem. Em seguida as amostras foram ressuspendidas em 20 µL de água ultra PURE (*Invitrogen™*).

As amostras nas quais foram verificados mais de um fragmento após a amplificação foram purificadas à partir do gel de agarose, utilizando o kit *Wizard®* SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega*) seguindo instruções do fabricante.

3.9 Quantificação do DNA

Após a purificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, conforme descrito anteriormente e quantificadas com o auxílio de marcador de peso molecular (DNA *Mass Ladder* - Biotools).

3.10 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 Biosystems, Inc., EUA*), seguindo as instruções do fabricante. A relação dos *primers* utilizados para o sequenciamento do gene, com sua localização no genoma viral, polaridade e sequência de nucleotídeos 5' - 3' estão representados no quadro 8.

Quadro 8 - Relação dos *primers*, subtipo HA, polaridade, sequência de nucleotídeos 5' - 3' e região dos *primers* utilizados no sequenciamento do gene da HA.

Primer	Subtipo	Polaridade	Sequência de nucleotídeos / 5' - 3'	Região
H33	H3	<i>Sense</i>	AGC AAA AGC AGG GGA TAA T	1-19
H38	H3	<i>Sense</i>	CAG CAA AGC YTA CAG CAA CTG T	347-366
H310	H3	<i>Sense</i>	GCA TCA CTC CAA ATG GAA GC	919-938
H110	H1	<i>Sense</i>	AGG ATG GTT ACA GGA CTA AG	1021-1040
H14	H1	<i>Sense</i>	AGC AAA AGC AGG GGA AAA T	1-19
H111	H1	<i>Sense</i>	CAC CCC AGA AAT AGC CAA AA	688-708
H16	H1	<i>Sense</i>	CAT ACG CAG ACA CAA TAT GT	75-95
H312	H3	<i>Anti-sense</i>	GCT TCC ATT TGG AGT GAT GC	938-919
H315	H3	<i>Anti-sense</i>	GTT TCT CTG GTA CAT TTC GC	1056-1037
H311	H3	<i>Anti-sense</i>	GTT TCT CTG GTA CAT TCC GC	1056-1037
H2	H1 e H3	<i>Anti-sense</i>	AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT	1760-1743
H114	H1	<i>Anti-sense</i>	CTT AGT CCT GTA ACC ATC CT	1040-1021
H113	H1	<i>Anti-sense</i>	AAA CCG GCA ATG GCT CCA AA	1091-1072
H17	H1	<i>Sense</i>	CAT AYG CAG ACA CAA TAT GT	75-95

A reação de sequenciamento foi feita utilizando, em média, 10 a 30 ng de amostra purificada diluída em 2 µL de tampão de reação *Save Money* (Biotools), 2 µL de *Big Dye* (Applied Biosystem, Inc, EUA), 2,5 pmol de cada *primer* separadamente (*sense* e *anti-sense*) e água ultra PURE (InvitrogenTM), totalizando um volume de 10 µL.

A extensão enzimática foi realizada em termociclador *GeneAmpPCR System 9700*, a 95 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos compostos de 15 segundos a 96 °C para desnaturação, 20 segundos a 52 °C para hibridização dos *primers* e 4 minutos a 60 °C para extensão das cadeias. Terminada a reação, as amostras foram protegidas da luz e armazenadas a -20 °C.

Os produtos da reação de sequenciamento foram submetidos à reação de purificação, para concentração do DNA, retirada das impurezas e excesso de dideoxinucleotídeos terminadores não incorporados. A purificação foi realizada pela técnica de precipitação com isopropanol conforme descrito a seguir: foram adicionados 30 µL de água ultra PURE (InvitrogenTM) e 60 µL de isopropanol (Merck[®]) em cada amostra e em seguida foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 15.294 x g durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e aos sedimentos foram adicionados 150 µL de isopropanol a 75%. Novamente foram centrifugadas a 15.294 x g 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados no mesmo termociclador a 80 °C por 2 minutos para secar. Em seguida os tubos foram armazenados a - 20 °C até serem submetidas à eletroforese em polímero POP6 utilizando-se sequenciador automático *ABI PRISM[®] 3100* (Applied Biosystems).

3.11 Processamento e alinhamento das sequências

A edição das sequências e montagem dos *contigs* foram realizadas com auxílio do programa *Seq Man 4.05 - Expert Analysis Software - DNASTAR, Inc., EUA*. As sequências do gene da HA obtidas foram alinhadas com outras sequências de várias regiões do mundo, depositadas no *GenBank*, e com as sequências dos vírus recomendados para a composição das vacinas utilizadas no Brasil no período em estudo (www.ncbi.nlm.nih.gov – quadro 9), em 2 *data sets* diferentes, correspondendo aos subtipos H1 e H3, utilizando o programa *Se-Al - Sequence Alignment Editor* (RAMBAUT e CHARLESTON, 2001) ou *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Os alinhamentos correspondentes foram convertidos no formato *Nexus* para as análises subsequentes.

Quadro 9 - Relação das variantes de *Influenzavirus A*, H3N2 e H1N1, recomendados pela OMS para composição das vacinas utilizadas no Hemisfério Sul, durante o período de 1999 a 2006.

Ano	Cepa vacinal <i>Influenzavirus A H3N2</i>	Cepa vacinal <i>Influenzavirus A H1N1</i>
1999	A/Sydney/5/97	A/Beijing/262/95
2000	A/Moscow/10/99	A/New Caledonia/20/99
2001	A/Moscow/10/99	A/New Caledonia/20/99
2002	A/Moscow/10/99	A/New Caledonia/20/99
2003	A/Moscow/10/99	A/New Caledonia/20/99
2004	A/Fujian/411/2002	A/New Caledonia/20/99
2005	A/Wellington/1/2004	A/New Caledonia/20/99
2006	A/California/7/2004	A/New Caledonia/20/99

3.12 Reconstruções filogenéticas

Inicialmente realizou-se o teste de razão de verossimilhança para a escolha do modelo evolutivo a ser utilizado, com auxílio do programa Modeltest versão 3.06 (POSADA e CRANDALL, 1998). Uma vez escolhido o modelo, os dados foram analisados pelo método de Máxima Verossimilhança, utilizando o algoritmo de Neighbor Joining, utilizando o programa PAUP*4.0 versão Beta - Sinauer Associates, Inc, (SWOFFORD, 1998).

Foram calculados os valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas, para a verificação da sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas (FELSENSTEIN, 1985).

4 Resultados

Um total de 3.009 amostras provenientes de crianças atendidas no HU/USP foram submetidas à triagem pela *duplex* RT-PCR para detecção dos vírus Influenza A e B, seguido de subtipagem dos IA pela multiplex PCR e amplificação e sequenciamento do gene HA.

4.1 Duplex RT-PCR para detecção e tipagem dos vírus Influenza A e B

A *duplex* RT-PCR, utilizando os *primers* complementares ao gene NS1 - *Fow* A e B e *Rev* A e B, gerou um produto de 190 pb para IA e de 241 pb para IB (tabela 1, figura 11).

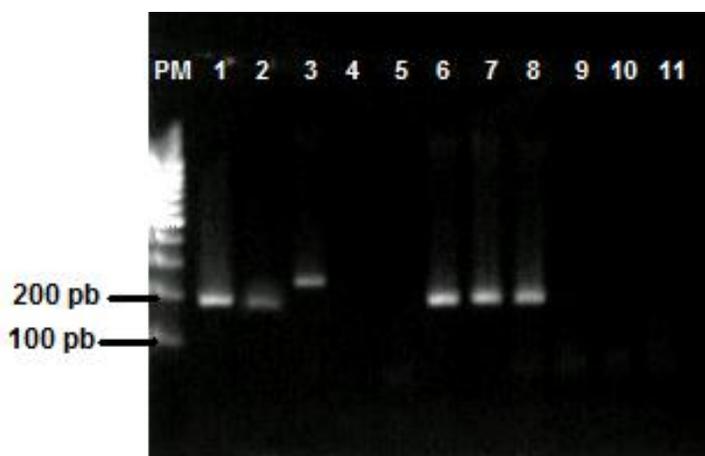


Figura 11- Eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da *duplex* RT-PCR utilizando os *primers* *Fow* A – *Rev* A e *Fow* B – *Rev* B, para verificação da amplificação de um fragmento de 190 pb (a) ou de 241 pb (b) do gene NS1 dos *Influenzavirus* A e B, respectivamente. **PM:** peso molecular de 100 pb (*Biotoools*). **Canaleta 1:** controle positivo IA subtipo H1(a), **Canaleta 2:** Controle positivo IA subtipo H3 (a), **Canaleta 3:** controle positivo de IB (b). **Canaletas 4:** controle negativo, **Canaletas 5 a 10:** amostras clínicas (ano/nºamostra) 01/88; 01/65a; 01/97a; 01/98a; 01/92a; 01/93, **Canaleta 11:** controle negativo.

Das 3.009 amostras submetidas à *duplex* RT-PCR 4,38% (n=132) foram positivas pela *duplex* RT-PCR, com distribuição entre os anos variando entre 1,16% em 1995 até 7,8% em 2001. Do total de amostras positivas, 87,9% (n=116), foram positivas para *Influenzavirus* A e 12,1% (n=16), foram positivas para *Influenzavirus* B. Verificou-se que o vírus de Influenza A foi detectado em todos os anos estudados e o vírus de Influenza B foi detectado somente nos anos 2002, 2004 e 2006 (tabela 1).

Tabela 1 - Relação do número total de amostras colhidas de pacientes atendidos no Hospital Universitário da USP, do número de amostras de Influenza positivas e do número de amostras de *Influenzavirus A* e B por ano (de 1995 a 2006).

Ano	Número de amostras colhidas	Número de amostras positivas (%)	Número de amostras <i>Influenzavirus A</i> (%)	Número de amostras <i>Influenzavirus B</i> (%)
1995	172	2 (1,1)	2 (1,16)	-
1996	229	5 (2,2)	5 (2,18)	-
1997	65	3 (4,6)	3 (4,61)	-
1998	98	9 (9,2)	9 (3,04)	-
1999	164	5 (3,0)	5 (4,31)	-
2000	202	4 (2,0)	4 (1,98)	-
2001	127	10 (7,9)	10 (7,87)	-
2002	172	5 (2,9)	2 (1,16)	3 (1,7)
2003	303	14 (4,6)	14 (4,62)	-
2004	451	28 (6,2)	19 (4,21)	9 (2,0)
2005	525	18 (3,4)	18 (3,42)	-
2006	501	29 (5,8)	25 (4,6)	4 (0,8)
Total	3.009	132 (4,4)	116 (87,87)	16 (12,3)

Embora o número de amostras analisadas seja variável durante os anos e o número de amostras positivas pequeno em alguns anos, foi possível verificar que, em geral, a circulação do vírus influenza foi maior nos meses de maio a julho (figura 12), com exceção dos anos 2001 e 2004, em que o vírus circulou predominantemente em outubro e março, respectivamente.

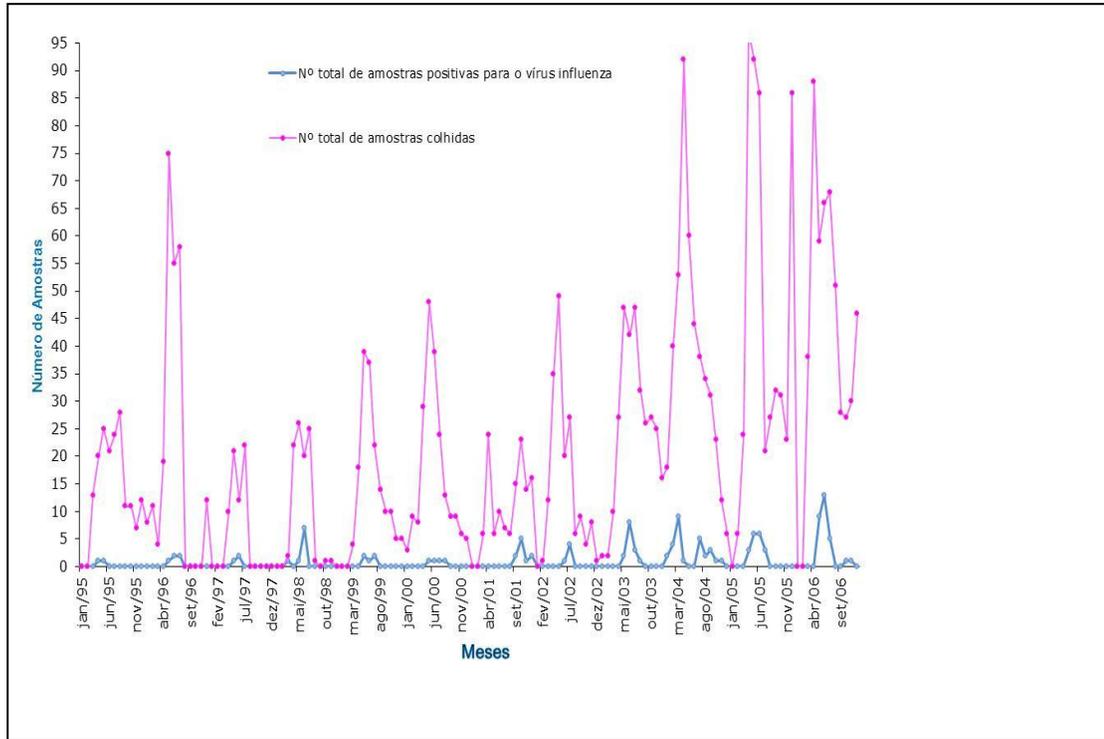


Figura 12 - Distribuição do vírus Influenza por mês durante o período de 1995 a 2006.

A maior incidência do *Influenzavirus* ocorreu em crianças com idade ≤ 2 anos ($120/127 = 94,48\%$), com pico nos 6 primeiros meses de vida ($68/127 = 53,54\%$) (figura 13).

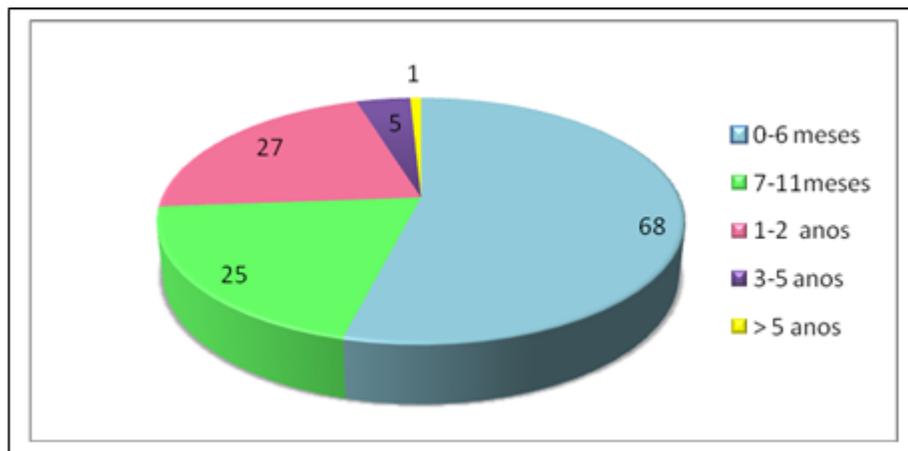


Figura 13 - Quantidade de casos positivos causados pelo vírus influenza em diferentes faixas etárias.

4.2 Multiplex RT-PCR

Após a detecção dos *Influenzavirus A* e B, as amostras positivas para *Influenzavirus A* foram subtipadas por meio da *multiplex* RT-PCR, utilizando *primers* complementares aos genes que codificam as proteínas HA (H1, H3) e NA (N1 e N2), descritos no quadro 4 (figura 14).

Das 116 amostras positivas para o *Influenzavirus A*, 86,2% (n=100) foram subtipadas, sendo 9% (n=9) eram H1N1 e 91% (n=91) eram H3N2. Um total de 16 amostras (13,8%) não foram subtipadas por essa *multiplex* (tabela 2). As amostras não subtipadas foram submetidas à outra *multiplex* padronizada em nosso laboratório (ANEXO B), confirmando a negatividade.

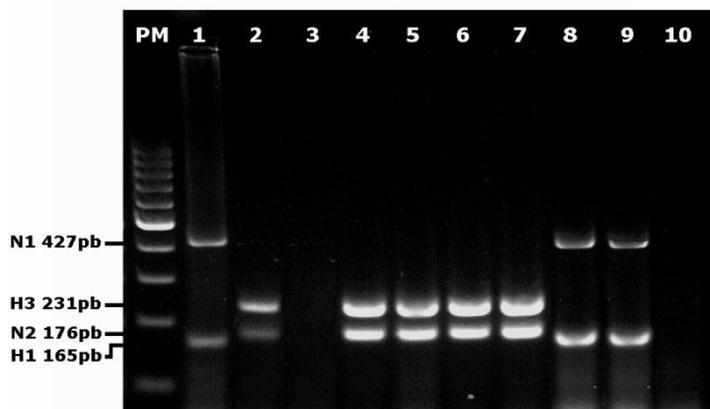


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da *multiplex* RT-PCR, utilizando os *primers* HI1R – H1F e HI3R – HI3F para verificação da amplificação de um fragmento de 165 pb ou 231 pb do gene da hemaglutinina (HA) de IA subtipo 1 (H1) ou do subtipo 3 (H3), respectivamente, e de 427 pb ou 176 pb do gene da neuraminidase (NA) do subtipo 1 (N1) ou do subtipo 2 (N2), utilizando os *primers* N1R – N1F e NI2R1 – NI2F respectivamente. **PM**: marcador molecular de 100 pb (*BioTools*). **Canaleta 1**: controle positivo IA subtipo H1N1; **Canaleta 2**: controle positivo IA subtipo H3N2. **Canaletas 3 e 10**: controles negativos. **Canaletas 4 a 9**: amostras clínicas (nºamostra/ano) 218_2003; 236_2003; 260_2003; 270_2005; 165_2000; 63_2001.

Tabela 2 - Subtipagem das amostras positivas para Influenza A e circulação dos subtipos H3N2 e H1N1 no período de 1995 a 2006.

Ano	Total de amostras IA	Influenza A H3N2	Influenza A H1N1	Total de amostras não Subtipadas
1995	2	2	0	0
1996	5	3	0	2
1997	3	3	0	0
1998	9	9	0	0
1999	5	5	0	0
2000	4	3	1	0
2001	10	7	2	1
2002	2	2	0	0
2003	14	13	1	0
2004	19	16	0	3
2005	18	12	0	6
2006	25	16	5	4
Total	116	91	9	16

4.3 Amplificação do gene da hemaglutinina para sequenciamento

A padronização da amplificação do gene da hemaglutinina, subtipo H1, foi realizada conforme descrito no item 3.7.2, utilizando os *primers* descritos no quadro 5 e seguindo os esquemas descritos na figura 9. Assim, após a primeira PCR que amplificava o gene inteiro (1760 pb), o produto da PCR foi submetido a reações de *nested* ou *semi nested* PCR e os produtos gerados, utilizando os *primers*: H14/H114, H16+H17/H113, H110/H2, e H111/H113 foram de 1040 pb, 1016 pb, 739 pb e 403 pb, respectivamente, compreendendo, portanto, o gene completo da hemaglutinina (esquema 9B). A figura 15 representa a amplificação pelas *nested* ou *seminested* PCR realizada com o controle positivo H1N1 (A/Brasil/133/2001).

A padronização da amplificação do gene da hemaglutinina, subtipo H3, foi realizada conforme descrito no item 3.7.2 utilizando os *primers* descritos no quadro 5 e seguindo os esquemas descritos na figura 10. Assim, após a primeira PCR que amplificava o gene inteiro (1760 pb) o produto da PCR foi submetido a reações de *Nested* ou *Semi Nested* PCR e os produtos gerados, utilizando os *primers*: H33+H34/H315, H38/H315, H39/H2 e H310/H2, foram

de 1056 pb, 709 pb, 723 pb e 841 pb, respectivamente, compreendendo, portanto, o gene completo da hemaglutinina (esquema 10B). A figura 15 representa a amplificação pelas *nested* ou *seminested* PCR realizada com o controle positivo H3N2 (A/Brasil/125/2001).

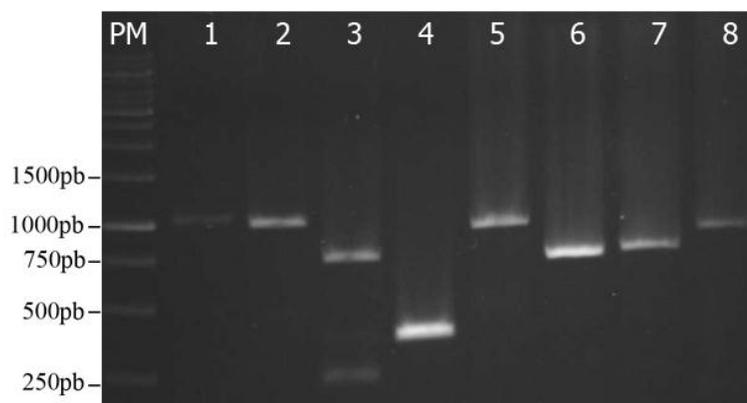


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da *nested* ou *semi nested* PCR para amplificação do gene da Hemaglutinina, subtipo H1 e H3, padronizada utilizando as amostras controles - (A/Brasil/133/2001 (H1N1) e A/Brasil/125/2001 (H3N2)). **PM:** marcador molecular de 1 kb (*Biotoools*). **Canaleta 1:** controle H1, fragmento de 1040 pb utilizando *primers* H14 – H114. **Canaleta 2:** controle H1, fragmento de 1016 pb *primers* H16+H17 – H113. **Canaleta 3:** controle H1, fragmento de 739 pb utilizando *primers* H110 – H2. **Canaleta 4:** controle H1, fragmento de 403 pb utilizando *primers* H111 – H113. **Canaleta 5:** controle H3, fragmento de 1056 pb utilizando *primers* H33+H34 - H315. **Canaleta 6:** controle H3, fragmento de 709 pb utilizando *primers* H38 - H315. **Canaleta 7:** controle H3, fragmento de 723 pb utilizando *primers* H39 – H2. **Canaleta 8:** controle H3, fragmento de 841 pb utilizando *primers* H310 – H2.

Após a padronização da amplificação do gene da HA utilizando controles positivos de IA, subtipos H1N1 e H3N2, as 116 amostras positivas para IA foram submetidas à PCR, seguida pela *nested* ou *semi nested* PCR. Inicialmente foram realizadas reações utilizando os *primers* H14/H114 e H110/H2, gerando fragmentos 1040 pb e 739 pb respectivamente, para amplificação do subtipo H1N1 e os *primers* H33+H34/H315 e H310/H2, gerando fragmentos de 1056 pb e 841 pb respectivamente para o subtipo H3, que compreendiam o gene inteiro. As amostras que foram negativas nessa amplificação foram submetidas a uma nova *nested* ou *semi-nested* PCR com os demais pares de *primers* H16+H17/H113 e H111/H113 para amplificação do subtipo H1N1 e os *primers* H38/H315 e H39/H2 para amplificação do subtipo H3N2. As amostras que não tiveram o gene da HA amplificado por nenhum dos dois métodos foram submetidas à nova PCR utilizando

os *primers* gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Schutten, conforme descrito no item 3.7.3 .

Das 9 amostras IA subtipo H1, somente 2 (amostra 65_2001 e 63_2001) (22,5%) tiveram apenas os fragmentos de 1040 pb e 723 pb amplificados (figura 16 tabela C.1 do ANEXO C). Por outro lado, 77,5% das amostras (n=7) foram amplificadas utilizando a metodologia descrita no item 3.7.3. Os resultados estão demonstrados na figura 17 e tabela C.1 do ANEXO C.

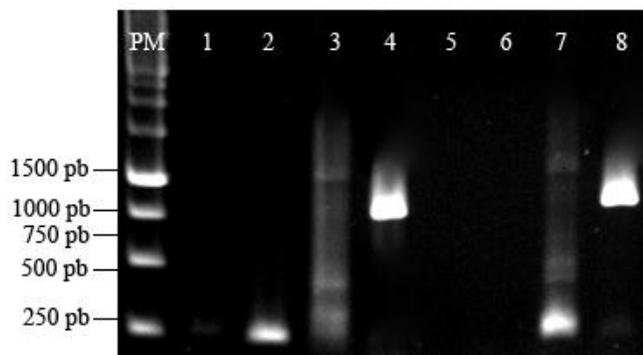


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da *nested* PCR das amostras clínicas, utilizando os *primers* H14 – H114 (a) e H110 – H2 (b) para verificação da amplificação de um fragmento de 1040 pb e 739 pb do gene da hemaglutinina (HA). **PM**: marcador molecular de 1 kb (*Biotoools*). **Canaleta 1 a 8**: amostras clínicas (nºamostra/ano): 165_2000a; 165_2000b; 63_2001a; 63_2001b; 265_2003a; 265_2003b; 65_2001a; 65_2001b.

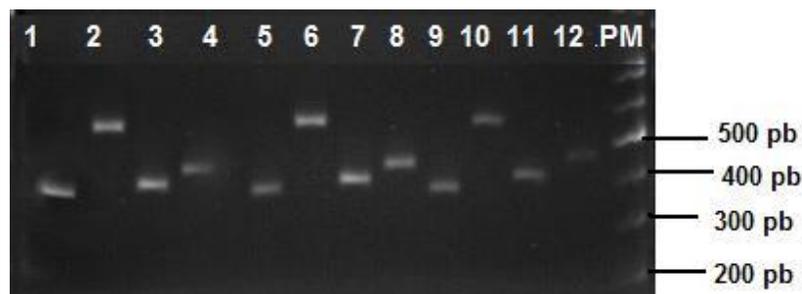


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos amplificados do gene da Hemaglutinina (H1) utilizando os *primers*: HAFwd e HA2, HA3 e HA4, HA5 e HA6 e HA7 e HA-rev. **Canaleta 1**: amostra 63_2001 utilizando *primers* HAFwd e HA2, **Canaleta 2**: amostra 63_2001 utilizando *primers* HA3 e HA4, **Canaleta 3**: amostra 63_2001 utilizando *primers* HA5 e HA6 e **Canaleta 4**: amostra 63_2001 utilizando *primers* HA7 e HA-rev; **Canaleta 5**: amostra 65_2001 utilizando *primers* HAFwd e HA2, **Canaleta 6**: amostra 65_2001 utilizando *primers* HA3 e HA4, **Canaleta 7**: amostra 65_2001 utilizando *primers* HA5 e HA6 e **Canaleta 8**: amostra 65_2001 utilizando *primers* HA7 e HA-rev;; **Canaleta 9**: amostra 165_2000 utilizando *primers* HAFwd e HA2, **Canaleta 10**: amostra 165_2000 utilizando *primers* HA3 e HA4, **Canaleta 11**: amostra 165_2000 utilizando *primers* HA5 e HA6 e **Canaleta 12**: amostra 165_2000 utilizando *primers* HA7 e HA-rev. **PM**: marcador molecular de 100 pb (*Biotoools*).

Das 91 amostras do subtipo H3N2 39,5% (n=36) tiveram os fragmentos de 1056 pb e 841 pb amplificados, compreendendo o gene inteiro. Onze amostras (13%) foram amplificadas parcialmente, somente o fragmento de 841 pb (figura 18 e tabela C.2 do ANEXO C). As amostras não amplificadas utilizando os primers descritos na primeira metodologia (item 3.7.2) foram submetidas à amplificação conforme descrito no item 3.7.3, sendo que um total de 30 amostras (32%) teve pelo menos 2 fragmentos amplificados (figura 19 e tabela C.3 do ANEXO C). Um total de 14 amostras (15,5%) mantiveram-se negativas em todas as metodologias utilizadas.

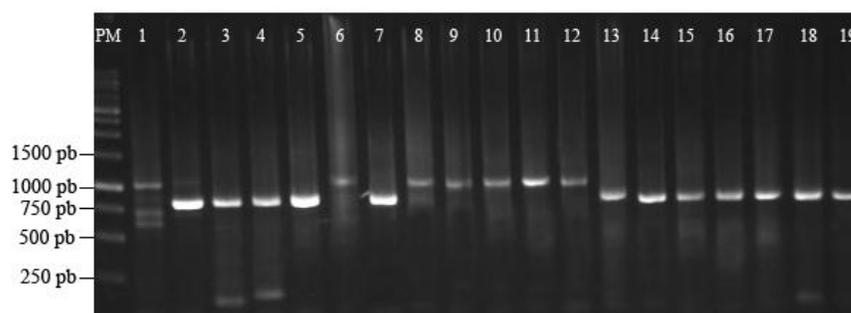


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos da *nested* ou *semi nested* PCR das amostras clínicas, utilizando os *primers* H33+H34 – H315 (a) e H310 – H2 (b) para verificação da amplificação de um fragmento de 1056 pb e 841 pb do gene da hemaglutinina (HA). **PM:** marcador molecular de 1 kb (*Biotoools*). **Canaleta 1 a 19:** amostras clínicas (nºamostra/ano) amplificadas com o par de primers a ou b: 182_2003b; 213_2003b; 246_2003b; 253_2003b; 260_2003b; 16_2004a; 30_2004b; 37_2004a; 41_2004a; 64_2004a; 92_2004a; 72_2005a; 16_2004b; 30_2004b; 37_2004b; 41_2004b; 64_2004b; 92_2004b; 72_2005b

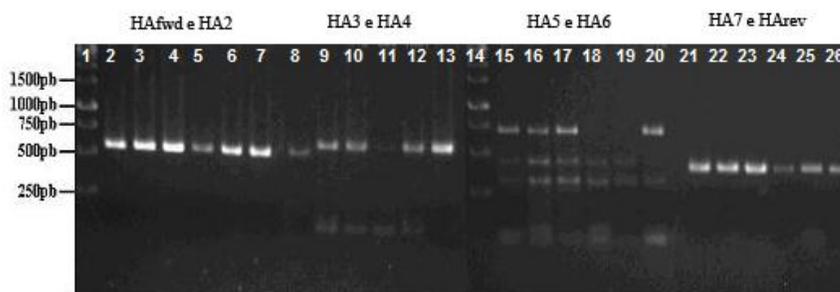


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, dos produtos amplificados do gene da Hemaglutinina (H3) utilizando os *primers*: HAFwd e HA2, HA3 e HA4, HA5 e HA6 e HA7 e HA-rev. **Canaleta 1- PM:** marcador molecular de 1 kb (*Biotoools*). **Canaletas 2 a 7:** Amostras 791_2006; 972_2006; 979_2006; 988_2006; 1001_2006 e 1015_2006, utilizando *primers* HAFwd e HA2; **Canaletas 8 a 13:** Amostras 791_2006; 972_2006; 979_2006; 988_2006; 1001_2006 e 1015_2006, utilizando *primers* HA3 e HA4; **Canaleta 14- PM:** marcador molecular de 1 kb (*Biotoools*), **Canaletas 15 a 20:** Amostras 791_2006; 972_2006; 979_2006; 988_2006; 1001_2006 e 1015_2006, utilizando *primers* HA5 e HA-6 e **Canaletas 21 a 26:** Amostras 791_2006; 972_2006; 979_2006; 988_2006; 1001_2006 e 1015_2006, utilizando *primers* HA7 e HA-rev.

4.4 Sequenciamento do gene da hemaglutinina

As amostras que tiveram pelo menos uma parte do gene amplificada foram purificadas conforme item 3.8. Das 9 amostras IA subtipo H1N1 submetidas à reação de sequenciamento, 1 amostra teve 1417 nt (compreendendo os nucleotídeos 5 à 1488) sequenciados, 1 amostra teve 1395 nt (compreendendo os nucleotídeos 4 à 1399) sequenciados, compreendendo a praticamente toda a região codante do gene da hemaglutinina. O sequenciamento do gene das sete amostras IA subtipo H1N1 restantes não apresentaram resultados satisfatórios.

O resultado das amostras IA subtipo H3N2 submetidas à reação de sequenciamento encontram-se organizados na tabela C.4. do Anexo C. Das 91 amostras subtipadas como H3N2, 43% (n=39) tiveram pelo menos uma parte do gene sequenciada.

Para verificar a compatibilidade das cepas vacinais utilizadas na Campanha Nacional de Vacinação contra Influenza, as sequências obtidas foram alinhadas com as cepas vacinais recomendadas pela OMS para o hemisfério sul, no período de 1995 à 2006, período correspondente às campanhas vacinais no Brasil (quadro 9).

As figuras 20 e 21 correspondem ao alinhamento das sequências traduzidas de aminoácidos de IA, subtipos H1N1 e H3N2, respectivamente, obtidas no presente estudo frente às respectivas sequências das cepas vacinais utilizadas no período. As tabelas 3 e 4 apresentam a relação de todas as alterações de aminoácidos ocorridas nos sítios antigênicos da Hemaglutinina, subtipo H1 e H3, respectivamente (WILEY et al., 1981 e CATON et al., 1982), quando comparadas às cepas vacinais utilizadas no período.

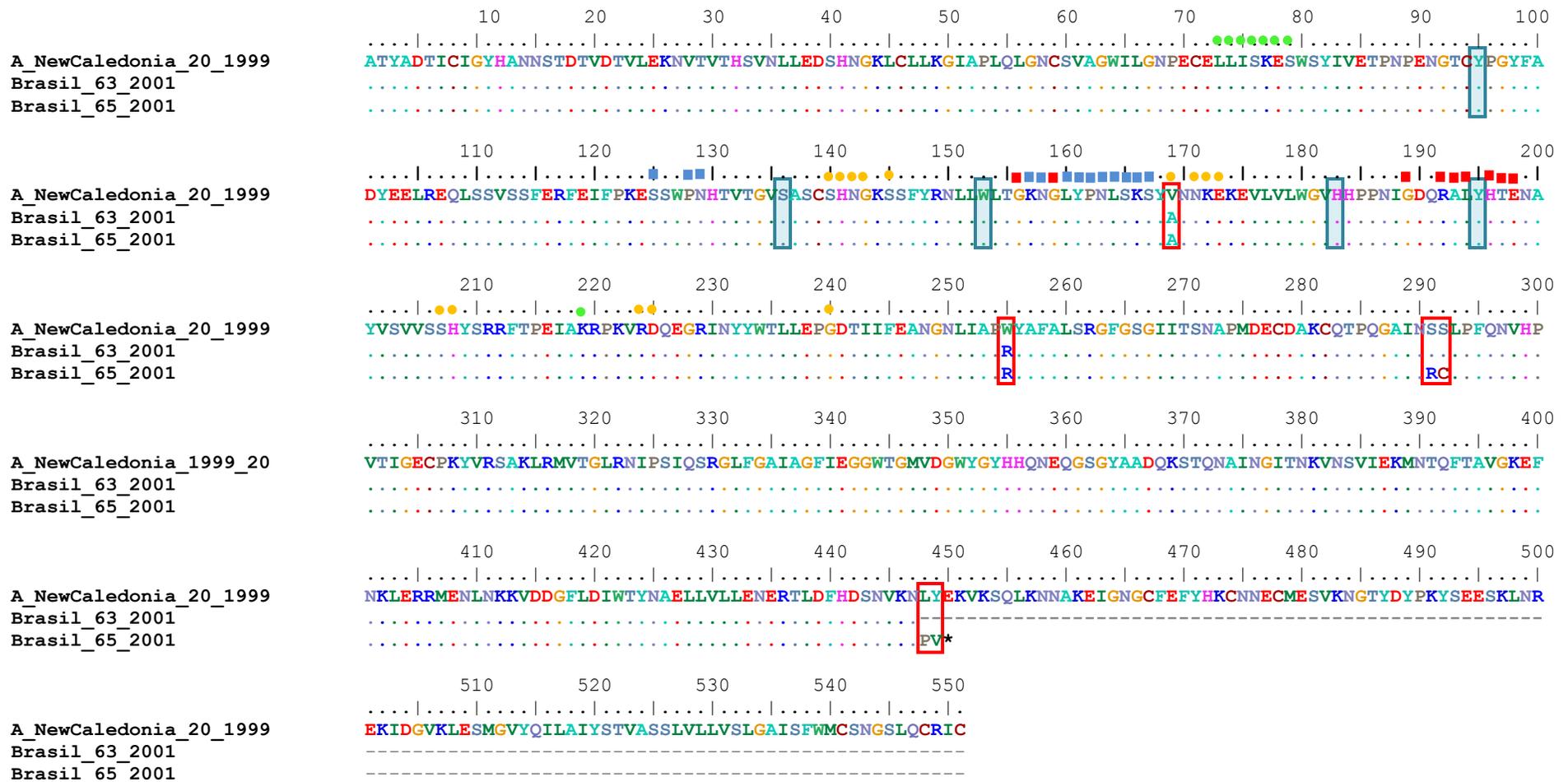


Figura 20 - Representação do alinhamento das seqüências de aminoácidos da HA de 2 amostras de *Influenzavirus A*, subtipo H1N1, obtidas no período de 1995 à 2006. Foi incluída no alinhamento a cepa vacinal recomendada para o período (quadro 9). Somente os aminoácidos distintos da cepa vacinal A_New Caledonia_20_1999 estão destacados com um retângulo vermelho. Os retângulos azuis indicam sítios da proteína envolvidos na ligação com receptores celulares. (-) indica o fragmento não sequenciado. (*) indica Stop Códon. Sítios antigênicos¹ Sa (■), Sb (■), Ca (●), Cb (●). ¹ Caton et al., 1982.

Fonte: Caton et al., 1982.

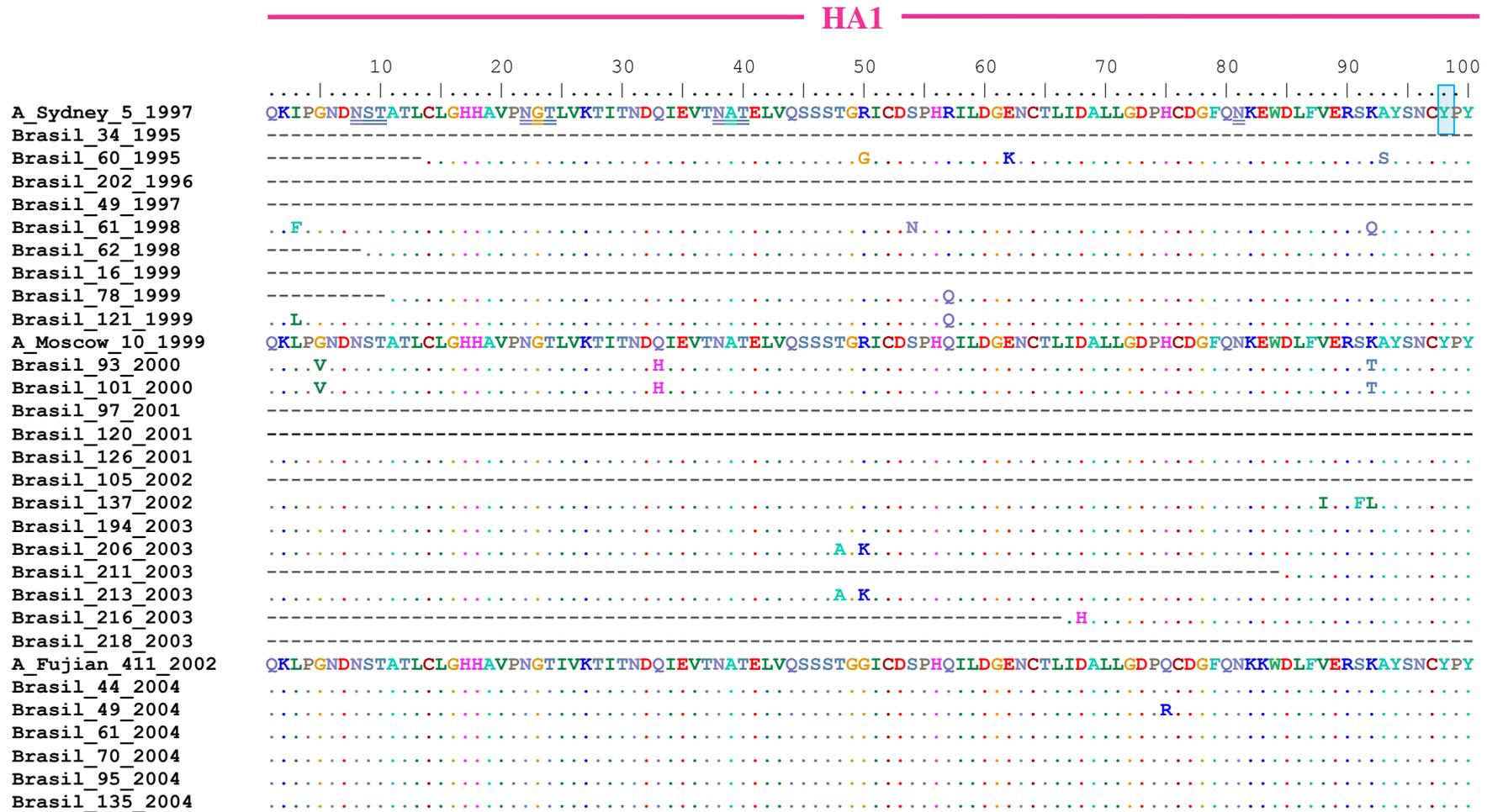
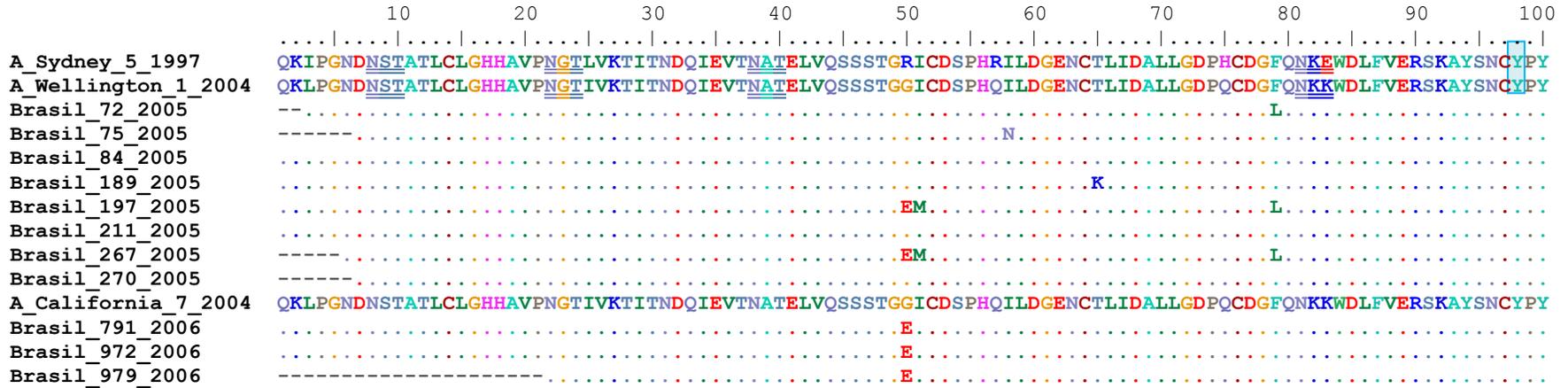


Figura 21 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos da HA de 34 amostras de *Influenzavirus* A, subtipo H3N2, obtidas no período de 1995 à 2006. Foram incluídas no alinhamento as cepas vacinais utilizadas no período de 1999 à 2006 (quadro 9). Somente aminoácidos distintos das cepas vacinais estão demonstrados. O retângulo azul indica aminoácidos conservados de ligação de receptores. (-) indica o fragmento não sequenciado. Alterações que aconteceram dentro dos sítios antigênicos estão destacadas. Os sítios antigênicos¹ estão destacados por retângulos coloridos 1 Wiley et al., 1981. Os sítios de N-glicosilação estão indicados pelos resíduos sublinhados

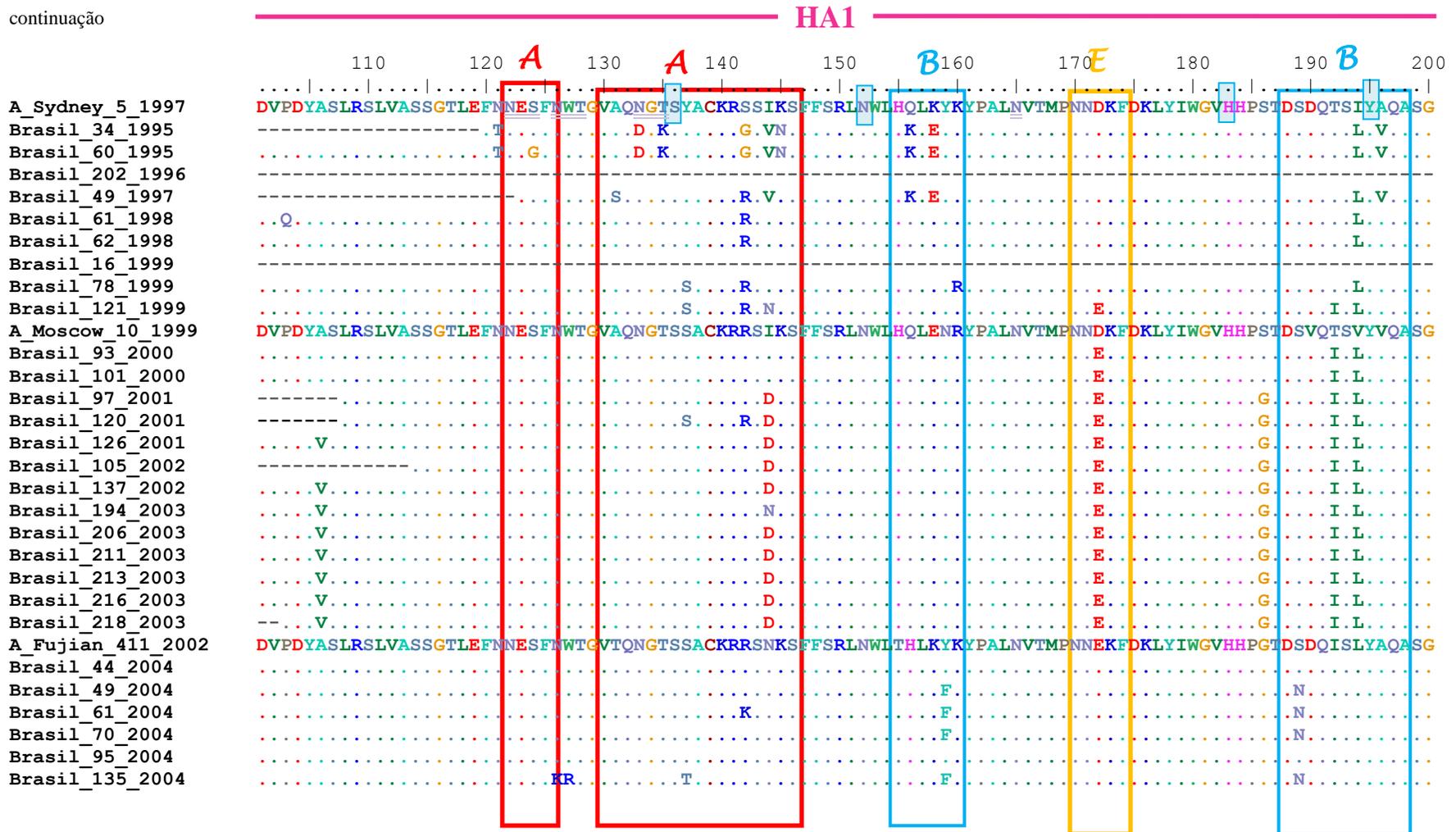
Fonte: Skehel e Wiley, 2000.

Continuação

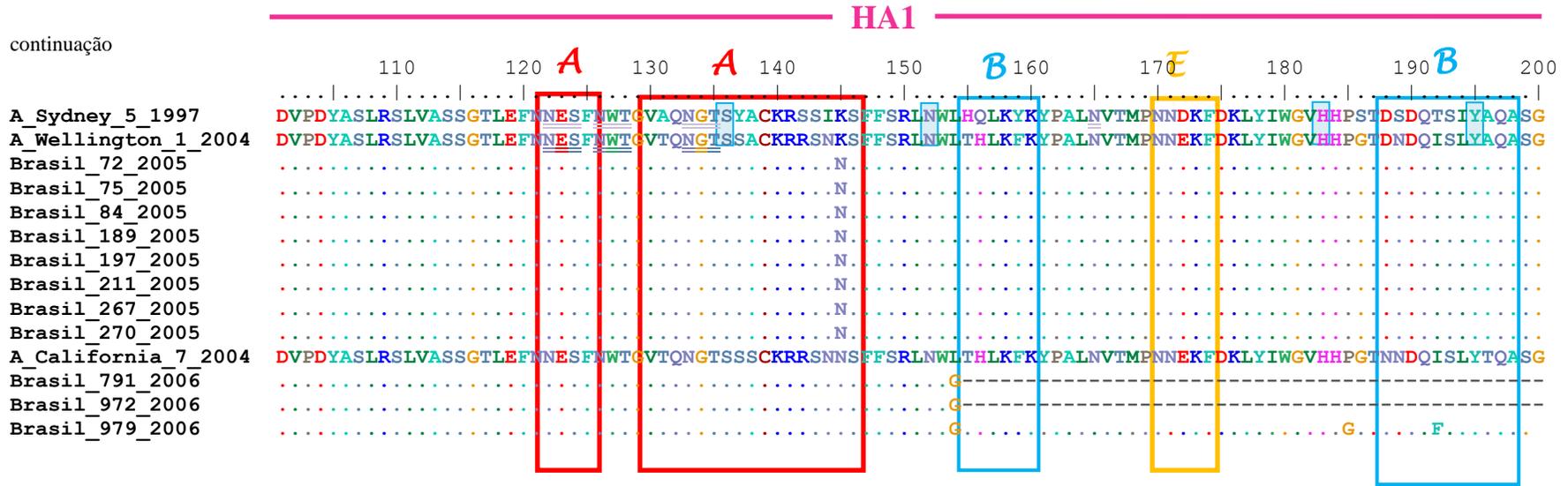
HA1



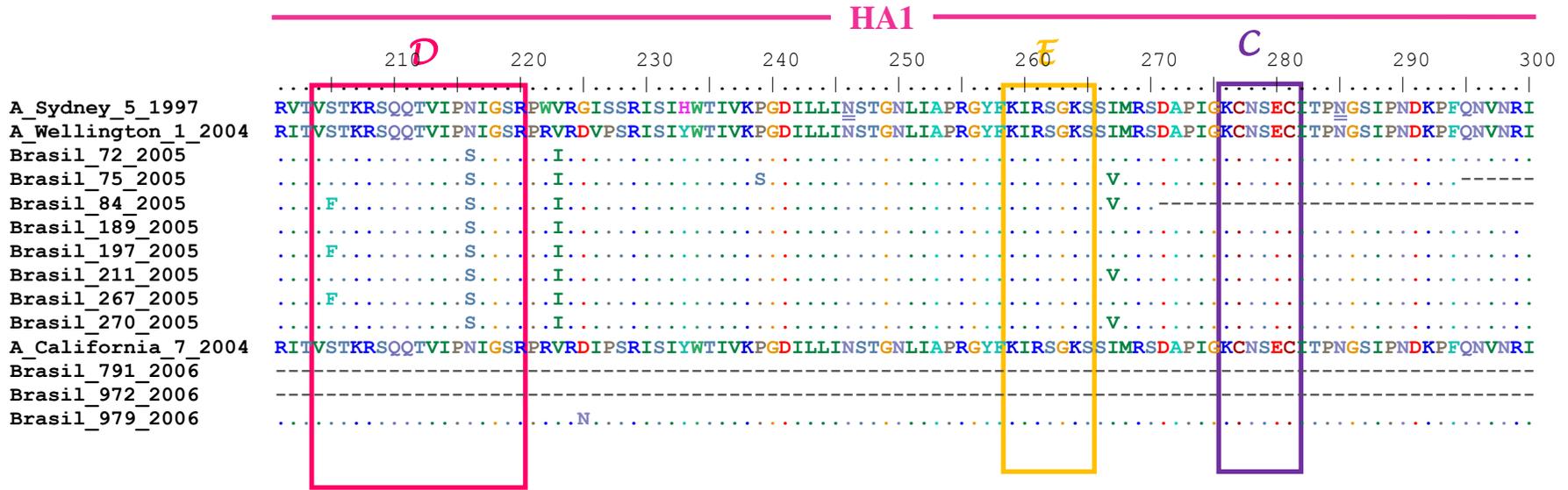
continuação



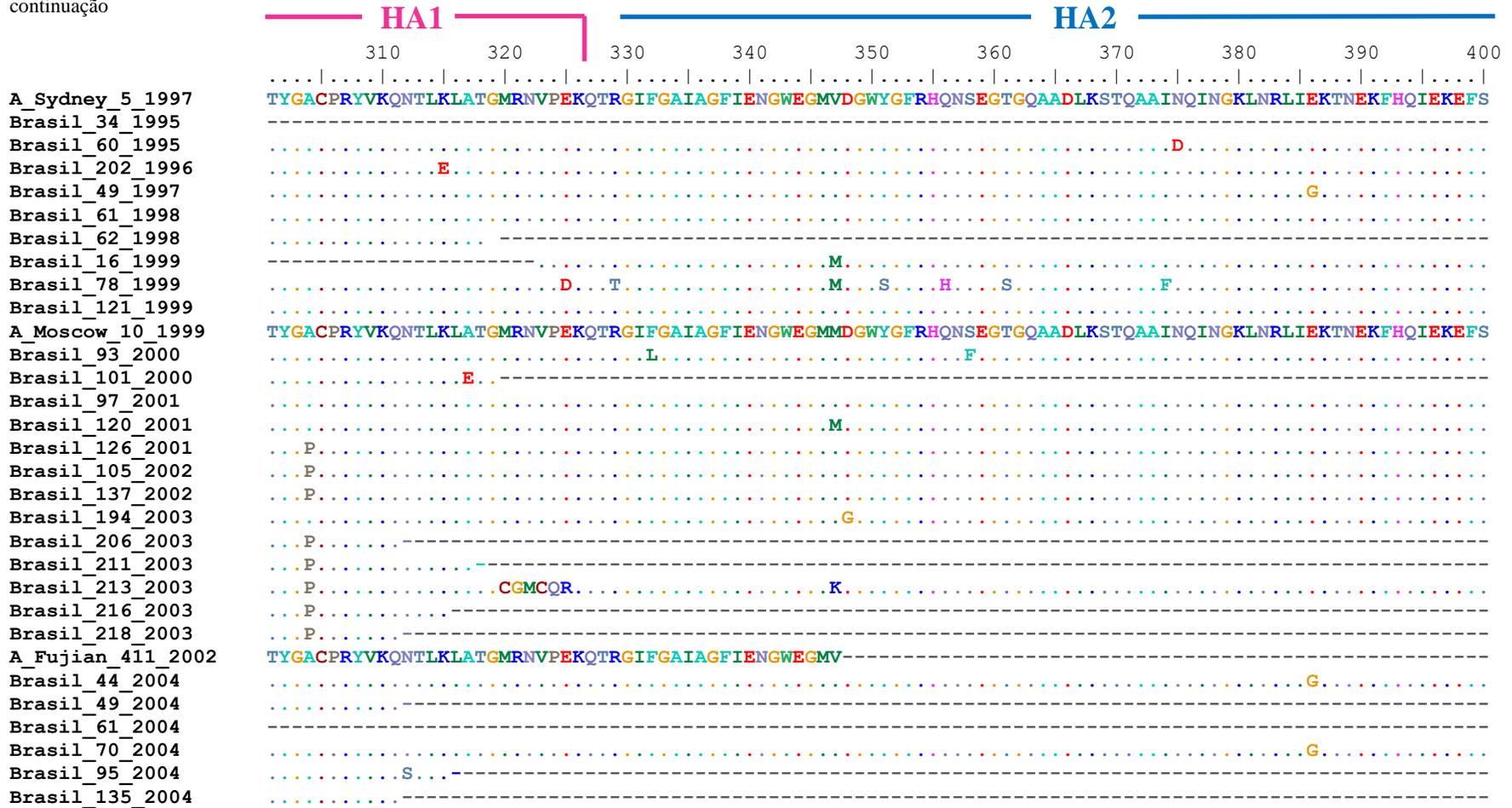
continuação



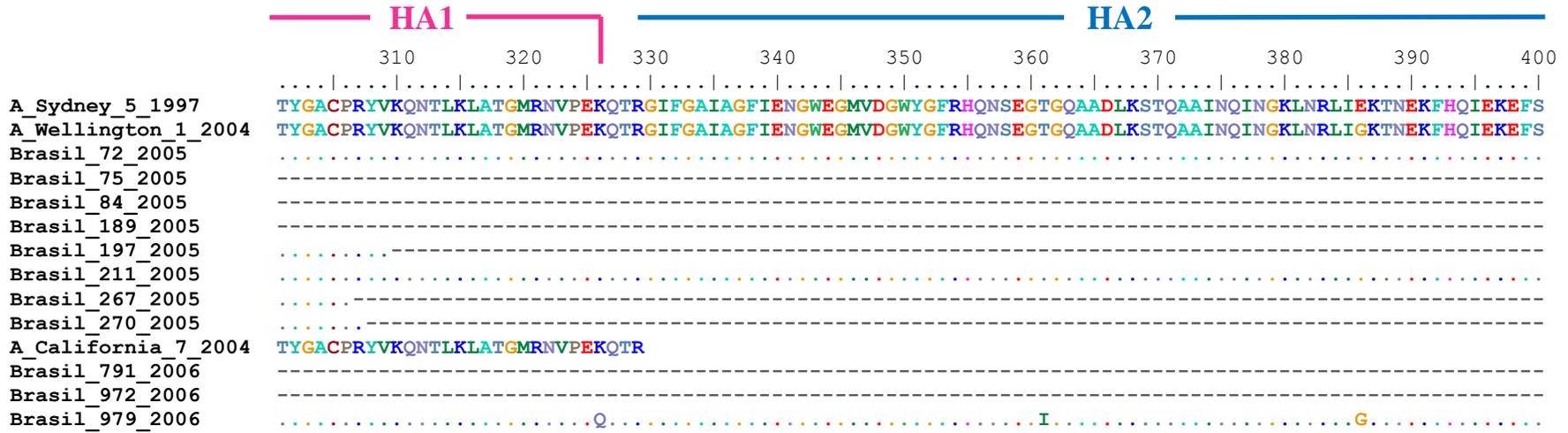
continuação



continuação



continuação



continuação

HA2

```

          410          420          430          440          450          460          470          480          490          500
A_Sydney_5_1997  EVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFFERTRKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRF
A_Wellington_1_2004 EVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFFERTKKQLRENAEDMGNGCFKIYHKCDNACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRF
Brasil_72_2005    .....P.....
Brasil_75_2005    -----
Brasil_84_2005    -----
Brasil_189_2005   -----
Brasil_197_2005   -----
Brasil_211_2005   .....
Brasil_267_2005   -----
Brasil_270_2005   -----
A_California_7_2004 -----
Brasil_791_2006   -----
Brasil_972_2006   -----
Brasil_979_2006   .....PTYN.....
```


Na análise das seqüências de aminoácidos traduzidos da HA dos *Influenzavirus A* subtipo H1, verificamos que, em comparação com o vírus vacinal utilizado no ano, houve apenas uma mutação localizada no sítio antigênico Ca (V169A) (CATON et al., 1982) e outras 5 mutações isoladas (figura 20, tabela 3), demonstrando grande similaridade dos vírus circulantes em 2001 com o vacinal.

No presente estudo, verificou-se que 3 regiões localizadas dentro da porção HA1 do gene HA (subtipo H3) apresentaram múltiplas mutações. As regiões entre os resíduos 140 ao 196, 205 a 236, 262 ao 276 apresentaram 18, 6 e 8 sítios com substituições de aminoácidos, respectivamente. Coincidentemente nessas regiões foram identificados os principais sítios antigênicos da proteína, denominados: A a E (WILEY et al., 1981). Algumas dessas mutações foram pontuais e outras ocorreram em todas as seqüências, em alguns casos fixando-se no decorrer do tempo. Por exemplo, houve uma mudança conservativa no sítio 173 de ácido aspártico (D) (nas cepas vacinais de 1999 e 2000, A/Sydney 1997 e A/Moscow/10/1999, e nas cepas circulantes em 1999) para ácido glutâmico (E) (nas cepas circulantes a partir do ano 2000) (figura 21).

Quando comparamos as seqüências da HA (subtipo H3) obtidas com os vírus vacinais utilizados nos períodos correspondentes, verificamos uma boa similaridade entre elas nos anos de 2004, 2005 e 2006, nos quais verificamos que 3, 3 e 2 sítios apresentaram alterações em todas as seqüências em comparação com o vírus vacinal, respectivamente. Nos demais anos (1999 a 2003) verificamos uma proporção maior de mutações em todas as seqüências em relação ao vírus vacinal, especialmente nos sítios antigênicos, como se pode verificar na figura 21 e na tabela 4.

Desta maneira, verifica-se que com relação a cepa vacinal utilizada em 1999 (A_Sydney_5_1997), ocorreram duas alterações dentro dos sítios antigênicos (A e B). Com relação à cepa A_Moscow_10_1999 (utilizada de 2000 a 2003) verificamos a ocorrência de 4 alterações ocorridas nos sítios A, B e E. Com relação à cepa vacinal A_Fujian_411_2002, ocorreram duas alterações dentro do sítio antigênico B e uma alteração nas amostras brasileiras e vacinal, ocorrida no sítio 145 (D145N), que conferiu a essas amostras um possível sítio de N-glicosilação extra. Com relação à cepa vacinal de 2005 (A_Wellington_1_2004) verificamos que as amostras circulantes neste ano apresentaram duas alterações em sítios antigênicos e finalmente, com relação a cepa A_California_7_2004 (utilizada em 2006) ocorreram 2 alterações em sítios antigênicos, ocorridas apenas em uma amostra.

Tabela 3 - Relação das alterações de aminoácidos quando comparado à cepa vacinal do *Influenzavirus A* subtipo H1N1.

Posição	Aminoácido vacinal	Aminoácido amostra Brasileira	Sítio Antigênico*
Cepa A_NewCaledonia_20_1999			
169	V	A	Ca

Fonte: Caton et al 1982

Continuação.

Sítio Antigenico	B	E	B	B	B	B	B	B	B	D	D							E	E			C																			
Nº aa.	160	172	185	186	189	192	193	194	196	205	216	222	223	225	226	227	233	239	261	262	267	271	275	276	297	299	304	312	315	317	325	326									
A/Sydney/5/97	K	D	P	S	S	T	S	I	A	S	N	W	V	G	I	S	H	P	R	S	I	D	G	K	V	R	A	N	K	A	E	K									
34_1995	-	-	-	-	-	-	-	L	V	-	S	-	-	-	-	-	Y	-	-	N	-	-	D	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
60_1995	-	-	-	-	-	-	-	L	V	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	N	-	-	D	N	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
202_1996	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
49_1997	-	-	-	-	-	-	-	L	V	-	-	-	-	-	V	-	Y	-	-	-	-	-	D	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
61_1998	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	V	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
62_1998	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	V	-	Y	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
16_1999	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
78_1999	R	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	V	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D		
121_1999	-	E	-	-	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	V	-	Y	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
A/Moscow/10/99	R	D	P	S	S	T	S	V	V	S	N	W	V	G	V	S	Y	P	R	S	I	D	G	K	V	R	A	N	K	A	E	K									
93_2000	-	E	-	-	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
101_2000	-	E	-	-	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	E	
97_2001	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120_2001	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
126_2001	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
105_2002	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
137_2002	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
194_2003	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	R	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
206_2003	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
211_2003	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
213_2003	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	
216_2003	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
218_2003	-	E	-	G	-	I	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A/Fujian/411/02	K	E	P	G	S	I	S	L	A	S	N	R	V	D	V	S	Y	P	R	S	I	D	G	K	V	R	A	N	K	A	E	K									
44_2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
49_2004	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
61_2004	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
70_2004	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
95_2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
135_2004	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A/Wellington/1/04	K	E	P	G	N	I	I	L	A	S	N	R	V	D	V	P	Y	P	R	S	I	D	G	K	V	R	A	N	K	A	E	K									
72_2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
75_2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	I	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
84_2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	S	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
189_2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
197_2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	S	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
211_2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
267_2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	S	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
270_2005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q
A/California/7/04	K	E	P	G	N	I	I	L	T	S	N	R	V	D	I	P	Y	P	R	S	I	D	G	K	V	R	A	N	K	A	E	K									
791_2006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
972_2006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
979_2006	-	-	G	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Fonte: Wiley; Wilson; Skehel, 1981

4.5 Reconstruções Filogenéticas

Para a comparação dos vírus brasileiros com os circulantes no restante do mundo, tanto no Hemisfério Norte como no Hemisfério Sul, as seqüências correspondentes à região HA1 do gene da HA do gene da hemaglutinina obtidas foram alinhadas com as sequências depositadas no *GenBank* e submetidas a uma análise filogenética, pelo critério de Máxima Verossimilhança.

Inicialmente, foi realizada uma análise do conjunto de dados para o subtipo H3, envolvendo o teste de razão de verossimilhança. O modelo de substituição de nucleotídeos que melhor explicaria as relações evolutivas entre as sequências foi o TVM+G (*Transversional model with gama distribution*). Essa análise não foi realizada com o subtipo H1 devido ao número reduzido de sequências obtidas.

A figura 22 representa a topologia da árvore para as amostras dos *Influenzavirus A* subtipo H3N2, obtida pelo método de Máxima Verossimilhança. Os valores de *bootstrap* revelaram-se satisfatoriamente altos, refletindo a boa sustentação dos ramos.

No geral, verificamos que as sequências agrupam-se em *clusters* conforme o ano de isolamento, demonstrando uma variação temporal e não geográfica, uma vez que vírus de diferentes localidades agruparam-se no mesmo *cluster*. As amostras brasileiras agruparam-se nos *clusters* referentes aos anos de isolamento da amostra e próximas aos vírus vacinais utilizados nos anos correspondentes, com exceção da amostra de 1999.

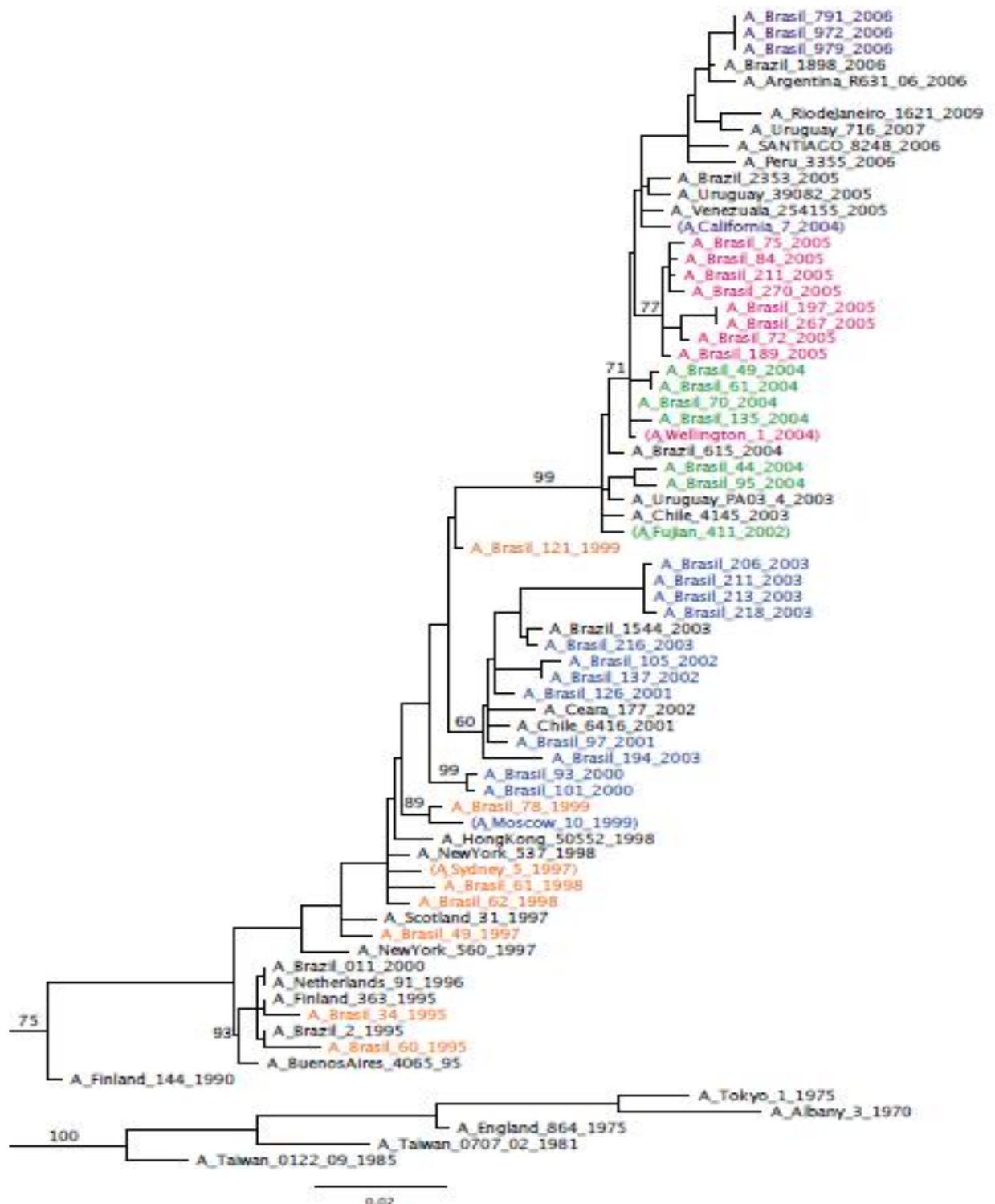


Figura 22 - Topologia da árvore obtida pelo método de Máxima Verossimilhança das sequências brasileiras de *Influenzavirus A*, H3N2. Os valores de *bootstrap* estão representados sobre os ramos. As amostras brasileiras estão representadas da mesma cor que a cepa vacinal utilizada no período (quadro 9). Cepas: *A/Sydney/5/97*, *A/Moscow/10/99*, *A/Fujian/411/2002*, *A/Wellington/1/2004*, *A/California/7/2004*.

5 Discussão

No presente estudo foi encontrada uma baixa positividade de *Influenzavirus* em crianças (4,38%). Os resultados estão em concordância com dados da literatura, que descrevem índices de incidência variando entre 1,2% e 9,1% (ALBUQUERQUE et al., 2009; CHUTINIMITKUL et al., 2008, VIDAL et al., 2008; THOMAZELLI et al., 2007; COELHO et al., 2007; POEHLING et al., 2006, MOURA et al., 2010). Porém, Neuzil et al. (2002), em um estudo realizado na cidade de Seattle, EUA, demonstraram que, anualmente, cerca de 15% de crianças em idade escolar e 42% em idade pré-escolar são infectadas pelos vírus influenza e Ploin et al. (2007) demonstraram que no período de surto do vírus a prevalência em crianças com idade variando de 12 a 35 meses foi de 57% e em crianças menores de 12 meses foi de 39%. Estudo realizado em Maceió por Oliveira et al., (2004) e em Curitiba por Tsuchiya et al. (2005), também descreveram que os índices mais elevados de positividade foram obtidos em crianças com idade mais avançada, entre 5 e 14 anos. A população estudada em nosso trabalho consistiu, em sua maioria, de crianças menores de 5 anos de idade (à exceção do ano de 1995, no qual foram analisadas crianças até 15 anos), justificando, talvez, os resultados encontrados.

A maior prevalência foi verificada em crianças menores de 2 anos (94,5%), com um pico observado nos primeiros seis meses de vida (53,4%). As pessoas pertencentes a essa faixa etária são descritas na literatura como pacientes de risco para o desenvolvimento de infecções mais sérias causadas pelo vírus Influenza com consequente hospitalização (KIM et al., 2008; MATHISEN et al., 2010; POEHLING et al., 2006; PELTOLA et al., 2003; NEUZIL et al., 2000; SUGAYA et al., 2000). Verificamos que no total de 132 amostras positivas 67,42% (n=89) corresponderam à pacientes internados (72 na enfermaria e berçário, 17 na UTI) e 18,18% (n=24) pacientes atendidos no pronto atendimento, confirmando o risco de desenvolvimento de complicações nesta população, com necessidade de hospitalização (tabela D.1 do ANEXO D). Não conseguimos obter dados da procedência do local de atendimento no Hospital Universitário de 19 pacientes.

Um estudo realizado por Coelho et al. (2007) com amostras de crianças com infecção respiratória aguda com idade inferior a cinco anos atendidas em unidade hospitalar na cidade do Rio de Janeiro, também demonstraram baixa frequência dos vírus influenza A e B. Entretanto, contradizendo os nossos resultados houve menor ocorrência do vírus em crianças internadas (35,6%) quando comparado às crianças que passaram pelo ambulatório (51,1%). Estudos maiores envolvendo outros centros com crianças atendidas no Pronto Atendimento e internadas em

unidades hospitalares e extratificadas por idade são essenciais para estabelecer uma vigilância eficiente para a infecção causada pelo vírus influenza em crianças no Brasil.

Entretanto, na avaliação dos resultados, é de extrema importância ressaltar que este foi um estudo retrospectivo, no qual foram analisadas amostras armazenadas em freezer – 70 °C há mais de uma década e que podem, portanto, ter sofrido degradação, não estando em condições ideais para a realização do diagnóstico pelas técnicas utilizadas, levando a resultados falso negativos, explicando a baixíssima positividade verificada em alguns anos do estudo (LANDRY, 2011; DWYER et al., 2006).

Frisbie et al. (2004) utilizaram aspirado nasal de crianças menores de 5 anos, com diagnóstico confirmado de influenza, para comparar a métodos de detecção do *Influenzavirus*. As amostras frescas foram utilizadas, inicialmente, para isolamento em cultura de células, usado como “gold standad”, e RT-PCR. A última apresentou uma sensibilidade de 82% quando comparada à cultura. Após alguns anos de estocagem a -70 °C, essas amostras foram retestadas e a sensibilidade da RT-PCR diminuiu para 62%. Os autores atribuíram a degradação do ácido nucléico como causa da diminuição de positividade das amostras.

He et al. (2009) sugeriram que a não amplificação das amostras também pode estar relacionada à alta variabilidade do vírus, sujeito à ocorrência de *drifts* e *shifts* que pode contribuir na diminuição da especificidade e, conseqüentemente, sensibilidade da técnica, embora o gene alvo da Duplex RT-PCR fosse o NS, que é conservado nos vírus influenza. Todavia, ressaltamos ser de extrema importância à rápida e constante atualização dos bancos de dados de sequencias, para que seja possível o desenho de *primers* adequados para a detecção de um novo vírus por qualquer teste.

Portanto, o índice de positividade de *Influenzavirus* em crianças ao redor do mundo é bastante variável, sendo descrito que cerca de 20% infecta-se anualmente, excretando o vírus em grandes quantidades e por períodos mais prolongados que os adultos, sendo indiscutível o papel das crianças como fonte disseminadora do vírus para a comunidade (PLOIN et al., 2007).

As epidemias anuais de Influenza ocorrem tipicamente durante o outono até o começo da primavera, com predominância no inverno (BHARAJ et al., 2009; MOURA et al., 2009; FORLEO NETO et al., 2003; PELTOLA et al., 2003; IZURIETA et al., 2000; KIM et al., 2008). Entretanto, os ciclos sazonais são fortemente definidos nas regiões temperadas e menos definidos nas regiões tropicais (VIBOUD et al., 2006), sugerindo que fatores ambientais podem direcionar

tais padrões. Alonso et al. (2007) descreveram que a circulação anual do influenza no Brasil se assemelha a uma “onda”, com intervalo de aproximadamente 3 meses entre o início da epidemia nas regiões norte e nordeste do país com relação ao sul e sudeste.

Durante os 12 anos de estudo, apesar do baixo índice de amostras positivas, podemos verificar uma maior circulação do vírus influenza nos meses de maio a julho, exceto no ano de 2001 no qual o pico de circulação ocorreu em outubro e em 2004 no qual o vírus circulou praticamente durante todo o ano, com maior ocorrência durante o mês de março. A maior circulação do vírus influenza no verão de 2004, também foi relatada por Jian et al. (2007), durante o mesmo período em Taiwan, sendo sugerido pelos autores que esta cepa circulante foi “importada” e era diferente da que circulou durante em invernos anteriores.

Dados da literatura descrevem a ocorrência dos surtos de influenza durante os meses de outono/inverno, com maior atividade entre os meses de abril a junho nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, dados que corroboram os obtidos por nós (CINTRA e ARRUDA, 2000, MELLO, et al. 2009; VIDAL et al., 2008).

Os vírus de influenza A foram detectados em todos os anos estudados, e o vírus de Influenza B apenas em três anos (2002, 2004 e 2006). Nossos dados são semelhantes aos descritos por Vidal et al. (2008), no qual o IA foi tipo predominante no período de 2000 a 2003, na cidade de Curitiba, no Paraná. Entretanto, Moura et al. (2009), verificaram a co-circulação de ambos os tipos (89,3% para IA e 10,7% para IB), com predominância do IA, no período de 2001 a 2007, na cidade de Fortaleza, Ceará, localizada no Nordeste do Brasil. Curiosamente, no ano de 2006, um dos poucos no qual verificamos a circulação do IB em São Paulo, não foi verificada a circulação deste vírus em Fortaleza. Outro fato interessante com relação à circulação do vírus influenza B foi a maior prevalência com relação ao vírus influenza A no inverno de 2004 (tabela E.1 do ANEXO E). O que pode ter ocorrido, é que a população teve contato com o vírus influenza A durante o verão e quando o inverno chegou já apresentava imunidade contra a cepa do subtipo H3, dando espaço a disseminação do *Influenzavirus B* (JIAN et al., 2007).

O *Influenzavirus A* é igualmente isolado nos pacientes internados e no atendidos em ambulatório, enquanto o *Influenzavirus B* é predominantemente encontrado nos pacientes ambulatoriais (TSUCHIYA et al., 2005). Em nosso estudo o vírus de Influenza B foi predominantemente detectado em amostras de pacientes internados (11 de 13, sendo 10 na enfermaria e 1 na UTI) do que de pacientes atendidos no Pronto Atendimento (2 de 13). Esses

resultados refletem a importância dos estudos sobre a prevalência de infecção por vírus influenza em pacientes pediátricos, especialmente do IB.

Neste estudo, o subtipo H3N2 foi o mais frequente em todos os anos, sendo o subtipo H1N1 detectado apenas em 4 anos: 2000, 2001, 2003 e 2006. O subtipo H3 também foi descrito em outros estudos como o mais prevalente em várias localidades, como na Tailândia de 2006 a 2009 (SUWANNAKARN et al., 2010) e na Dinamarca, no qual foi o predominante de 1999 a 2006, com exceção da epidemia de 2000-2001, quando o subtipo H1N1 foi o predominante pela introdução de uma nova linhagem (A/NewCaledonia/20/1999-like) (BRAGSTAD et al., 2008). Em um estudo envolvendo 19 países de clima temperado, tanto do Hemisfério Norte como do Hemisfério Sul, Finkelma et al. (2007) relataram a predominância do H3N2 em 9 anos consecutivos (1997 a 2005), seguido pelo Influenza B e H1N1, com co-circulação dos três tipos, corroborando os resultados encontrados. No Brasil, Paiva et al. (2000) relataram uma maior prevalência do subtipo H3N2 (47,6%) em relação ao H1N1 (31,7%) durante os anos de 1996 a 1998 e em 2006 foi verificada a co-circulação dos vírus H1N1 e H3N2, com predominância do H1N1 (PAIVA et al., 2006).

Um dos motivos para a não subtipagem de 13,8% das amostras pela Multiplex RT-PCR pode ser a alta variabilidade dos genes da hemaglutinina e neuraminidase. Por se tratar de um vírus RNA, cuja enzima, RNA polimerase RNA dependente, não possui mecanismo de correção, o número de alterações de nucleotídeos por ciclo replicativo é maior do que os vírus de DNA, (COFFIN, 1992; HOLLAND et. al, 1996). Outra razão para a não subtipagem seria que o gene da hemaglutinina possui escassas regiões conservadas, dificultando o desenho dos *primers*. Alterações de bases nitrogenadas, que ocorrem 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 (WEBSTER, 1980).

A região HA1, que compreende os aminoácidos 1 ao 328, é conhecida como região de maior importância da Hemaglutinina, pois contém a região de ligação com o receptor celular (ácido siálico) e as regiões de ligação com os anticorpos e conseqüentemente, importantes para a neutralização do vírus (WILEY et al., 1981; SKEHEL e WILEY, 2000; CHUTINIMITKUL et al., 2008). Por esta razão essa foi a região escolhida para realizarmos a análise do gene da hemaglutinina.

A região HA1 dos *Influenzavirus A*, subtipo H1 e H3, possuem cinco aminoácidos extremamente conservados, destacados nos alinhamentos por um retângulo azul (figuras 20 e 21), que são: Tyr(Y)-98, Ser(S)-136, Trp(W)-153, His(H)-183 e Tyr(Y)-195. Estes aminoácidos estão relacionados à ligação do vírus ao receptor celular, ácido siálico. (BUSH et al., 1999; SKEHEL e WILEY, 2000). Não verificamos alterações em nenhum desses sítios, indicando que a ligação com os receptores celulares manteve-se conservada.

Para hemaglutinina H1 estão definidos 4 sítios antigênicos – sítio Sa (aa 125; 128-129; 157-158; 160 a 167), sítio Sb (aa 156; 159; 189; 192 a 198), sítio Ca (aa 140 a 145; 169 a 173; 207-208; 224-225; 240), sítio Cb (aa 72 a 79 e aa 219) (CALTON et al., 1982), e para a hemaglutinina H3 estão definidos 5 sítios antigênicos – sítio A (do aminoácido 122, 124, 126, 130 a 133, 135, 137, 138, 140, 142 a 146, 150, 152, 168), sítio B (aa 155 a 160 e aa 188 a 198), sítio C (aa 276 a 281), sítio D (aa 204 a 220), sítio E (aa 170 a 174 e aa 259 a 265) (WILEY et al., 1981).

Caton et al., (1982), compararam os sítios antigênicos dos *Influenzavirus A* subtipo H1 com os do subtipo H3 e descreveram que o sítio Ca corresponde ao sítio D do subtipo H3.

Ao analisarmos as sequências de aminoácidos da HA dos *Influenzavirus A* subtipo H1 do ano de 2001 (figura 20), observamos apenas 6 mudanças em relação à cepa vacinal utilizada no período correspondente, demonstrando boa similaridade entre as amostras brasileiras e o vírus vacinal. Apenas uma alteração aconteceu dentro do sítio antigênico “Ca” (V169A), essa mesma variação foi encontrada por Li et al. (2008) em amostras de 2002, 2003, 2005 e 2006 no Vietnã. Esta mesma cepa vacinal foi utilizada até 2006, porém não obtivemos sequências dos demais anos para verificar a evolução deste subtipo no decorrer do tempo.

Bragstad et al., (2008) também encontraram grande semelhança entre as cepas vacinais e as amostras de *Influenzavirus A*, subtipo H1N1 na Dinamarca. Em um estudo de caracterização molecular do vírus influenza em crianças, na Tailândia, Chutinimitkul et al. (2008), encontraram 94,68% de similaridade entre os aminoácidos dos vírus circulantes no ano de 2006 e o vírus vacinal A/NewCaledonia/20/1999. Nós encontramos 99,1 % de similaridade.

As alterações encontradas nas nossas amostras de vírus Influenza subtipo H3N2, quando comparadas aos vírus vacinais recomendados em cada período, foram predominantemente localizadas próximas ou em sítios antigênicos, particularmente nos sítios A e B, nos quais estão localizados os resíduos importantes na ligação com anticorpos específicos, devido a sua

conformação em forma de loop e por se projetarem para fora da Hemaglutinina (SKEHEL e WILEY, 2000). Alterações nesses sítios, portanto, são de grande interesse para o desenvolvimento de vacinas adequadas. Wilson e Cox (1990) propuseram que *drifts* de importância epidemiológica normalmente apresentam quatro ou mais substituições de aminoácidos localizados em dois ou mais sítios antigênicos na porção HA1 no gene da hemaglutinina. Por outro lado, Shih et al. (2002) descreveram que o aparecimento de novas variantes antigênicas podem estar relacionados a mais de duas variações ocorrendo em sítios antigênicos ou a uma variação em sítio antigênico associada a uma alteração em sítio de receptor.

No nosso estudo, verificamos total de 29 alterações nos sítios antigênicos do subtipo H3N2 (9 no sítio A, 11 no sítio B, 1 no sítio C, 3 no sítio D e 5 no sítio E), sendo o sítio B o mais variável. Entre as múltiplas alterações ocorridas no mesmo sítio, citamos a posição 144, que apresentou mudanças não conservativas, de isoleucina (I) para aspartato (D) entre 2001 e 2003 e, nos dois anos subsequentes, 2004 e 2005, mudou para asparagina (N), corroborando a idéia que essa região é passível de sofrer muitas mutações, sem comprometer a estrutura e função da HA, estando intimamente relacionada com o escape de anticorpos (WILEY et al., 1981, SKEHEL e WILEY, 2000, MUÑOZ et al., 2005; BRAGSTAD et al., 2008).

Alterações encontradas no resíduo 193, localizado no sítio B, e no resíduo 225 localizado dentro do local de ligação do receptor estão relacionadas a um alto número de cepas resistentes a Amantadina (SMITH et al., 2004). Alguns autores sugerem que essa mutação é resultado de uma pressão exercida pelo uso desses antivirais (SIMONSEN et al., 2007; FURUSE et al., 2009). Não foi encontrada nenhuma alteração nesses resíduos em nossas amostras.

Dos dez sítios passíveis de sofrer N-glicosilação (N-X-S/T, no qual X pode ser qualquer aminoácido, à exceção de ácido aspártico) presentes na região HA1 do subtipo H3 (resíduos 8, 22, 38, 63, 122, 126, 133, 165, 246 e 285), verificamos que a amostra brasileira Brasil_135_2004 sofreu alteração no sítio 126 (N126K), e as amostras Brasil_34_1995 e Brasil_60_1995 apresentavam uma ácido aspártico (D) no sítio 133, ambas alterações levaram a perda do sítio. Por outro lado, verificamos que alteração no sítio 144 (D→N) ocorrida nos vírus vacinais e circulantes nos 2004 a 2006, levou ao aparecimento de um sítio de N-glicosilação a mais nessas amostras.

O número de sítios de glicosilação na região globular da HA, subtipo H3, aumentou consideravelmente nos últimos 42 anos, de 2 (presentes na amostra A/Hong/Kong_1_68) para os

10/11 atuais (MELIDOU et al., 2009), levando a crer que a adição dos carboidratos pode conferir uma vantagem evolutiva no estabelecimento deste subtipo. Sabe-se que a ausência desses sítios pode causar perda da função da glicoproteína, (PANDA et al., 2004), por outro lado foi demonstrado que as glicosilações podem afetar diretamente a ligação dos anticorpos à proteína viral, seja pela geração de progênie viral mais resistente à neutralização por anticorpos ou pela alteração de sítios antigênicos devido à adição de novos sítios de glicosilação (SKEHEL e WILEY, 2000).

Ao analisarmos as alterações ocorridas em ambos os subtipos verificamos maior variabilidade no H3. Wang et al. (2009) estudaram durante 26 anos, em Taiwan, as características antigênicas da hemaglutinina, e constaram que o subtipo H3 também apresentou maior variação, seguido do *Influenzavirus B* e por último *Influenzavirus A* subtipo é H1.

A análise do gene da hemaglutinina demonstrou que as cepas circulantes no Brasil durante os anos de 1995 a 2006 apresentaram mutações no decorrer dos anos, especialmente nos sítios antigênicos, as quais levaram a introdução de novas cepas vacinais em determinados períodos. No geral, as cepas circulantes localizaram-se em clados próximos às cepas vacinais utilizadas, com exceção do ano de 1999, no qual a cepa circulante e a vacinal localizaram-se em clados separados, indicando que a mudança da cepa vacinal a partir do ano de 2000 para A_Moscow_10_1999, foi acertada.

O *Influenzavirus* é considerado um problema mundial de saúde pública, com impacto significativo de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade e nas populações de alto risco, que compreendem idosos e imunocomprometidos. Devido às constantes variações antigênicas do gene da hemaglutinina, são necessários constantes esforços para manter os bancos de dados atualizados, a fim de prevenir pandemias evitando assim inúmeras mortes causadas pelo vírus influenza. Por essa razão, é importante o constante monitoramento da circulação dos vírus influenza por meio de vigilâncias anuais para detectar novos subtipos potencialmente emergentes, para detectar as cepas resistentes aos antivirais e para a indicação da recomendação das vacinas.

6 Conclusão

- ✓ O *Influenzavirus* apresentou baixa circulação em crianças atendidas em hospital dentro da faixa etária estudada, com pico de incidência em crianças até 6 meses de idade;
- ✓ Durante os 12 anos de estudo foi verificada a circulação do vírus de IA em todos os anos com co-circulação com o IB nos anos de 2002, 2004 e 2006.
- ✓ O vírus Influenza, A subtipo H1N1, foi detectado apenas em três anos estudados, enquanto o subtipo H3N2 foi detectado em todos os anos, sendo o mais prevalente.
- ✓ Os vírus brasileiros apresentaram boa similaridade em relação às cepas vacinais utilizadas para o período, com exceção do ano de 1999.
- ✓ Os aminoácidos importantes para a ligação do vírus ao receptor se mantiveram inalterados durante os 12 anos de estudo.
- ✓ As sequências de IA subtipo H1 apresentaram apenas uma alteração dentro do sítio antigênico Ca
- ✓ As sequências de IA subtipo H3 apresentaram um total de 29 alterações dentro de sítios antigênicos, distribuídas principalmente entre os sítios A e B.

Referências

REFERÊNCIAS *

ALBUQUERQUE, M. C.; PENA, G. P.; VARELLA, R.B.; GALLUCCI, G.; ERDMAN, D.; SANTOS, N. Novel Respiratory Virus Infections in Children, Brazil. **Emerging Infect. Dis.**, v. 15, n. 5, p. 806-808, 2009.

ALONSO, W. J.; VIBOUD, C.; SIMONSEN, L.; HIRANO, E. W.; DAUFENBACH, L. Z.; MILLER, M. A. Seasonality of influenza in Brazil: A traveling wave from the Amazon to the subtropics. **Am. J. Epidemiol.**, v. 165, p. 1434-1442, 2007.

ANDRADE, C. R.; IBIAPINA, C. C.; CHAMPS, N. S.; TOLEDO JUNIOR, C. C., PICININ, I. F. M. Gripe aviária: a ameaça do século XXI. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 5, p. 470-479, 2009.

ANSALDI, F.; D'AGARO, P.; FLORENTIIS, D.; PUZELLI, S.; LIN, Y. P.; GREGORY, V.; BENNETT, M.; DONATELLI, I.; GASPARINI, R.; CROVARI, P.; HAY, A.; CAMPELLO, C. Molecular characterization of influenza B viruses circulating in northern Italy during the 2001-2002 epidemic season. **J. Med. Virol.**, v. 70, p. 463-469, 2003.

BESSELAAR, T. G.; BOTHA, L.; McANERNEY J. M.; SCHOUB, B. D. 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, p. 71-78, 2004.

BHARAJ, P.; BHARAJ, P.; SULLENDER, W. M.; KABRA, S. K.; MANI, K.; CHERIAN, J.; TYAGI, V.; CHAHAR, H. S.; KAUSHIK, S.; DAR, L.; BROOR, S. Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. **Virol. J.**, v. 6, p. 89, 2009.

BLACK, M.; ARMSTRONG, P. An introduction to avian and pandemic influenza. **NSW Public Health Bull**, v. 17, n. 7-8, p. 99-103, 2006.

BOON, A. C. M.; FRENCH, A. M. F.; FLEMING, D. M.; ZAMBON, M. C. Detection of influenza A subtypes in community – based surveillance. **J. Med. Virol.**, v. 65, p. 163-170, 2001.

BOUVIER, N. M.; LOWEN, A. C.; PALESE, P. Oseltamivir-resistant influenza A viruses are transmitted efficiently among guinea pigs by direct contact but not by aerosol. **J. Virol.**, v. 82, n. 20, p. 10052-10058, 2008.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRAGSTAD, K.; NIELSEN, L. P.; FOMSGAARD, A. The evolution of influenza A viruses from 1999 to 2006: A complete genome study. **J. Virol.**, v. 5, p. 40, 2008.

BUSH, R. M.; BENDER, C. A.; SUBBARAO, K.; COX, N. J.; FITCH, W. M. Predicting the evolution of human influenza A. **Science**. v. 286, n. 5446, p.1921-1925, 1999.

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

CATON, A. J.; BROWNIE, G.; YEWDELL, J. W.; GERHARD, W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34, hemagglutinin (H1 subtype). **Cell**, v. 31, p. 417-427, 1982.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Neuraminidase inhibitors for treatment of influenza A and B infections. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 48, p. 1-10, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC Prevention and Control of Influenza with Vaccines Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010a. Available from: <<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5908.pdf>> Acesso em: 8 abr. 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 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, 2006b. Available from: <<http://www.cdc.gov/flu/han011406.htm>> Acesso em 20 out. 2010.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “PROFESSOR ALEXANDRE VRANJAC”. Informe Técnico: Influenza Pandêmica H1N1 2009 - Fase pós-pandêmica; CVE, 2010. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/influa_h1n1.html> Acesso em: 27 out. 2010.

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

CHEN, Z; KRUG, R. M. Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. **Trends Microbiol.**, v. 8, n. 8, p. 376-83, 2000.

CHUTINIMITKUL, S.; CHIEOCHANSIN, T.; PAYUNGPORN, S.; SAMRANSAMRUJKIY, R.; HIRANRAS, T.; THEAMBOONLERS, A.; POOVORAWAN, Y. Molecular characterization and phylogenetic analysis of H1N1 and H3N2 human influenza A viruses among infants and children in Thailand. **Virus Res**. v. 132, p. 122-131, 2008.

CINTRA, O. A. L.; ARRUDA, E. Influenza. In: FARHAT, C. K.; CARVALHO, E. S.; WECKX, L. Y.; FALLEIROS, L. H. R.; SUCCI, R. C. M. (Ed.). **Fundamentos e prática das imunizações em clínica médica e pediatria**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 450-491.

CLAAS, E. C. J.; SPRENGER, M. J. W.; KLETER, G. E. M.; BEEK, R. V.; QUINT, W. G. V.; MASUREL, N. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.**, v. 39, p. 1-13, 1992.

COELHO, M. C.; TSUCHIYA, L. R. R. V.; NOGEUIRA, M. B.; PEREIRA, L. A.; TAKAHASHI, G. A.; CRUZ, C. R.; RABONI, S. M. Impacto of Respiratory infections by Influenza Virus A and B in pediatrics patients from Federal University of Paraná, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, 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.

CONNOR, R. J.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G.; PAULSON, J. C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. **Virology**, v. 205, n.1, p. 17-23, 1994.

COUCEIRO, J. N. S. S. "Viroses Respiratórias". In: **Introdução a virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 119-120.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Global epidemiology of influenza: past and present. **Annu. Rev. Med.**, v. 51, p. 407-421, 2000.

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.

CUNHA, S. S.; CAMACHO, L. A. B.; SANTOS, A. C. Imunização contra influenza no Brasil: Racionalidade e desafios. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, n. 1, p. 129-136, 2005.

DAUM, L. T.; CANAS, L. C.; SCHADLER, C. A.; UJIMORI, V. A.; HUFF, W. B.; BARNES, W. J.; LOHMAN, K. L. A rapid, single-step *multiplex* reverse transcription-PCR assay for the detection of human H1N1, H3N2, and B influenza viruses. **J. Clin. Virol.**, v. 25, p. 345-350, 2002.

de MELLO, W. A.; De PAIVA, T. M.; ISHIDA, M. A.; BENEGA, M. A.; DOS SANTOS, M. C.; VIBOUD, C.; MILLER, M. A.; ALONSO, W. J. The dilemma of influenza vaccine recommendations when applied to the tropics: the Brazilian case examined under alternative scenarios. **PLoS One**. v. 4, n.4, p. 5095, 2009.

DUARTE, P. A. D.; VENZAZZI, A.; YOUSSEF, N. C. M.; OLIVEIRA, M. C.; TANNOUS, L. A.; DUARTE, C. B.; GRION, C. M. C.; GERMANO, A.; SCHIAVETTO, P. M.; LINS, A. L. G. P.; CAMPOS, M. M. F.; MIÚRAI, C. K.; BREDT, C. S. O.; TOSO, L. C.; RÉA-NETO, A. Pacientes com infecção por vírus A (H1N1) admitidos em unidades de terapia intensiva do Estado do Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 21, n. 3, p. 231-236, 2009.

DWYER, D. E.; MCPHIE, K. A.; RATNAMOHAN, V. M.; PITMAN, C. N. Challenges for the laboratory before and during an influenza pandemic. **N. S. W. Public Health Bull.** v. 17, n. 9-10, p.142-145,2006.

ELLIS J. S.; FLEMING D. M; ZAMBON M. C. *Multiplex* reverse transcription PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2076-2082, 1997.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERREIRA, H. L.; LAMBRECHT, B.; van BORM, S.; TORRIERI-DRAMARD, L.; KLATZMANN, D.; BELLIER, B.; van den BERG, T. Identification of a dominant epitope in the hemagglutinin of an Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 clade 1 virus by selection of escape mutants. **Avian Dis.**, v. 54, p. 565-571, 2010.

FINKELMAN, B. S.; VIBOUD, C.; KOELLE, K.; FERRARI, M. J.; BHARTI, N. Grenfell 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.; CROW, M.; MINGAY, L. J.; DENG, T.; SHARPS, J.; FECHTER, P.; BROWNLEE, G. G. 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.; HALKER E.; SANTOS V. J.; PAIVA T. M.; TONIOLO NETO J. Influenza. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 2, p. 267-274, 2003.

FOUCHIER, R.; KUIKEN, T.; RIMMELZWAAN, G.; OSTERHAUS, A. Global task force for influenza. **Nature**, v. 26, n. 435, p. 419-420, 2005.

FRISBIE. B.; TANG, Y. W.; GRIFFIN, M.; POEHLING, K.; WRIGHT, P. F.; HOLLAND, K.; EDWARDS, K. M. Surveillance of childhood influenza virus infection: what is the best

diagnostic method to use for archival samples? **J. Clin. Microbiol.** v. 42, n. 3, p.1181-1184, 2004.

FURUSE, Y.; SUZUKI, A.; KAMIGAKI, T.; SHIMIZU, M.; FUJI, N.; OSHITANI, H. Reassortment between AmantadineResistant and -Sensitive H1N1 Influenza A Viruses Generated an Amantadine-Sensitive Virus during the 2007–2008 Season. **J. Clin. Microbiol.** v. 47, n.3 p. 841-844, 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.

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.

GRANATO, C. F. H.; BELLEI, N. C. J. As novas facetas e a ameaça da gripe aviária no mundo globalizado. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 4, p. 245-249, 2007.

HALE, B. G.; RANDALL, R. E.; ORTÍN, J.; JACKSON, D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. Review. **J. Gen. Virol.**, v. 89, n. 10, p. 2359-2376, 2008.

HE, J.; BOSE, M. E.; BECK, E. T.; FAN, J.; TIWARI, S.; METALLO, J.; JURGENS, L. A.; KEHL, S. C.; LEDEBOER, N.; KUMAR, S.; WEISBURG, W.; HENRICKSON, K. J. Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1 (human), N1 (animal), N2, and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009 outbreak in Milwaukee, Wisconsin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n.9, p. 2772-2778, 2009.

HERRMANN, B.; LARSSON, C.; ZWEYGBERG, B. W. Simultaneous detection and typing of influenza of influenza viruses A and B by a *nested* reverse transcription PCR: Comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 134-138, 2001.

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

IBIAPINA, C. C.; COSTA, G. A.; FARIA, A. C. Influenza A aviária (H5N1) – A gripe do frango. **J. Bras. Pneumol.**, v. 31, n. 5, p. 436-444, 2005.

IZURIETA, H. S.; THOMPSON, W. W.; KRAMARZ, P.; SHAY, D. K.; DAVIS, R. L.; DESTEFANO, F.; BLACK, S.; SHINEFIELD, H.; FUKUDA, K. Influenza and the rates of

hospitalization for respiratory disease among infants and young children. **N. Engl. J. Med.** v. 342, n.4, p.232-239, 2000.

JAWETZ, MELNICK & ADELBERG. Ortomixovírus (Vírus da Influenza). In: BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 24. ed. São Paulo: Mc Graw Hill, 2009. p. 533-545.

JIAN, J. W.; LAI, C. T.; KUO, C. Y.; KUO, S. H.; HSU, L. C.; CHEN, P. J.; WU, H. S.; LIU, M. T. Genetic analysis and evaluation of the reassortment of influenza B viruses isolated in Taiwan during the 2004-2005 and 2006-2007 epidemics. **Virus Res.** v. 131, n.2, p.243-249, 2008.

KAMPS, B. S.; HOFFMANN, C.; PREISER, W. Influenza report, 2006. Available from: <<http://www.influenzareport.com/>> Acesso em: 10 out. 2010.

KIM, Y. K.; NYAMBAT, B.; HONG, Y. S.; LEE, C. G.; LEE, J. W.; KILGORE, P. E. Burden of viral respiratory disease hospitalizations among children in a community of Seoul, Republic of Korea, 1995 - 2005. **Scand. J. Infect. Dis.** v. 40, n.11-12, p. 946-953, 2008

LAMB, R. A.; CHOPPIN, P. W. Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. **Virology**, v. 74, n. 2, p. 504-519, 1976.

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

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

LEE, M. S.; CHEN, J. S. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 10, p. 8, 2004.

LI, M. L.; RAO, P.; KRUG, R. M. The active sites of the Influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. **EMBO J.**, v. 17, n. 19, p. 5844-5852, 1998.

LIU, J. H.; OKAZAKI, K.; SHI, W. N.; KIDA, H. Phylogenetic analysis of hemagglutinin and neuraminidase genes of H9N2 viruses isolated from migratory ducks. **Virus Genes**, v. 27, p. 291-296, 2003.

LONGINI JR, I. M.; HALLORAN, M. E.; NIZAM, A.; YANG, Y. Containing pandemic influenza with antiviral agents. **Am. J. Epidemiol.**, v. 159, n. 7, p. 623-633, 2004.

LOWEN, A. C.; MUBAREK, S.; STEEL, J.; PALESE, P. Influenza vírus transmission is dependent on relative humidity and temperature. **PLoS Pathog.**, v. 3, p. 1470-1476, 2006.

LOWEN, A.; PALESE, P. Transmission of influenza virus in temperate zones is predominantly by aerosol, in the tropics by contact: a hypothesis. **PLoS Curr.**, v. 1, p. 1002, 2007.

MACHADO, A. A. Infecção pelo vírus Influenza A (H1N1) de origem suína: como reconhecer, diagnosticar e prevenir. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 5, p. 464-469, 2009.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real time PCR in virology. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MARTÍN-BENITO, J. AREA, E.; ORTEGA, J.; LLORCA, O.; VALPUESTA, J. M.; CARRASCOSA, J. L.; ORTÍN, J. Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza vírus ribonucleoprotein particle. **EMBO Rep.**, v. 2, n. 4, p. 313-317, 2001.

MARTINS, N. R. S. Influenza Aviária: Uma Revisão dos Últimos Dez Anos. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 3, n. 2, p. 97-140, 2001.

MATHISEN, M.; STRAND, T. A.; SHARMA, B. N.; CHANDYO, R. K.; VALENTINER-BRANTH, P.; BASNET, S.; ADHIKARI, R. K.; HVIDSTEN, D.; SHRESTHA, P. S.; SOMMERFELT, H. Clinical presentation and severity of viral community-acquired pneumonia in young Nepalese children. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v. 29, n.1, p. 1-6. 2010.

MELIDOU, A.; EXINDARI, M.; GIOULA, G.; CHATZIDIMITRIOU, D.; PIERROUTSAKOS, Y.; DIZA-MATAFTSI, E. Molecular and phylogenetic analysis and vaccine strain match of human influenza A(H3N2) viruses isolated in Northern Greece between 2004 and 2008. **Virus Res.** v. 145, n. 2, p.220-226, 2009.

MIYAO, 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.

MONTO A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. **Am. J. Med.** v. 112, p. 4-12, 2002.

MOURA, F. E. A. Influenza in the tropics. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 23, n. 5, p. 415-420, 2010.

MUÑOZ, E. T.; DEEM, M. W. Epitope analysis for influenza vaccine design. **Vaccine**, v. 23, n. 9, p. 1144-1148, 2005.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. Orthomyxovirus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (Ed.) *Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press, 2001.

NAYAK, D. P.; HUI, E. K.; BARMAN, S. Assembly and budding of Influenza virus. **Virus Res.**, v. 106, n. 2, p. 147-165, 2004.

NEUMANN, G.; HUGHES, M. T.; KAWAOKA, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. **Embo J.**, v. 19, n. 24, p. 6751-6758, 2000.

NEUZIL, K. M.; HOHLBEIN, C.; ZHU, Y. Illness among schoolchildren during influenza season: effect on school absenteeism, parenteral absenteeism from work, and secondary illness in families. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v. 156, p. 986-991, 2002.

NEUZIL, K. M.; WRIGHT, P. F.; MITCHEL, E. F. JR.; GRIFFIN, M. R. The burden of influenza illness in children with asthma and other chronic medical conditions. **J. Pediatr.**, v. 137, p. 856-864, 2000.

NICHOLLS, J. M.; CHAN, M. C.; CHAN, W. Y.; WONG, H. K.; CHEUNG, C. Y.; KWONG, D. L.; WONG, M. P.; CHUI, W. H.; POON, L. L.; TSAO, S. W.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. **Nat. Med.**, v.14, n. 2, p. 147-149, 2007.

NIETO, A.; DE LA LUNA, S.; BÁRCENA, J.; PORTELA, A.; ORTÍN, J. Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 29-36, 1994.

NJOUOM, R.; MBA, S. A.; NOAH, D. N.; GREGORY, V.; COLLINS, P.; CAPPY, P.; HAY, A.; ROUSSET, D. Circulation of human influenza viruses and emergence of Oseltamivir-resistant A(H1N1) viruses in Cameroon, Central Africa. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, p. 56, 2010.

OLIVEIRA Jr., J. G.; BELLUCI, M. S. P.; VIANNA, J. S. M.; MAZUR, C.; ANDRADE, C. M.; FEDULLO, L. P. L.; PORTZ, C.; LOUREIRO, B. O. Avaliação soroepidemiológica do vírus influenza em aves domésticas e silvestres no Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 3, p. 299-302, 2001.

OLIVEIRA, J. F.; SÁ, J. P. O.; CRUZ, M. E. M. Identificação e monitorização do vírus Influenza A e B, na população de Maceió. **Ciência e saúde coletiva**, v. 9, n. 1, p. 241-246, 2004.

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

PAIVA et al. Influenza virus surveillance by Institute Adolfo Lutz during 2006. In: XVII National Meeting of Virology, 2006, Campos do Jordão. **Abstracts...**São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 2006. p. 167-168, res. 165PP - FLU5.

PAIVA, T. M.; ISHIDA, M. A.; FORLÉO-NETO, E.; TONIOLO-NETO, J.; GONÇALVES, M. G.; BENEÇA, M.A.; HALKER, E.; CRUZ, A. S.; TAKIMOTO, S. Epidemiological study of influenza virus in Brazil from 1996-1998. **Virus Rev. Res.**, v. 5, n. 1, p. 51-63, 2000.

PALESE, P.; SHAW, M. L. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: **Fields Virology**. 5th ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 2007. Cap. 48.

PANDA, A.; ELANKUMARAN, S.; KRISHNAMURTHY, S.; HUANG, Z.; SAMAL, S. K. Loss of N-linked glycosylation from the hemagglutinin-neuraminidase protein alters virulence of Newcastle disease virus. **J. Virol.** v. 78, n. 10, p. 4965-4975, 2004.

PELTOLA, V.; ZIEGLER, T.; RUUSKANEN, O. Influenza A and B virus infections in children. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 299-305, 2003.

PLOIN, D.; GILLET, Y.; MORFIN, F.; FOUILHOUX, A.; BILLAUD, G.; LIBERAS, S.; DENIS, A.; THOUVENOT, D.; FRITZELL, B.; LINA, B.; FLORET, D. Influenza burden in febrile infants and young children in a pediatric emergency department. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v. 26, n.2, p.142-147, 2007.

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.

POEHLING, K. A.; POEHLING, K. A.; EDWARDS, K. M.; WEINBERG, G. A.; SZILAGYI, P.; STAAT, M. A.; IWANE, M. K.; BRIDGES, C. B.; GRIJALVA, C. G.; ZHU, Y.; BERNSTEIN, D. I.; HERRERA, G.; ERDMAN, D.; HALL, C. B.; SEITHER, R.; GRIFFIN, M. R. The Underrecognized Burden of Influenza in Young Children. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, p. 31-40, 2006.

PONTORIERO, A. V.; BAUMEISTER, E. G.; CAMPOS, A. M.; SAVY, V. L.; LIN, Y. P.; HAY, A. 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.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

RACANIELLO, V. **Virology Blog** – About Viruses and viral disease, 2009. Available from: <<http://www.virology.ws/2009/06/29/reassortment-of-the-influenza-virus-genome/>> Acesso em: 07 mar. 2011.

RAMBAUT, A.; CHARLESTON, M. Molecular evolution library university of Oxford, 2001. Available from: <<http://evolve.zoo.ox.ac.uk>> Acesso em: 30 out. 2010.

REINA, J.; ROS, M. J.; BLANCO, I.; MUNAR, M. Evaluation of a dot-blot ELISA method,

direct immunofluorescence, and Shell-vial culture for the detection of influenza vírus A in nasopharyngeal aspirates. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 14, n. 6, p. 397-398, 1996.

ROBB, N. C.; SMITH, M.; VREEDE, F. T.; FODOR, E. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. **J. Gen. Virol.**, v. 90, n. 6, p. 1398-1407, 2009.

ROBERTS, N. A. Treatment of influenza with neuraminidase inhibitors: virological implications. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 356, n. 1416, p. 1895-1897, 2001.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde (SES/SP). São Paulo, 2009a. Características dos casos notificados de Influenza A/H1N1. **Rev. Saúde Pública**, v. 43, n. 5, p. 900-904, 2009.

SÃO PAULO. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). São Paulo, 2009b. Informe epidemiológico – Influenza Pandêmica (H1N1) 2009. Edição 11, dezembro 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza_se_47.pdf> Acesso em: 04 nov. 2010.

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

SCHROEDER, C.; FORD, C. M.; WHARTON, S. A.; HAY, A. J. Functional reconstitution in lipid vesicles of influenza virus M2 protein expressed by baculovirus: evidence for proton transfer activity. **J. Gen. Virol.**, v. 12, p. 3477-3484, 1994.

SIMONSEN, L.; VIBOUD, C.; TAYLOR, R. J. Effectiveness of influenza vaccination. **N Engl. J. Med.** v. 357, n.26, p. 2729-2730, 2007.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DO PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES (SI-PNI). Estratégia de vacinação contra Influenza Pandêmica (H1N1) Iniciada em 08/03/2010, 2010. Disponível em: <http://pni.datasus.gov.br/consulta_h1n1_10_selecao.asp?naofechar=N&enviar=ok&grupo=todos&faixa=todos&sel=vacinometro> acesso em: 30 out. 2010.

SKEHEL, J.; WILEY, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 531-569, 2000.

SMITH, A. E.; HELENIUS, A. How viruses enter animal cells. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 237-242, 2004.

SMITH, D. J.; LAPEDES, A. S.; DE JONG, J. C.; BESTEBROER, T. M.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. **Science**, v. 305, p. 371-376, 2004.

STEINHAUER, D. A.; SKEHEL, J. J. Genetics of influenza viruses. **Annu. Rev. Genet.**, v. 36, p. 305-332, 2002.

STOCKTON, J.; ELLIS, J. S.; SAVILLE, M.; CLEWLEY, J. P.; ZAMBON, M. C. *Multiplex* PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2990-2995, 1998.

SUGAYA, N. MITAMURA, K.; NIRASAWA, M.; TAKAHASHI, K. The impact of winter epidemics of influenza and respiratory syncytial virus on pediatric admissions to an urban general hospital. **J. Med. Virol.**, v. 60, p. 102-106, 2000.

SUOMALAINEN, M. Lipid rafts and assembly of enveloped viruses. **Traffic**, v. 3, n. 10, p. 705-709, 2002

SUWANNAKARN, K.; CHIEOCHANSIN, T.; THONGMEE, C.; MAKKOCH, J.; PRAIANANTATHAVORN, K.; THEAMBOONLERS, A.; SREEVATSAN, S.; POOVORAWAN, Y. Molecular evolution of human H1N1 and H3N2 influenza A virus in Thailand, 2006-2009. **PLoS One**. v. 5, n.3, p. 9717, 2010.

SWOFFORD, D. L. **PAUP* - phylogenetic analysis using parsimony (*and others methods)**. Version 4. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates, 1998.

TAMURA, D.; MITAMURA, K.; YAMAZAKI, M.; FUJINO, M.; NIRASAWA, M.; KIMURA, K.; KISO, M.; SHIMIZU, H.; KAWAKAMI, C.; HIROI, S.; TAKAHASHI, K.; HATA, M.; MINAGAWA, H.; KIMURA, Y.; KANEDA, S.; SUGITA, S.; HORIMOTO, T.; SUGAYA, N.; KAWAOKA, Y. Oseltamivir-resistant influenza A viruses circulating in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 1424-1472, 2009.

TAUBENBERGER, J. K.; REID, A. H.; LOURENS, R. M.; WANG, R.; JIN, G.; FANNING, T. G. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. **Nature**, v. 437, p. 889-893, 2005.

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

TONIOLO-NETO, J. **Dia de vacinação do idoso e Projeto Vigigripe:** conjunto de medidas interativas para a prevenção da influenza e suas complicações. 2001. 169 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2001.

TREANOR, J. J.; HAYDEN, F. G.; VROOMAN, P. S.; BARBARASH, R.; BETTIS, R.; RIFF, D.; SINGH, S.; KINNERSLEY, N.; WARD, P.; MILLS, R. G. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza. **JAMA**, v. 283, p. 1016-1024, 2000.

TSUCHIYA, L. R.; COSTA, L. M.; RABONI, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; PEREIRA, L. A.; ROTTA, I.; TAKAHASHI, G. R.; COELHO, M.; SIQUEIRA, M. M. Viral respiratory infection in Curitiba, Southern Brazil. **J. Infect.** v. 51, n.5, p. 401-407, 2005.

VEDOVELLO, D. **Deteção, 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.

VERRASTRO, C. G. Y.; DE ABREU, L. J.; HITOMI, D. Z.; ANTONIO, E. P.; NEVES, R. A.; D'Ippolito, G. Manifestações da infecção pelo novo vírus influenza A (H1N1) na tomografia computadorizada de tórax. **Radiol. Bras.**, v. 42, n. 6, p. 343-348, 2009.

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

VIDAL, L. R. R.; SIQUEIRA, M. M.; NOGUEIRA, M. B.; RABONI, S. M.; PEREIRA, L. A.; TAKAHASHI, G. R. A.; ROTTA, I.; DEBUR, M. C.; DALLA-COSTA, L. M. The epidemiology and antigenic characterization of influenza viruses isolated in Curitiba, South Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 180-185, 2008.

VIEIRA, S. E.; STEWIEN, K. E.; DURIGON, E. L.; TOROK, T. J.; ANDERSON, L. J.; MIYAO, C. R.; HEIN, N.; BOTOSSO, V. F.; PAHL, M. M.; GILIO, A. E.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 43, p. 125-131, 2001.

WAGNER, R.; WOLFF, T.; HERWIG, A.; PLESCHKA, S.; KLENK, H. D. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. **J. Virol.**, v. 74, n. 14, p. 6316-6323, 2000.

WANG, S. F.; LEE, Y. M.; CHAN, Y. J.; LIU, H. F.; YEN, Y. F.; LIU, W. T.; HUANG, J. C.; CHEN, Y. M. Influenza A virus in Taiwan, 1980-2006: Phylogenetic and antigenic characteristics of the hemagglutinin gene. **J. Med. Virol.** v. 81, n. 8, p. 1457-1470, 2009.

WEBER, F.; KOCHS, G.; GRUBER, S.; HALLER, O. A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. **Virology**, v. 250, n. 1, p. 9-18, 1998.

WEBSTER, R. G.; HINSHAW, V. S.; BEAN, W. J.; SRIRAM, G. Influenza viruses: transmission between species. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 1980 v. 288, n. 1029, p. 439-447.

WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G.; REISINGER, K. S.; YOUNG, N.; DUTKOWSKI, R.; IPE, D.; MILLS, R. G.; WARD, P. Oral oseltamivir treatment of influenza in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 20, n. 2, p. 127-133, 2001.

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, p. 373-378, 1981.

WILSON, I. A.; COX, N. J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 737-787, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Acute Respiratory Infections, update September 2009, 2009a. Available from <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index1.html> Acesso em: 28 out. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Avian Influenza: Responding to the Pandemic Threat, 2009, 2009b. Available from <http://www.searo.who.int/LinkFiles/Avian_Flu_influenza_vaccine_development.pdf> Acesso em: 20 out. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Alert and Response (GAR) - Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO, 18 outubro 2010. 2010d. Available from <http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_10_18/en/index.html> Acesso em: 04 nov. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Influenza update - 06 May 2011, WHO 2011. Available from <http://www.who.int/csr/disease/influenza/latest_update_GIP_surveillance/en/index.html> Acesso em: 05 abr. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortant derived from avian influenza viruses, 2003. Available from <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/influenzaRMD2003_5.pdf> Acesso em: 8 abr. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2011 southern hemisphere influenza season, 2011a. Available from <<http://www.who.int/csr/disease/influenza/recommendations2011south/en/index.html>> Acesso em: 05 abr. 2011.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WER**, v. 75, p. 281-288, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Declares H1N1 Pandemic Over, Urges Continued Influenza Vigilance, 2010a. Available from <http://new.paho.org/sur/index.php?option=com_content&task=view&id=195&Itemid=400> Acesso em: 28 out. 2010.

WRIGHT, K. E.; WILSON, G. A. R.; NOVOSAD, D.; DIMOCK, C.; TAN, D.; WEBER, J. M. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1180-1184, 1995.

XIU, W.; WEN, Y.; SHEN, X.; XIE, J., YANG, S., WU, B., WANG, M. Molecular evolution of influenza A (H3N2) viruses circulated in Fujian Province, China during the 1996 – 2004 period. **Sci. China Ser. C-Life Sci.**, v. 51, n. 4, p. 373-380, 2008.

YANG, H.; CARNEY, P.; STEVENS, J. Structure and Receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin. **PLoS Curr. Influenza**, v. 3, p. 1152, 2010.

ZAMBON, M.; POTTER, C. W Influenza. In: ZUCKERMAN, A. J.; BANATVALA, J. E.; SCHOUB, B. D.; GRIFFITHS, P. D.; MORTIMER, P. **Principles & Practice of Clinical Virology**. 6th ed. Oxford: Wiley-BlackWell, 2009. p. 373-396.

ZELL, R.; BERGMANN, S.; KRUMBHOLZ, A.; WUTZLER, P.; DÜRRWALD, R. Ongoing evolution of swine influenza viruses: a novel reassortant. **Arch. Virol.**, v. 153, n. 11, p. 2085-2092, 2008.

ZOU, S.; STANSFIELD, C. BRIDGE, J. Identification of new influenza B virus variants by *multiplex* reverse transcription PCR and the heteroduplex mobility assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 1544-1548, 1998.

Anexos

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menores de 18 anos)

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

**ESTUDO: Diversidade genética da Hemaglutinina (HA) de vírus Influenza A,
entre 1995 e 2006**

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 da Hemaglutinina (HA) de vírus Influenza A, entre 1995 e 2006”. 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 3091-7200 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 - Multiplex RT-PCR para subtipagem das amostras positivas para *Influenzavirus A.*

Primers complementares aos genes que codificam as proteínas HA (H1, H3) e NA (N1 e N2) foram utilizados para a realização da subtipagem do *Influenzavirus A* pela *multiplex* RT-PCR, conforme descrito por Vedovello (2006) e modificada por Durigan (2009). A localização dos *primers* no genoma viral, a polaridade, a sequência de nucleotídeos 5'-3' e o tamanho do produto amplificado estão descritas na tabela A1.

Quadro B.1 - Relação dos *primers* utilizados na *multiplex* RT-PCR, sua localização no genoma, e tamanho do produto amplificado.

<i>Primer</i>	Subtipo	Sequência de nucleotídeos	Localização no genoma	Produto amplificado
H114*	H1	CTT AGT CCT GTA ACC ATC CT	1040-1021	350 pb
H111*		CAC CCC AGA AAT AGC CAA AA	688-708	
H13R*	H3	GCA TAG TCA CGT TCA ATG CTG	503-485	220 pb
H38*		CAG CAA AGC YTA CAG CAA CTG T	347-366	
N1R**	N1	TCT GTC CAT CCA TTA GGA TCC	1157-1137	427 pb
N1F**		ACC ATA ATG ACC GAT GGC CC	730-749	
N12R1**	N2	AGC ACA CAT AAC TGG AAA CAT TG	972-953	176 pb
N12F**		GGA AAA TCG TTC ATA TTA GCA CA	796-818	

* *Primers* desenhados por Durigan (2009).

** *Primers* desenhados por Vedovello (2006).

A *multiplex* RT-PCR foi feita utilizando 2,5 µL do cDNA diluído em tampão de reação (75 mM Tris-HCl [pH 9]; 2 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄), (*Biotools*), 0,4 mM de dNTPs, 10 pmoles de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA *polymerase* (*Biotools*) e água ultra PURE (*Gibco*TM), totalizando um volume de 25 µL.

A amplificação foi feita em termociclador *Eppendorf Mastercycler Personal*, a 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos compostos de 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 1 minuto a 58 °C (com rampa de 1 °C por segundo) para hibridização dos *primers* e 1 minuto a 72 °C para extensão das cadeias. A extensão final foi obtida a 72 °C por 10 minutos.

ANEXO C - Tabelas de resultados

Tabela C.1 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da hemaglutinina e respectivos fragmentos amplificados. Os *amplicons* seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco.

<i>Influenzavirus A H1N1</i>	<i>Primers e produto amplificado</i>			
	H14 e H114		H110 e H2	
Brasil_63_2001	1040 pb		739 pb	
Brasil_65_2001	1040 pb		739 pb	
<i>Influenzavirus A H1N1</i>	<i>Primers e produto amplificado</i>			
	HAfwd e HA2	HA3 e HA4	HA5 e HA-6	HA7 e HA-rev
Brasil_165_2000	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_63_2001	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_65_2001	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_265_2003	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_789_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_840_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_854_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_933_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_994_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb

Tabela C.2 - Relação de amostras submetidas à amplificação do gene da hemaglutinina e respectivos fragmentos amplificados. Os *amplicons* seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco.

<i>Influenzavirus</i> A H3N2	<i>Primers</i> e produto amplificado	
	H33+H34 e H315	H310 e H2
Brasil_34_1995	1056 pb*	841 pb
Brasil_60_1995	1056 pb*	841 pb*
Brasil_60_1996	1056 pb	841 pb
Brasil_143_1996	Negativo	841 pb
Brasil_202_1996	1056 pb*	841 pb*
Brasil_41_1997	1056 pb	841 pb
Brasil_49_1997	1056 pb*	841 pb*
Brasil_45_1998	Negativo	841 pb
Brasil_62_1998	1056 pb*	841 pb
Brasil_63_1998	1056 pb	841 pb
Brasil_64_1998	1056 pb	841 pb
Brasil_71_1998	1056 pb	841 pb
Brasil_73_1998	1056 pb	841 pb
Brasil_121_1999	1056 pb*	841 pb*
Brasil_93_2000	1056 pb	841 pb
Brasil_101_2000	1056 pb*	841 pb*
Brasil_98_2001	Negativo	841 pb
Brasil_120_2001	1056 pb*	841 pb*
Brasil_126_2001	1056 pb*	841 pb*
Brasil_154_2003	1056 pb	841 pb
Brasil_182_2003	1056 pb	841 pb
Brasil_194_2003	1056 pb*	841 pb*
Brasil_199_2003	Negativo	841 pb
Brasil_206_2003	1056 pb*	841 pb*
Brasil_211_2003	1056 pb*	841 pb
Brasil_213_2003	1056 pb*	841 pb*
Brasil_216_2003	1056 pb*	841 pb
Brasil_218_2003	1056 pb*	841 pb
Brasil_246_2003	1056 pb	841 pb
Brasil_49_2004	1056 pb*	841 pb
Brasil_70_2004	1056 pb*	841 pb*
Brasil_92_2004	1056 pb	841 pb
Brasil_95_2004	1056 pb*	841 pb
Brasil_337_2004	Negativo	841 pb
Brasil_340_2004	Negativo	841 pb
Brasil_75_2005	1056 pb*	841 pb
Brasil_84_2005	1056 pb*	841 pb
Brasil_143_2005	1056 pb	841 pb
Brasil_197_2005	1056 pb*	841 pb
Brasil_211_2005	1056 pb*	841 pb*
Brasil_270_2005	1056 pb*	841 pb
Brasil_300_2005	Negativo	841 pb
Brasil_302_2005	Negativo	841 pb
Brasil_306_2005	1056 pb	841 pb
Brasil_315_2005	Negativo	841 pb
Brasil_336_2005	Negativo	841 pb
Brasil_339_2005	Negativo	841 pb

amostras negativas quando submetidas a amplificação utilizando os *primers* H310/H2, H33+H34/ H315 e H38/315

Tabela C.3 - Relação de amostras submetidas à amplificação utilizando os *primers* HAFwd e HA2, HA3 e HA4, HA5 e HA-6, HA7 e HA-rev para amplificação do gene da hemaglutinina e respectivos fragmentos amplificados. Os *amplicons* seqüenciados estão representados em negrito com um asterisco.

<i>Influenza A H3N2</i>	<i>Primers e produto amplificado</i>			
	HAFwd e HA2	HA3 e HA4	HA5 e HA-6	HA7 e HA-rev
Brasil_61_1998	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb
Brasil_60_1999	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_78_1999	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_16_1999	500 pb	500 pb*	500 pb*	500 pb
Brasil_97_2001	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_120_2001	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_126_2001	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_105_2002	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_137_2002	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_44_2004	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_61_2004	500 pb*	500 pb*	500 pb	500 pb
Brasil_135_2004	500 pb*	500 pb*	500 pb	500 pb
Brasil_72_2005	500 pb*	500 pb*	500 pb*	500 pb*
Brasil_189_2005	500 pb*	500 pb*	500 pb	500 pb
Brasil_267_2005	500 pb*	500 pb*	500 pb	500 pb
Brasil_791_2006	500 pb*	Negativo	Negativo	500 pb
Brasil_872_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_877_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_891_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_899_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_903_2006	500 pb	Negativo	Negativo	500 pb
Brasil_939_2006	500 pb	Negativo	Negativo	500 pb
Brasil_946_2006	500 pb	500 pb	500 pb	500 pb
Brasil_956_2006	500 pb	Negativo	Negativo	500 pb
Brasil_972_2006	500 pb*	500 pb	500 pb	Negativo
Brasil_979_2006	500 pb*	500 pb*	500 pb*	Negativo
Brasil_988_2006	500 pb*	Negativo	500 pb*	Negativo
Brasil_999_2006	500 pb	500 pb	Negativo	Negativo
Brasil_1001_2006	500 pb	500 pb*	500 pb*	Negativo
Brasil_1015_2006	500 pb	500 pb	500 pb*	500 pb*

amostras negativas quando submetidas a amplificação utilizando os *primers* H39/H2, H310/H2, H33+H34/H315 e H38/315

Tabela C.4 Distribuição das amostras sequenciadas de *Influenzavirus A* subtipo H3N2, número de nucleotídeos e região compreendida.

Amostras	Nº de Nucleotídeos Sequenciados	Nucleotídeos Compreendidos
Brasil_101_2000	958	49 à 1007
Brasil_93_2000	1626	78 à 1704
Brasil_120_2001	1245	375 à 1620
Brasil_126_2001	1557	60 à 1617
Brasil_97_2001	1244	376 à 1620
Brasil_105_2002	1328	405 à 1733
Brasil_137_2002	1664	60 à 1724
Brasil_194_2003	1558	57 à 1615
Brasil_206_2003	933	1 à 933
Brasil_211_2003	702	251 à 953
Brasil_213_2003	1543	60 à 1603
Brasil_216_2003	748	198 à 946
Brasil_218_2003	626	307 à 934
Brasil_135_2004	933	1 à 933
Brasil_44_2004	1665	49 à 1714
Brasil_49_2004	934	1 à 934
Brasil_61_2004	811	1 à 811
Brasil_70_2004	1660	60 à 1720
Brasil_95_2004	947	1 à 947
Brasil_189_2005	896	49 à 945
Brasil_197_2005	929	1 à 929
Brasil_211_2005	1286	57 à 1343
Brasil_267_2005	904	63 à 967
Brasil_270_2005	903	18 à 921
Brasil_72_2005	1637	54 à 1691
Brasil_75_2005	865	17 à 882
Brasil_84_2005	812	1 à 812
Brasil_791_2006	458	31 à 489
Brasil_972_2006	458	31 à 489
Brasil_979_2006	1586	110 à 1696
Brasil_34_1995	530	358 à 888
Brasil_60_1995	1538	95 à 1633
Brasil_202_1996	676	944 à 1620
Brasil_49_1997	1266	421 à 1689
Brasil_61_1998	1339	49 à 1388
Brasil_62_1998	931	23 à 954
Brasil_16_1999	597	1013 à 1610
Brasil_121_1999	1552	61 à 1613
Brasil_78_1999	1592	79 à 1671

ANEXO D – Relação das amostras utilizadas no trabalho

Tabela D.1 – Distribuição das amostras positivas na *Duplex* RT-PCR utilizadas com idade e sexo da criança, procedência da amostra colhida e tipo do vírus Influenza.

Número da amostra / ano	Idade (meses)	Sexo	Procedência	Tipagem
34/1995	3	Masculino	Enfermaria	Flu A
60/1995	12	Feminino	Enfermaria	Flu A
50/1996	2	Feminino	Enfermaria	Flu A
60/1996	36	Masculino	Enfermaria	Flu A
143/1996	144	Masculino	Enfermaria	Flu A
181/1996	24	Masculino	Enfermaria	Flu A
202/1996	1	Feminino	Enfermaria	Flu A
41/1997	5	Feminino	UTI	Flu A
49/1997	5	Masculino	Enfermaria	Flu A
55/1997	7	Feminino	Enfermaria	Flu A
2/1998	9	Masculino	Enfermaria	Flu A
45/1998	7	Feminino	Enfermaria	Flu A
61/1998	3	Feminino	Enfermaria	Flu A
62/1998	10	Feminino	Enfermaria	Flu A
63/1998	1	Feminino	PA	Flu A
64/1998	11	Feminino	Enfermaria	Flu A
66/1998	23 dias	Desconhecido	Enfermaria	Flu A
71/1998	4	Feminino	UTI	Flu A
73/1998	11	Feminino	Enfermaria	Flu A
50/1999	2	Feminino	Enfermaria	Flu A
60/1999	9	Masculino	Enfermaria	Flu A
78/1999	8	Masculino	Enfermaria	Flu A
116/1999	11	Masculino	Enfermaria	Flu A
121/1999	5	Masculino	Enfermaria	Flu A
93/2000	ND	Masculino	Enfermaria	Flu A
101/2000	ND	Masculino	ND	Flu A
144/2000	ND	Masculino	ND	Flu A
165/2000	ND	Masculino	ND	Flu A
63/2001	4	Masculino	ND	Flu A
65/2001	21 dias	Masculino	ND	Flu A
80/2001	48	Masculino	ND	Flu A
81/2001	36	Masculino	ND	Flu A
95/2001	4	Masculino	ND	Flu A
96/2001	2	Masculino	ND	Flu A
97/2001	7	Feminino	ND	Flu A
98/2001	3	Masculino	ND	Flu A
120/2001	12	Masculino	ND	Flu A
126/2001	4	Feminino	ND	Flu A
105/2002	3	Masculino	ND	Flu A
135/2002	ND	Masculino	ND	Flu B
142/2002	4	Feminino	ND	Flu B
143/2002	12	Masculino	ND	Flu B
137/2002	10	Masculino	ND	Flu A
154/2003	24	Feminino	Enfermaria	Flu A
182/2003	7	Feminino	Enfermaria	Flu A

Tabela D.1 – Distribuição das amostras positivas na *Duplex* RT-PCR utilizadas com idade e sexo da criança, procedência da amostra colhida e tipo do vírus Influenza

Número da amostra / ano	Idade (meses)	Sexo	Procedência	Tipagem
194/2003	24	Feminino	PA	Flu A
199/2003	36	Feminino	PA	Flu A
206/2003	1	Feminino	Enfermaria	Flu A
211/2003	8	Feminino	PA	Flu A
213/2003	7	Feminino	PA	Flu A
216/2003	24	Masculino	Enfermaria	Flu A
218/2003	24	Masculino	Enfermaria	Flu A
246/2003	6	Feminino	PA	Flu A
253/2003	3	Feminino	PA	Flu A
260/2003	26 dias	Feminino	Enfermaria	Flu A
265/2003	ND	Feminino	UTI	Flu A
304/2003	8	Feminino	UTI	Flu A
16/2004	36	Feminino	Enfermaria	Flu A
17/2004	12	Feminino	Enfermaria	Flu A
30/2004	8	Masculino	Enfermaria	Flu A
37/2004	5	Feminino	Enfermaria	Flu A
41/2004	4	Masculino	PA	Flu A
44/2004	10	Masculino	PA	Flu A
49/2004	2	Masculino	PA	Flu A
53/2004	12	Feminino	PA	Flu A
55/2004	2	Feminino	Enfermaria	Flu A
60/2004	12	Masculino	Enfermaria	Flu A
61/2004	12	Masculino	Enfermaria	Flu A
64/2004	5	Masculino	PA	Flu A
70/2004	24	Masculino	Enfermaria	Flu A
92/2004	4	Feminino	UTI	Flu A
95/2004	24	Masculino	PA	Flu A
135/2004	12	Feminino	UTI	Flu A
334/2004	1	Feminino	Enfermaria	Flu A
337/2004	9	Feminino	Enfermaria	Flu A
340/2004	1	Feminino	UTI	Flu A
311/2004	12	Feminino	PA	Flu B
333/2004	12	Feminino	Enfermaria	Flu B
370/2004	2	Masculino	Enfermaria	Flu B
376/2004	12	Masculino	Enfermaria	Flu B
383/2004	3	Masculino	Enfermaria	Flu B
400/2004	5	Feminino	Enfermaria	Flu B
408/2004	5	Feminino	Enfermaria	Flu B
419/2004	6	Masculino	Enfermaria	Flu B
438/2004	24	Masculino	Enfermaria	Flu B
72/2005	7	Masculino	PA	Flu A
75/2005	12	Feminino	UTI	Flu A
84/2005	8	Masculino	UTI	Flu A
143/2005	19d	Masculino	Berçário	Flu A
189/2005	7	Masculino	UTI	Flu A
197/2005	2	Feminino	Enfermaria	Flu A

Tabela D.1 – Distribuição das amostras positivas na *Duplex* RT-PCR utilizadas com idade e sexo da criança, procedência da amostra colhida e tipo do vírus Influenza

Número da amostra / ano	Idade (meses)	Sexo	Procedência	Tipagem
198/2005	9	Feminino	PA	Flu A
211/2005	4	Feminino	PA	Flu A
226/2005	12	Masculino	Enfermaria	Flu A
230/2005	12	Masculino	PA	Flu A
267/2005	6	Masculino	Enfermaria	Flu A
270/2005	8	Masculino	Enfermaria	Flu A
300/2005	4	Masculino	UTI	Flu A
302/2005	6	Masculino	PA	Flu A
306/2005	10	Feminino	UTI	Flu A
315/2005	10	Feminino	UTI	Flu A
336/2005	1	Feminino	Enfermeira	Flu A
339/2005	1	Masculino	Enfermeira	Flu A
789/2006	1	Feminino	PA	Flu A
791/2006	4,11	Feminino	Enfermaria	Flu A
840/2006	7	Feminino	Enfermaria	Flu A
842/2006	24	Feminino	Enfermaria	Flu A
854/2006	11	Masculino	Enfermaria	Flu A
859/2006	3	Masculino	Enfermaria	Flu A
864/2006	2	Masculino	Enfermaria	Flu A
872/2006	2	Masculino	Berçário	Flu A
875/2006	27d	Feminino	Berçário	Flu A
877/2006	1	Masculino	Enfermaria	Flu A
891/2006	25d	Masculino	Berçário	Flu A
899/2006	6	Masculino	Enfermaria	Flu A
903/2006	3	Masculino	Enfermaria	Flu A
933/2006	2	Masculino	Enfermaria	Flu A
939/2006	12	Masculino	Enfermaria	Flu A
946/2006	4	Masculino	UTI	Flu A
956/2006	12	Feminino	Enfermaria	Flu A
972/2006	4	Masculino	UTI	Flu A
979/2006	4	Feminino	PA	Flu A
988/2006	8	Masculino	UTI	Flu A
994/2006	36	Feminino	PA	Flu A
999/2006	12	Masculino	Enfermaria	Flu A
1001/2006	2	Feminino	PA	Flu A
1015/2006	9	Feminino	Enfermaria	Flu A
1007/2006	1	Masculino	UTI	Flu B
1082/2006	5	Feminino	PA	Flu B
1297/2006	10	Masculino	Enfermaria	Flu B
1113/2006	9,8	Masculino	Enfermaria	Flu B
1026/2006	12	Feminino	ND	Flu A

* ND: não disponível

ANEXO E – Distribuição das amostras positivas durante os anos de 1995 a 2006

Tabela E.1 – Distribuição por mês das amostras positivas para o *Influenzavirus* A e B durante os anos de 1995 a 2006.

	Janeiro		Fevereiro		Março		Abril		Maio		Junho		Julho		Agosto		Setembro		Outubro		Novembro		Dezembro		
	IA	IB	IA	IB	IA	IB	IA	IB	IA	IB	IA	IB	IA	IB	IA	IB	IA	IB	IA	I B	IA	I B	IA	I B	
1995									1		1														
1996											1		2		2										
1997											1		2												
1998							1				1		7												
1999											2		1		2										
2000											1		1		1		1								
2001																	1		2		5		1		2
2002											1		1	3											
2003									2		8		3		1										
2004	2		4		9		1						3	2		2			3			1		1	
2005						3		6		6		6		3											
2006						9				13		3	2								1		1		