

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: Paola Cristina Resende Silva

Análise filogenética e padronização da técnica de Eletroforese em gel com gradientes desnaturantes (DGGE) para caracterização das linhagens do vírus Influenza B identificadas durante as epidemias de 2004 a 2008.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Marilda Mendonça Agudo de Teixeira Siqueira

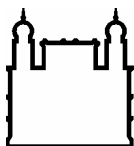
RIO DE JANEIRO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTORA: Paola Cristina Resende Silva

Análise filogenética e padronização da técnica de Eletroforese em gel com gradientes desnaturantes (DGGE) para caracterização das linhagens do vírus Influenza B identificadas durante as epidemias de 2004 a 2008.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Marilda Mendonça Agudo de Teixeira Siqueira

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Fernando Couto Motta - **Presidente**
Prof. Dr. José Nelson Couceiro
Prof. Dra. Ana Maria Bispo de Filippis
Prof. Dra. Márcia Leite Baptista
Prof. Dra. Maria de Lourdes Aguiar Oliveira

Rio de Janeiro, 25 de agosto de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar e estar comigo em todos os momentos da minha vida;

À minha querida orientadora, Dra. Marilda Mendonça Siqueira, por ter me dado a oportunidade de trabalhar ao seu lado. Hoje não tenho dúvidas que fiz a escolha certa. Obrigada por todo empenho, sabedoria, compreensão no decorrer destes anos e, acima de tudo, pela amizade;

Ao Dr. Fernando Couto Motta pela amizade e imenso profissionalismo. Obrigada por me ensinar a trabalhar com biologia molecular, e especialmente por toda ajuda neste trabalho, suas sugestões foram imprescindíveis para que o concluíssemos;

A Dra. Maria de Lourdes minha querida revisora, que fez um excelente trabalho, teve toda paciência e extrema dedicação durante toda a revisão. Obrigada pela amizade e palavras de apoio e incentivo;

À minha família, especialmente aos meus pais, Edna e Dilson, por terem sido o contínuo apoio nestes dois anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores;

Ao meu namorado André um grande companheiro nesta trajetória, que soube compreender, como ninguém, minha ausência e a importância da fase pela qual estava passando;

A toda equipe do Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), pelo convívio diário, apoio e grande amizade;

Ao curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, em especial: aos coordenadores, Dra. Alda e Dr. Márcio Bóia, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, e realização profissional e pessoal;

A todo ilustríssimo corpo docente, que me ensinaram de forma maravilhosa a epidemiologia, diagnóstico e controle das doenças infecciosas e parasitárias presentes nas regiões tropicais;

A todos da secretaria do Ensino, principalmente as secretárias Michele e Cláudia pelo pronto atendimento e atenção sempre que precisei;

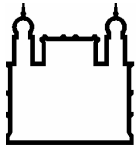
A todos os meus colegas da Pós-Graduação em Medicina Tropical, em especial aos amigos da turma do segundo semestre de 2008;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante os dois anos do curso.

E finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pós-graduação.

“... De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos começando;
a certeza de que é preciso continuar; e
a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.
Façamos da interrupção um caminho novo;
da queda, um passo de dança;
do medo, uma escada;
do sonho, uma ponte;
da procura, um encontro...”

O encontro Marcado - Fernando Sabino



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise filogenética e padronização da técnica de Eletroforese em gel com gradientes desnaturantes (DGGE) para caracterização das linhagens do vírus Influenza B identificadas durante as epidemias de 2004 a 2008.

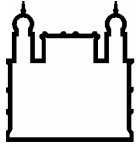
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paola Cristina Resende Silva

Globalmente, as infecções causadas pelos vírus Influenza constituem um importante desafio para a Saúde Pública. Os vírus Influenza B pertencem à família *Orthomyxoviridae*, seu genoma viral é constituído por um RNA de fita simples e polaridade negativa. O processo de *drift* antigênico favorece o contínuo aparecimento de novas variantes virais, o que demanda a reformulação anual da vacina. No início década de 80, foi observada a divergência do vírus Influenza B em duas linhagens antigênica e filogeneticamente distintas: B/Victoria/2/87-*like* (Vic87) e B/Yamagata/16/88-*like* (Yam88), que tem co-circulado em diferentes países na última década. O objetivo deste estudo consiste na identificação e caracterização molecular das linhagens de Influenza B circulantes em diferentes regiões brasileiras durante as epidemias de 2004 a 2008, com base no sequenciamento dos genes Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA). Ainda, padronizamos a metodologia de Eletroforese em Gel com Gradientes Desnaturantes (DGGE), visando à rápida tipagem dos vírus B. Diferentes substituições nos genes da HA e NA foram encontradas. Evidenciamos a co-circulação de ambas as linhagens no período estudado, contudo, não observamos a ocorrência de rearranjo gênico e nem a emergência de cepas resistentes aos inibidores de neuraminidase, com base nos genes investigados. No período 2006-2008, observamos a adequada concordância entre as cepas circulantes e as cepas vacinais preconizadas para uso no Hemisfério Sul. Entretanto, o mesmo não foi verdadeiro para o período 2004-2005. Finalmente, o protocolo de DGGE desenvolvido pode ser eficientemente utilizado para fins de rápida tipagem das linhagens de Influenza B. Os achados deste estudo contribuem para a melhor compreensão sobre a variabilidade dos vírus Influenza B e os mecanismos envolvidos na sua evolução molecular, bem como o padrão de circulação das linhagens virais no Brasil e sua correspondência com as vacinas para Influenza, anualmente administradas no Hemisfério Sul. Este conjunto de informações são de grande relevância para a contínua adequação e implementação das políticas e estratégias voltadas ao controle e prevenção de infecções por Influenza na nossa população.

Palavras-chave: Influenza B; drift antigênico; rearranjo; hemaglutinina; neuraminidase, resistência aos antivirais.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Phylogenetic analysis and standardization of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) technique for characterization of Influenza B viruses lineages detected during the 2004-2008 epidemics.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paola Cristina Resende Silva

Worldwide, Influenza infections are a major Public Health issue. Influenza B virus is classified into the *Orthomyxoviridae* family, the viral genome consists of a single strand RNA and negative polarity. Because of antigenic drift, novel viral variants are continuously rising, what demands the annual review of vaccine formulation. In the early 80's, was observed the divergence of Influenza B into two distinct antigenic and phylogenetic lineages – B/Victoria/2/87-like (Vic87) and B/Yamagata/16/88-like (Yam88), was observed. In some countries, these strains have been co-circulating in the last 10 years. The aim of this study was to investigate the circulation patterns of Vic87 and Yam88 among different Brazilian regions during the 2004-2008 epidemics, based on haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) sequencing. Moreover, a Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) protocol was standardized for rapid typing of Flu B typing into Yam88-like and Vic87-like strains. Different Aminoacid substitutions in the HA and NA were encountered. Along the studied period, our findings showed that both viral lineages have been co-circulating in Brazil. Moreover, no evidence of reassortant nor NA inhibitor-resistant viruses was found. From 2006 to 2008, an adequate match between vaccine and circulating strains was met. However, it was not true for 2004-2005 years. Finally, our DGGE protocol can be successfully used as a rapid Flu B strain typing test. Our findings contribute for a better figure of Flu B genetic variability and its molecular evolution mechanisms, in addition to the circulation patterns of Flu B lineages in Brazil, and their respective association with the vaccine strains used in the Southern Hemisphere. Altogether, these are pivotal information to continuously tailor and implement Public Health policies on behalf of the control and prevention of Influenza infections.

Key-words: Influenza B; antigenic drift; reassortment; haemagglutinin; neuraminidase.

ÍNDICE

1. Introdução	4
1.1. Histórico dos vírus Influenza	4
1.1.1. Pandemias ocasionadas pelos vírus Influenza	6
1.2. Os vírus Influenza	11
1.2.1. Morfologia e genoma viral.....	11
1.2.2. Hemaglutinina dos vírus influenza B.....	15
1.2.3. Neuraminidase.....	15
1.3. Replicação viral.....	16
1.4. Mecanismos evolutivos e epidemiologia molecular dos vírus Influenza B ..	18
1.5. Aspectos clínicos	23
1.6. Diagnóstico laboratorial e caracterização antigênica e molecular dos vírus Influenza	25
1.7. Epidemiologia	29
1.7.1. Transmissão	32
1.7.2. Vigilância epidemiológica.....	33
1.8. Tratamento e prevenção	34
1.8.1. Antivirais	34
1.8.2. Vacinas	35
2. Justificativa.....	38
3. Objetivos	39
3.1. Objetivo Geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
4. METODOLOGIA	40
4.1. Casuística	40
4.2. Etapas do estudo	41
4.3. Extração de RNA e transcrição reversa.....	43
4.4. Amplificação dos fragmentos gênicos da HA pré-sequenciamento	43
4.5. Padronização da amplificação do fragmento gênico da NA.....	45
4.5.1. Desenho dos iniciadores.....	45
4.5.2. Primeira e segunda PCR do sequenciamento de NA	46
4.6. Reação de sequenciamento para os fragmentos gênicos de HA e NA.....	47
4.7. Alinhamento e análise filogenética dos fragmentos de HA e NA	48
4.8. Identificação das sequências	50
4.9. Padronização do protocolo de DGGE para o vírus Influenza B	51
4.9.1. Cálculo teórico de desnaturação para aplicação da DGGE.....	51
4.9.2. Desenho dos iniciadores para a <i>nested</i> PCR da DGGE.....	52
4.9.3. Padronização da <i>Nested</i> PCR da DGGE.....	52
4.9.4. Padronização do gel com desnaturantes químicos.....	53
4.9.1. Confecção do gel de poliacrilamida, com gradiente químico desnaturante	54
4.9.5. DGGE	54
4.9.6. Validação dos resultados obtidos na DGGE	54
4.10. Aspectos éticos	55
5. RESULTADOS.....	56

5.1.	Sequenciamento e análise filogenética do gene da hemaglutinina (domínio HA1).....	56
5.1.1.	Variabilidade na sequência de aminoácidos do gene HA - Linhagem Vic87.....	63
5.1.2.	Variabilidade na sequência de aminoácidos do gene HA - Linhagem Yam88.....	67
5.2.	Desenho dos iniciadores e padronização do protocolo de PCR para o sequenciamento do gene NA.....	70
5.3.	Sequenciamento e análise filogenética do gene NA.....	71
5.3.1.	Variabilidade na sequência de aminoácidos do gene NA - Linhagem Vic87.....	79
5.3.2.	Variabilidade na sequência de aminoácidos do gene NA - Linhagem Yam88.....	81
5.4.	Rearranjo entre os fragmentos gênicos de HA e NA	83
5.5.	Co-circulação das linhagens Vic87 e Yam88 durante as cinco epidemias	85
5.6.	Padronização do protocolo de DGGE para diferenciação entre as linhagens do vírus Influenza B	87
5.6.1.	Escolha da região a ser analisada pela DGGE e desenho dos iniciadores	87
5.6.2.	Padronização da <i>nested</i> PCR da DGGE	90
5.6.3.	Padronização da DGGE	90
5.7.	Aplicação da metodologia de DGGE para a diferenciação entre as linhagens do vírus Influenza B.....	92
6.	DISCUSSÃO.....	95
6.1.	Identificação das cepas de Influenza B circulantes no Brasil 2004-2008.....	96
6.2.	Co-circulação das linhagens Yam88 e Vic 87 e rearranjo gênico	98
6.3.	Caracterização molecular dos segmento gênicos HA e NA.....	99
6.3.1.	Hemaglutinina.....	99
6.3.2.	Neuraminidase.....	101
6.4.	Aplicação do método de DGGE para a rápida tipagem das linhagens de Influenza B.....	102
6.5.	Considerações finais.....	103
7.	CONCLUSÕES	104
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	105
9.	BIBLIOGRAFIA	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Linha do tempo demonstrando as pandemias ocasionadas pelos vírus Influenza A ocorridas nos séculos XX e XXI.	7
Figura 1.2 – Evolução da glicoproteína Hemaglutinina do vírus Influenza A/H1N1 de 1918 a 2009, em reservatórios animais (parte superior) e entre humanos (parte inferior).	9
Figura 1.3 – Fases que caracterizam uma pandemia de Influenza.	10
Figura 1.4 – Micrografia eletrônica dos vírus Influenza.	12
Figura 1.5 – Representação esquemática do vírus Influenza B.	13
Figura 1.6 – Representação esquemática do genoma dos vírus Influenza B (vírus B/Lee/40).	14
Figura 1.7 – Figura esquemática da replicação do vírus Influenza B e os sítios de ação dos inibidores de neuraminidase, antivirais utilizados no controle destes vírus.	18
Figura 1.8 – Geração da diversidade genética e <i>drift</i> antigênico.	19
Figura 1.9 – Ilustração esquemática do mecanismo evolutivo de rearranjo gênico entre os fragmentos gênicos das linhagens do vírus Influenza B.	21
Figura 1.10 – Ilustração esquemática da circulação dos vírus Influenza B ao longo dos anos (1940-2010).	23
Figura 1.11 – Procedimento para coleta de secreção de nasofaringe, utilizando swab combinado nasal (A) e orofaríngeo (B) e aspirado de nasofaringe (C).	26
Figura 1.12 - Distribuição de casos confirmados por Influenza, segundo o subtipo e região do mundo no período da semana epidemiológica 29 (18 a 24 de julho).	30
Figura 1.13 - Comparação dos padrões sazonais dos vírus Influenza, em regiões de clima temperado (EUA) e tropicais (Brasil).	31
Figura 4.1 - Fluxograma das etapas e técnicas utilizadas para realização do presente estudo.	42
Figura 4.2 - Ilustração da estratégia utilizada para o sequenciamento do fragmento gênico HA1 da Hemaglutinina.	44
Figura 4.3 - Estratégia idealizada para o desenho dos iniciadores direto e reverso, a serem utilizados na amplificação pré-sequenciamento do segmento gênico de Neuraminidase.	46
Figura 4.4 - Fórmula para conversão da temperatura para o gradiente químico.	53
Figura 5.1 - Relação filogenética das cepas de Influenza B (região HA1 do gene HA) circulantes no Brasil de 2004 a 2008 inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Saitou e Nei, 1987).	62
Figura 5.2 – Distribuição das amostras sequenciadas para o domínio HA1 (gene HA) do vírus Influenza B, segundo a linhagem e o ano de coleta (2004 a 2008).	63
Figura 5.3 - Relação filogenética entre as 52 cepas de Influenza B (gene NA) circulantes no Brasil, inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Saitou e Nei, 1987).	78
Figura 5.4 - Distribuição das amostras seqüenciadas para o gene NA do vírus Influenza B, segundo a linhagem e o ano de coleta (2004 a 2008).	79

Figura 5.5 - Relação filogenética entre 52 cepas de Influenza B referente aos genes de HA (à esquerda) e NA (à direita) de variantes que circularam no Brasil de 2004 a 2008, inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Saitou e Nei, 1987).....	84
Figura 5.6 - Mapa da distribuição das linhagens Vic87 (vermelho) e Yam88 (azul) nos estados (amarelo) atendidos pelo serviço de referência do LVRS/FIOCRUZ.	85
Figura 5.7 - Curva de desnaturação das sequências vacinais (2004 a 2010).....	87
Figura 5.8 - Relação filogenética entre as 74 sequências de Influenza B circulantes no Brasil entre 2004 e 2008 e cepas vacinais, utilizando a sequência completa do domínio HA1 (A) e o fragmento de 191 nucleotídeos selecionado para DGGE (nt 778- 968) (B). As relações foram inferidas pelo método de agrupamento de vizinhos (Saitou e Nei, 1987).	89
Figura 5.9 - Gel de agarose a 1,5% após eletroforese e coloração por brometo de etídio, apresentando os produtos de 231 pares de bases obtidos na <i>nested</i> PCR do protocolo de DGGE.....	90
Figura 5.10 – Curvas de desnaturação x mobilidade de variantes de Influenza B com seus respectivos <i>T_m</i>	91
Figura 5.11 – DGGE para escolha do tempo de eletroforese, aplicando 8µL das amostras da linhagem Yam88 (B/RS/707/06 e B/MG262/08) e Vic87 (B/RS/710/06) de influenza B, com intervalos de 1h. A corrida foi desenvolvida a 150V/60°C/1h, 2h e 3h.	92
Figura 5.12 – Perfis dos 75 amplicons de Influenza B obtidos por DGGE, com a aplicação de 8µL das amostras em ordem cronológica, adicionado de 4µL de tampão de solubilização foram aplicados no gel, de amostra. As condições da corrida eletroforética foram 150V/2h/60°C.	93
Figura 5.13 – Resíduos de nucleotídeos responsáveis pela divergência entre as linhagens Vic87 (vermelho) e Yam88 (azul) de Influenza B na DGGE, com base no fragmento de 191 pb (nucleotídeo 778 ao 968) do domínio HA1.....	94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Segmentos gênicos do vírus Influenza B, proteína e suas respectivas funções.....	14
Tabela 1.2 - Técnicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial das infecções por Influenza.....	27
Tabela 1.3 - Marcadores de resistência encontrados na literatura referente à resistência dos vírus Influenza B frente aos inibidores de Neuraminidase.....	35
Tabela 1.4 - Componentes vacinais do Hemisfério Norte e Sul referente aos anos 2000 a 2010.	37
Tabela 4.1 – Distribuição de amostras positivas para Influenza B (N) e quantitativo de amostras utilizadas npara o estudo (n), segundo a unidade federada (2004-2008).....	41
Tabela 4.2 – Informações gerais dos iniciadores utilizados para o sequenciamento do segmento gênico da Hemaglutinina (domínio HA1).....	44
Tabela 4.3 - Números de acesso das sequências dos genes HA e NA do vírus Influenza B obtidas no presente trabalho e depositadas no GenBank. Brasil, 2004-2008.....	50
Tabela 4.4 - Número de acesso das sequências das cepas vacinais (genes Hemaglutinina e Neuraminidase), depositadas no Genbank e utilizadas no presente trabalho	51
Tabela 5.1 - Alinhamento do segmento gênico de HA (domínio HA1) referente a 333 aminoácidos (nucleotídeos 79 ao 1078).....	57
Tabela 5.2 – Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Vic87 circulantes durante a epidemia de 2005, em relação às cepas vacinais dos anos de 2004 (B/HongKong/330/2001) e 2006/2007 (B/Malaysia/2506/2004).....	64
Tabela 5.3 – Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Vic87 circulantes durante as epidemias de 2006 e 2007, em relação às cepas vacinais dos anos de 2004 (B/HongKong/330/2001) e 2006/2007 (B/Malaysia/2506/2004).....	65
Tabela 5.4 - Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Vic87 circulantes durante a epidemia de 2008, em relação à cepa vacinal dos anos de 2006/2007 (B/Malaysia/2506/2004).	66
Tabela 5.5 - Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Yam88 circulantes durante as epidemias de 2004 a 2007, em relação às cepas vacinais dos anos de 2005 (B/Shanghai/361/2002) e 2008-2009 (B/Florida/4/2006).....	67
Tabela 5.6 - Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Yam88 circulante durante a epidemia de 2008, em relação às cepas vacinais dos anos de 2005 (B/Shanghai/361/2002) e 2008-2009 (B/Florida/4/2006).....	69
Tabela 5.7 – Sequências e características dos iniciadores utilizados para o sequenciamento do segmento gênico NA do vírus Influenza B.	70
Tabela 5.8 - Alinhamento das 52 sequências de NA dos vírus Influenza B.	72

Tabela 5.9 - Substituições nos resíduos de aminoácidos no segmento gênico de NA das sequências brasileiras do vírus Influenza B (linhagem Vic87) circulantes durante as epidemias de 2007 e 2008, em relação à cepa vacinal dos anos de 2006/2007 (B/Malaysia/2506/2004).	80
Tabela 5.10 - Substituições nos resíduos de aminoácidos do segmento gênico de NA das sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Yam88 circulantes durante as epidemias de 2004, 2005-2008, em relação à cepa vacinal dos anos de 2008-2009 (B/Florida/4/2006).	82
Tabela 5.11 - Distribuição por Unidade Federada das linhagens Vic87 e Yam88 do vírus Influenza B das epidemias de 2004 a 2008.....	85
Tabela 5.12 – Sequências e características dos iniciadores utilizados para a amplificação dos produtos da <i>nested</i> PCR da DGGE.....	88

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AL	Alagoas
BA	Bahia
CDC	Centro para controle de doenças e prevenção (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementar
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
ddNTPs	Didesoxinucleotídeos
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>)
ES	Espírito Santo
FDA	Administração de Comidas e Drogas (<i>Food and Drug Administration</i>)
GC	Guanina e Citosina
HA	Hemaglutinina
HRM	Alta Resolução de Desnaturação (<i>High Melting Resolution</i>)
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IEC	Instituto Evandro Chagas
iNA	inibidores de neuraminidase
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LACENS	Laboratórios Centrais de Saúde Pública

LVRS	Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo
NA	Neuraminidase
NJ	Agrupamento de vizinhos (<i>neighbor-joining</i>)
nt	Nucleotídeos
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica (<i>National Center Biotechnology for Information</i>)
NP	Nucleoproteína
M	Proteína de matriz
MG	Minas Gerais
MMLV	<i>Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase</i>
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Fase de leitura aberta
pb	Pares de Bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDM	Pandêmico
PR	Paraná
TAE	Tris-Acetato-EDTA

TBE	Tris-Borato-EDTA
<i>T_m</i>	Temperatura de <i>melting</i>
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucléico
RNAv	Ácido ribonucléico viral
RNP	Ribonucleoproteína
RS	Rio Grande do Sul
RT	Transcrição reversa
SC	Santa Catarina
SE	Sergipe
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
UF	Unidade Federativa
URF	Uréia e formamida
UV	Ultravioleta
VIC87	B/Victoria/02/1987
YAM88	B/Yamagata/16/1988

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico dos vírus Influenza

A gripe, como é popularmente conhecida a infecção aguda causada pelos vírus Influenza, provoca desde infecções assintomáticas até doenças respiratórias graves podendo levar à morte. A doença gripal tem como características de importância epidemiológica, uma alta taxa de recorrência e a capacidade de acometer indivíduos em todas as faixas etárias. Os sintomas mais comuns são febre, tosse, coriza, cefaléia, mialgia e artralgia, que podem incapacitar temporariamente os indivíduos. Não é incomum, principalmente nos extremos de faixa etária, a necessidade de intervenção médica para evitar complicações, como infecções respiratórias secundárias, pneumonia ou até mesmo insuficiência respiratória, com necessidade de ventilação mecânica (Cox e Subbarao, 1999).

Hipócrates em 412 a.C. já descrevia epidemias com sintomatologia respiratória semelhantes às ocasionadas atualmente pelo vírus Influenza. Atribui-se, ainda, ao vírus Influenza a responsabilidade por variados surtos de doenças respiratórias ao longo da história. Como a devastadora doença que ocorreu em Atenas durante a Guerra Peloponesa; vários surtos de tosse e febre, que ocorreram da Idade Média; assim como a doença que debilitou os soldados ingleses e franceses durante a Primeira Guerra Mundial (Nicholson, 1998).

Logo após a Primeira Guerra Mundial, altíssimas taxas de infecção, morbidade e mortalidade foram observadas no mundo. Estima-se que metade da população mundial da época tenha sido infectada e cerca de 40 milhões de pessoas teriam morrido em consequência da doença. A origem do vírus que assolou o mundo ainda continua sendo um enigma, embora existam diversas teorias. A hipótese mais aceita é que este vírus seria originário do surto notificado pelo médico norte-americano Dr. L. Miner em 1918 no Kansas, EUA, entre soldados que entraram em contato com suínos (Crosby, 1989). Essa devastadora pandemia, como ficou estabelecida posteriormente, ocorreu em três ondas de setembro de 1918 a março de 1919. A primeira onda surgiu como uma doença respiratória leve. A segunda, com alta morbidade e baixa mortalidade, recebeu pouca atenção na maior parte do mundo, devido à guerra. Contudo, foi devido à grande repercussão do surto ocorrido na Espanha que a pandemia ficou conhecida como Gripe Espanhola. A terceira onda - de similar impacto à anterior - acometeu muitas pessoas devido à pneumonia

e falência respiratória. Sendo que, a maioria dos óbitos foi ocasionada por infecções secundárias oportunistas, iniciadas por uma infecção primária pelo vírus Influenza A/H1N1 (Wright e cols., 2007).

A passagem desta pandemia pelo Brasil foi marcante, os primeiros registros foram em setembro de 1918, com o adoecimento de quatro tripulantes do navio Piauí no porto de Recife. Entre outubro a dezembro de 1918 - período conhecido oficialmente como pandêmico -, estima-se que 65% da população adoeceu. Foram registradas cerca de 2.000 mortes em São Paulo. E no Rio de Janeiro, capital do Brasil na ocasião, foram notificadas 14348 mortes. A descrição feita pelo historiador Pedro Nava, que presenciou os acontecimentos da época, revela a situação ocasionada pela pandemia de 1918 no Brasil (Nava, 1989; Teixeira, 1993).

“... aterrorizava a velocidade do contágio e o número de pessoas que estavam sendo acometidas. Nenhuma de nossas calamidades chegara aos pés da moléstia reinante: o terrível não era o número de casualidades - mas não haver quem fabricasse caixões, quem os levasse ao cemitério, quem abrisse covas e enterrasse os mortos. O espantoso já não era a quantidade de doentes, mas o fato de estarem quase todos doentes, a impossibilidade de ajudar, tratar, transportar comida, vender gêneros, aviar receitas, exercer, em suma, os misteres indispensáveis à vida coletiva...” (Nava, 1989)

Devido ao grande impacto causado pela pandemia da Gripe Espanhola no mundo, as autoridades da Inglaterra decidiram investir na pesquisa em virologia. Assim, Wilson Smith e colaboradores do Instituto Nacional para Pesquisas Médicas em Londres, no ano de 1933, iniciaram pesquisas, inoculando intranasalmente em furões, lavados de nasofaringe de pessoas com sintomas de infecção por influenza. Sendo possível então, observar que os animais infectados desenvolviam os sintomas característicos da doença. Desta forma, concluíram que o patógeno era um agente filtrável, passível de transmissão de um animal a outro e capaz de levar ao desenvolvimento de uma resposta imune por parte do hospedeiro, ficando este vírus conhecido posteriormente como vírus Influenza tipo A (Smith e cols., 1986).

Com a descoberta do vírus influenza A, as pesquisas continuaram, resultando no desenvolvimento da técnica de replicação do vírus em ovos embrionados no ano de 1934 (Burnet e Ferry, 1934). Hoje, esta técnica é uma das principais para o isolamento viral e para a produção de vacinas.

No ano de 1940, foi detectado um novo vírus que se caracterizava por ser antigenicamente distinto do vírus Influenza A, mas apresentava características estruturais semelhantes. Este novo agente foi denominado de B/Lee/40, e sua descoberta culminou na descrição de um novo gênero, denominado *Influenzavirus* tipo B (Francis, 1940).

Em 1941, foi comprovada a capacidade hemaglutinante viral e foi desenvolvido o primeiro protocolo de inibição da hemaglutinação, possibilitando a identificação sorológica dos isolados e, por conseguinte, a presença de anticorpos no soro de pacientes suspeitos (Hirst, 1941).

Por fim, foi descoberto no ano de 1951 um novo gênero, denominado *Influenzavirus* tipo C (Taylor, 1951).

Baseados em estudos evolutivos do segmento gênico da hemaglutinina (HA), o maior antígeno de superfície destes vírus, acredita-se que os três gêneros dos vírus Influenza tenham um ancestral comum. Sendo que, os vírus influenza C divergiram primeiro (há aproximadamente 8000 anos), e os vírus Influenza A e B, respectivamente, há cerca de 2000 e 4000 anos atrás (Suzuki e Nei, 2002). Esse ancestral comum explica as similaridades encontradas entre os gêneros Influenza A e B, quando comparados ao gênero Influenza C.

1.1.1. Pandemias ocasionadas pelos vírus Influenza

As pandemias de gripe que ocorreram nos últimos dois séculos foram sabidamente ocasionadas a partir da emergência de um novo subtipo do vírus influenza A. Estes vírus, com o qual a população não havia tido contato prévio, foram capazes de provocar uma doença grave, tendo um alto índice de morbidade e mortalidade. A ausência de contato prévio sugere que estes subtipos virais emergentes sejam produtos de rearranjo gênico entre as cepas humanas e as animais (Okazaki e cols., 2000).

Como descrito anteriormente, a primeira pandemia do século XX, foi a “Gripe Espanhola” ou Pandemia de 1918, ocasionada pelos vírus Influenza A/H1N1 (Wright e cols., 2007). Posteriormente, três outros eventos pandêmicos ocorreram, dois no século XX e um recentemente no XXI. A Figura 1.1 mostra esquematicamente os períodos pandêmicos e os vírus que circularam durante estes períodos.

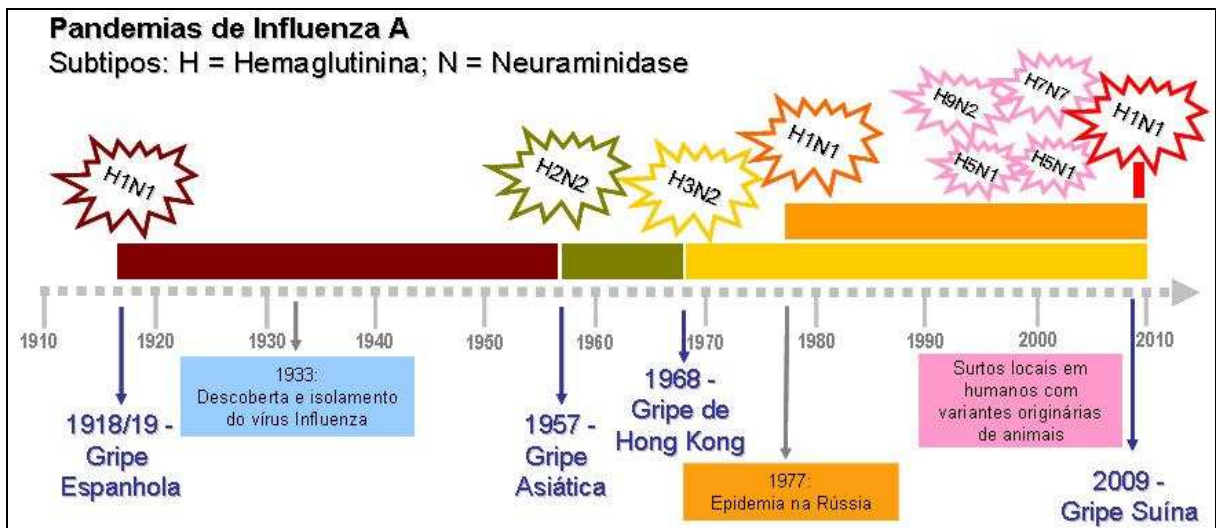


Figura 1.1 – Linha do tempo demonstrando as pandemias ocasionadas pelos vírus Influenza A ocorridas nos séculos XX e XXI.

Trinta e oito anos após a “Gripe espanhola”, entre os anos de 1957-58, uma nova cepa emergente de influenza A/H2N2 foi detectada na província de Yunan, na China (Scholtissek e cols., 1978). Esta cepa dispersou-se para Hong Kong e então, rapidamente atingiu Singapura, Taiwan e Japão. Em seis meses o vírus havia se espalhado por todo o globo, ficando a pandemia conhecida como, Gripe Asiática. A maioria dos óbitos ocorreu devido à pneumonia bacteriana secundária, sendo os indivíduos muito jovens e idosos os mais atingidos (Wright e cols., 2007).

No ano de 1968, o subtipo de influenza A/H2N2 foi substituído pelo subtipo A/H3N2, após rearranjo entre os segmentos gênicos de HA e PB1, provenientes de patos selvagens, e os outros seis segmentos do próprio subtipo H2N2 (Scholtissek e cols., 1978). Esta nova pandemia ficou conhecida como Gripe de Hong Kong, e foi caracterizada por apresentar baixos índices de mortalidade, quando comparada com as duas pandemias anteriores. Possivelmente, em decorrência de modificação em apenas uma estrutura na superfície viral (o segmento gênico HA deste vírus era muito similar ao do vírus que circulou entre 1889-1900) e pela presença de anticorpos nos indivíduos com mais de sessenta anos (Wright e cols., 2007).

A partir de 1977, o subtipo H1N1 reapareceu na Rússia, tornando-se epidêmico (Wright e cols., 2007). Entretanto, não substituiu o subtipo H3N2, passando esses dois subtipos de Influenza A, juntamente com o vírus influenza B a circular concomitantemente entre a população mundial. Normalmente um destes vírus sazonais predomina, tornando-se epidêmico em determinado ano (Hilleman, 2002).

Contudo, em 1997, um surto de gripe provocado pelo subtipo de influenza A/H5N1 aconteceu em Hong Kong, infectando 18 pessoas e levando seis delas ao óbito (Hiromoto e cols., 2000). Desde então, surtos em vários países da Ásia vêm sendo reportados e monitorados constantemente (Centers for Disease Control and Prevention, 2009). A partir deste evento a população mundial ficou em alerta e planos de preparação para um evento pandêmico de influenza foram desenvolvidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e por diversos países (WHO, 2009; Ministério da Saúde, 2010). Graças à baixa transmissibilidade entre humanos, este subtipo não se tornou epidêmico (Bender e cols., 1999). A agilidade na obtenção dos resultados permitiu a rápida identificação e eliminação dos plantéis de aves contaminadas, sobretudo nos países do continente asiático, onde os mercados de aves costumam ser bastante comuns, e constituem uma ótima oportunidade para o rearranjo entre diferentes subtipos de Influenza. Análises filogenéticas evidenciaram a transmissão direta da cepa circulante de Influenza A/H5N1 entre galinhas para o homem, eliminando, neste caso, a etapa intermediária da adaptação viral em suínos (Webster, 1998).

Outros subtipos incomuns para o homem, como A/H9N2 (Xu e cols., 2004) e A/H7N7 (Koopmans e cols., 2004), transmitidos a partir de aves já foram identificados em humanos. Entretanto tais infecções foram pontuais, sem maior importância epidemiológica, quando comparadas aos demais subtipos.

No ano de 2009, ocorreu a emergência de nova linhagem de influenza A/H1N1 - a primeira pandemia do século XXI. O vírus - produto de rearranjo gênico - é composto por: dois genes (PA e PB2) da linhagem aviária norte-americana; um gene (PB1) derivado da linhagem sazonal H3N2; três genes (HA, NP e NS) da linhagem suína clássica norte-americana; e dois genes (NA e M) da linhagem suína euro-asiática. Este vírus parece haver sido introduzido em um único evento na população mexicana e norte-americana (Dawood e cols., 2009), com alta transmissibilidade entre humanos, desafiando toda a preparação mundial para uma esperada pandemia de influenza aviária (Belshe, 2009).

O diferencial entre o vírus H1N1 pandêmico (pdm) e o H1N1 sazonal (circulante na população desde 1977) está especialmente localizado na HA viral e deve-se à rápida mudança antigênica ocorrida nesta molécula, principal responsável pela infecção viral (Settembre e cols., 2010). A Figura 1.2 mostra o comportamento

das alterações antigênicas ocorridas na HA dos vírus que circularam entre humanos e animais de 1918 a 2009.

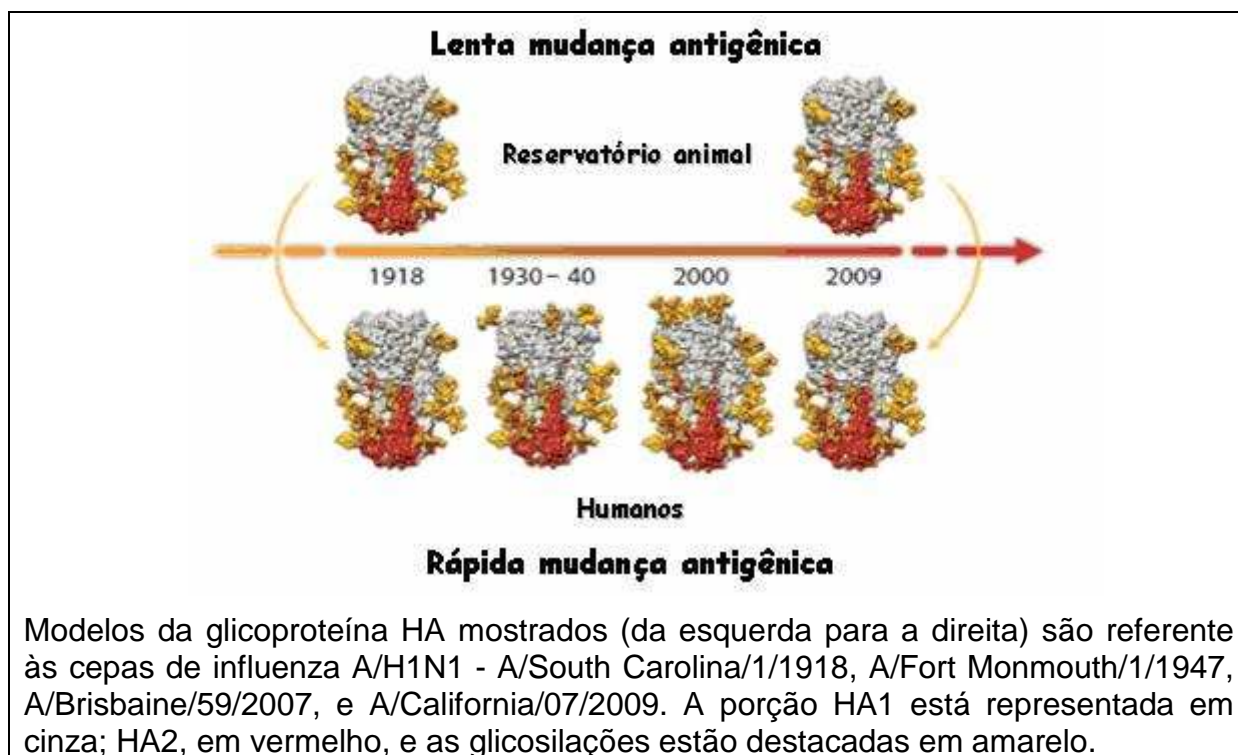


Figura 1.2 – Evolução da glicoproteína Hemaglutinina do vírus Influenza A/H1N1 de 1918 a 2009, em reservatórios animais (parte superior) e entre humanos (parte inferior).

Fonte: Adaptado de (Settembre e cols., 2010).

Sabe-se que a porção HA1 da HA dos vírus Influenza é a porção mais variável da molécula (Wiley e Skehel, 1987). Entre reservatórios animais a mudança antigênica é bem menor do que a que ocorre na HA dos vírus que infectam humanos. A circulação entre humanos permite uma rápida mudança antigênica neste antígeno de superfície e novos sítios de glicosilação são encontrados mais freqüentemente (Settembre e cols., 2010). A faixa etária mais acometida ao longo desta recente pandemia de H1N1 foram os adultos jovens ao contrario do que vinha sendo observado com a circulação do H1N1 sazonal (Dawood e cols., 2009). O motivo que explicaria a inversão na faixa etária acometida pelos vírus Influenza A/H1N1 pdm durante esta pandemia, seria a não existência de anticorpos contra esta nova cepa menos glicosilada.

Para caracterização de um evento pandêmico existem seis fases ou níveis de alerta (Figura 1.3) segundo a OMS (World Health Organization, 2010a).

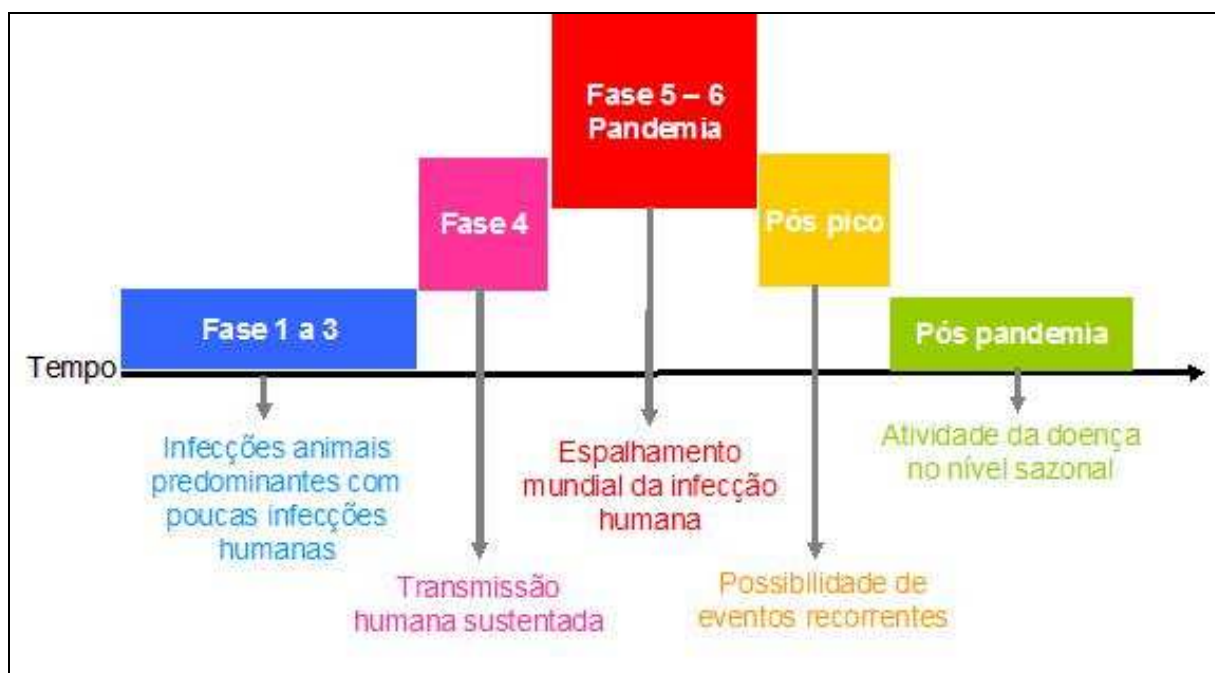


Figura 1.3 – Fases que caracterizam uma pandemia de Influenza.

Fonte: Adaptado de (World Health Organization, 2010a)

Durante a primeira fase, nenhum vírus que circula em animais é detectado em humanos. Na população, apenas os vírus sazonais são detectados. A fase dois compreende a circulação de vírus entre animais domésticos ou selvagens, sem infecção em humanos. Contudo, o potencial pandêmico do patógeno circulante é considerado nesta etapa. Na fase três, ocorrem casos esporádicos em humanos, através da transmissão a partir de animais. Contudo, esta transmissão é limitada não ocorrendo homem a homem. Durante a fase quatro, a transmissão passa a ser sustentada, com surgimento de surtos a nível comunitário. A fase cinco é caracterizada pela propagação do vírus em pelo menos dois países, sendo iminente a ocorrência de uma pandemia. A fase seis caracteriza a pandemia, propriamente dita. Nesta fase, ocorrem surtos em vários países simultaneamente. Após a fase pandêmica, entramos no período pós-pico, no qual há uma redução significativa no número de casos. Entretanto, existe a possibilidade de eventos recorrentes na população. Ao término do período pós-pico, temos o período pós-pandêmico, onde os vírus passam a circular no nível normal, como a gripe sazonal (World Health Organization, 2010a).

1.2. Os vírus Influenza

Os vírus Influenza encontram-se classificados na família *Orthomyxoviridae*. Esta família é composta por cinco gêneros: *Influenzavirus tipo A*, *Influenzavirus tipo B* e *Influenzavirus tipo C* - que são os vírus Influenza propriamente ditos - e os gêneros *Isavirus* e *Thogotovirus* (Fauquet e Fargette, 2005). Estes vírus possuem genoma composto por ácido ribonucléico (RNA) segmentado, de fita simples e polaridade negativa. Em especial, os vírus Influenza A e B possuem oito segmentos e o Influenza C somente sete (Fauquet e Fargette, 2005; Palese e Shaw, 2007).

Desde 1971, a nomenclatura dos vírus Influenza A baseia-se no binômio HA x NA. Na forma atual de nomenclatura, indica-se o gênero viral (A, B ou C); a espécie de onde o vírus foi isolado (no caso de humanos, esta é omitida); o local do isolamento; o número da amostra no laboratório; o ano do isolamento; e, finalmente, o subtipo de HA e de NA (entre parênteses), caso a amostra seja do gênero A (Wright e cols., 2007). Por exemplo, o vírus influenza A/chicken/Hong Kong/220/97(H5N1). Esta amostra é a de número 220 isolada em na cidade de Hong Kong no ano de 1997, em uma galinha. E foi caracterizado como vírus influenza A do subtipo H5N1. Atualmente, já foram descritos 16 tipos de hemaglutinina (H1 a H16) e nove tipos de neuraminidase (N1 a N9).

Em contraste com o Influenza A, não existem subtipos de Influenza B até o presente momento. O gênero é constituído por diferentes linhagens, que podem sofrer rearranjo entre os segmentos gênicos. Embora existam diferenças consideráveis entre as linhagens, seja em termos genéticos ou antigênicos, elas não são suficientes para a designação em diferentes subtipos (ICTVdB Management, 2006). Então a nomenclatura adotada para influenza B descreve apenas o gênero, local de detecção, número de origem e ano (exemplo: B/Florida/4/2006)

1.2.1. Morfologia e genoma viral

As partículas virais dos vírus Influenza B são estruturas pleomórficas, medindo aproximadamente 100 nanômetros de diâmetro (Palese e Shaw, 2007) (Figura 1.4).

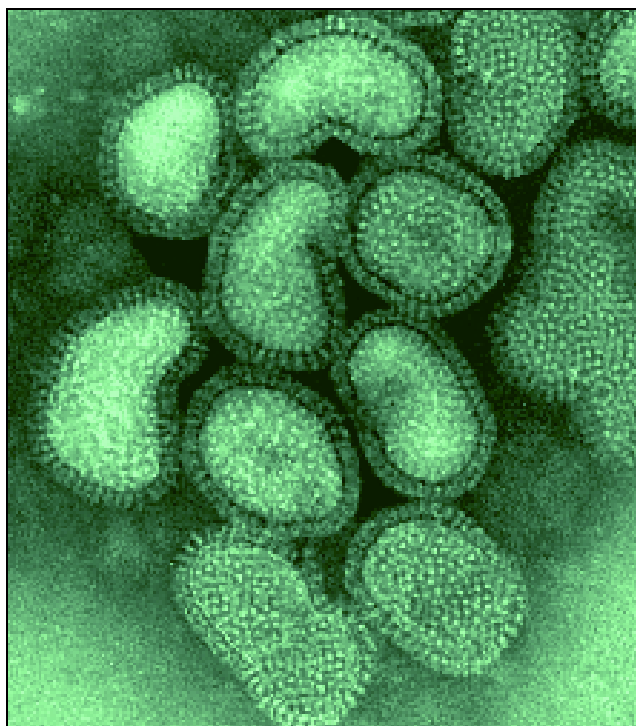


Figura 1.4 – Micrografia eletrônica dos vírus Influenza.

Fonte: (Stannard, 1995)

A partícula viral possui um envelope externo, no qual se encontram inseridas as duas glicoproteínas de superfície HA e NA e as proteínas BM2 e NB (Hay, 1998; Hagmaier e cols., 2003). As duas primeiras projetam-se a partir da bicamada lipídica do envelope numa proporção de 5:1 (HA: NA) e não se encontram, necessariamente, dispostas num arranjo homogêneo (Murti e Webster, 1986). Abaixo do envelope, encontra-se a proteína da matriz (M1). O nucleocapsídeo é composto pela ribonucleoproteína (RNP) - um complexo protéico formado pelo RNA viral (RNA_v), pela nucleoproteína (NP) e pelo complexo das polimerases PA, PB1 e PB2 (Ruigrok, 1998). O vírus Influenza encontra-se esquematicamente representado na Figura 1.5.

Das proteínas que compõem o virion, nove são comuns aos gêneros A e B: as três subunidades do complexo RNA-polimerase RNA - dependente (PB1, PB2 e PA), as espículas glicoprotéicas HA e NA, NP, M1, além das proteínas não-estruturais NS1 e de exportação (NEP). Contudo, o gênero B possui duas proteínas exclusivas: NB e BM2, que atuam como canais iônicos e auxiliam na replicação viral (Chizhnikov e cols., 1998; Hagmaier e cols., 2003; Imai e cols., 2008). As glicoproteínas de superfície são as principais estruturas antigênicas da partícula viral.

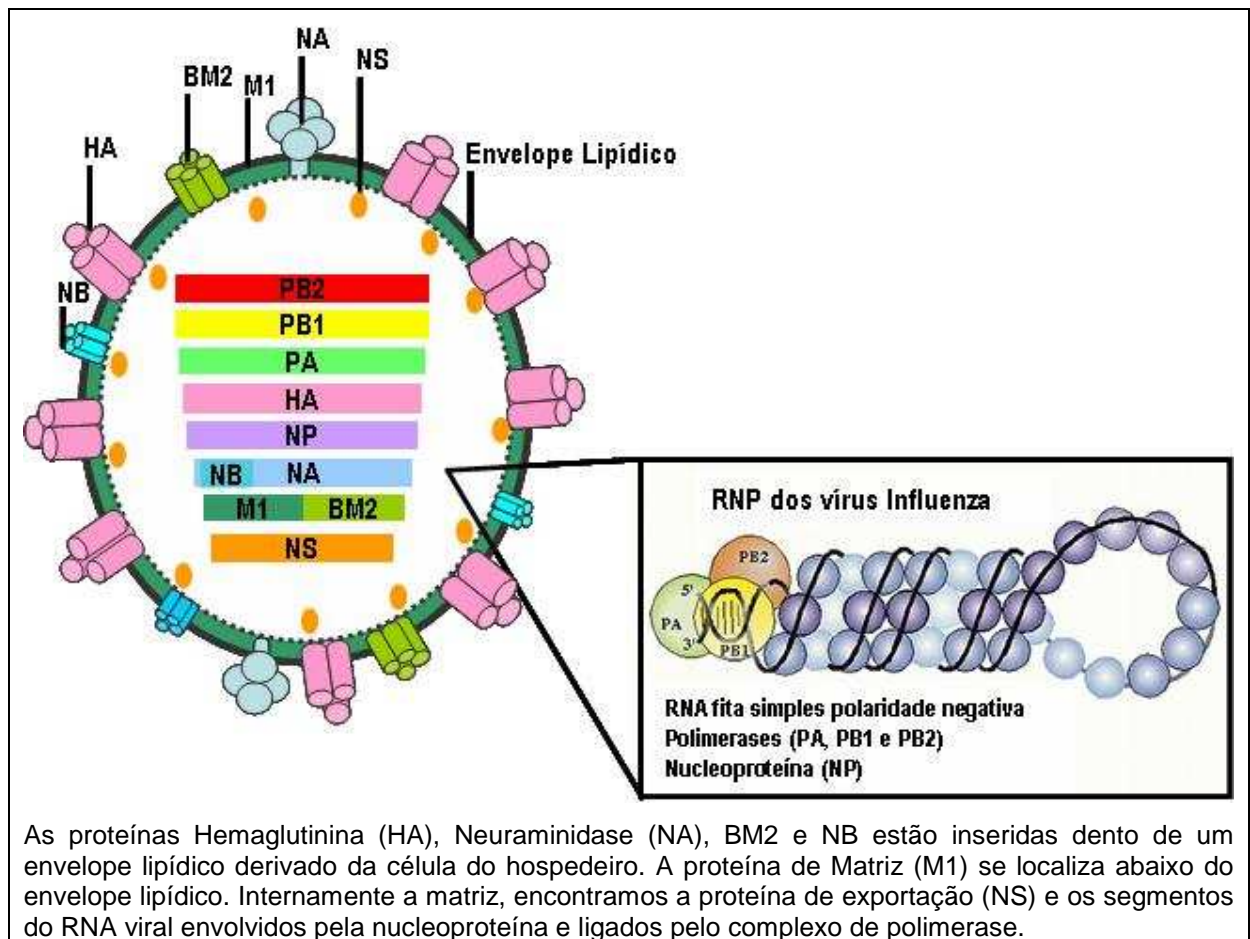
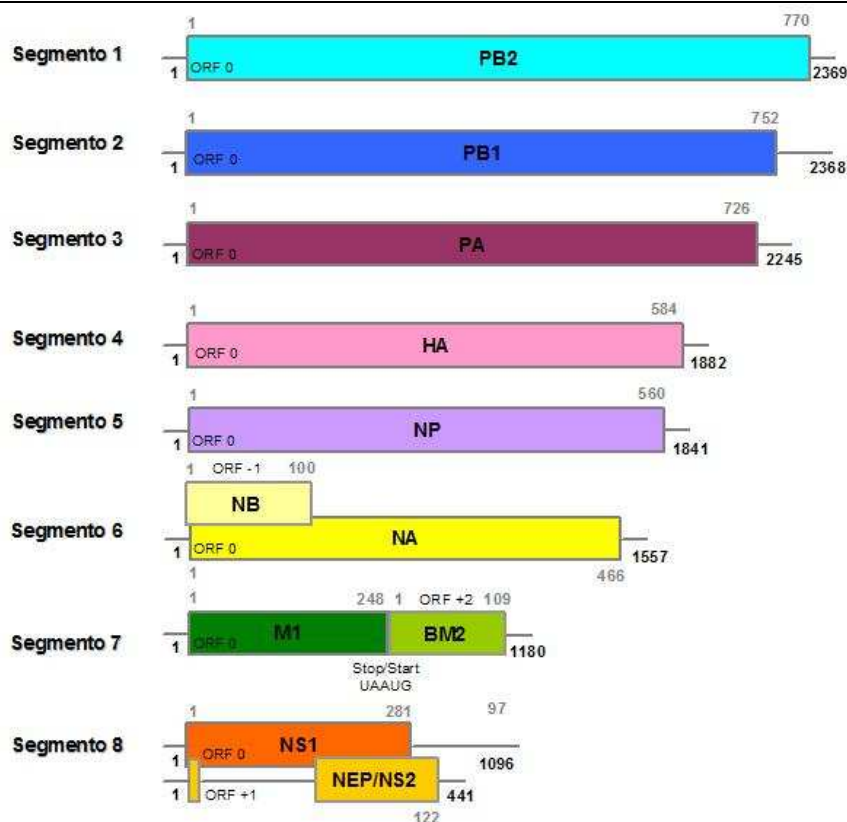


Figura 1.5 – Representação esquemática do vírus Influenza B.

Fonte: Adaptado de (Palese e Shaw, 2007).

O genoma dos vírus influenza B (Figura 1.6) é o maior entre os três gêneros (Ruigrok, 1998), sendo composto por 14648pb (ICTVdB Management, 2006). Quase todos os segmentos gênicos são monocistrônicos, com exceção dos segmentos seis (NA e NB), sete (M1 e BM2) e oito (NS1 e NEP) que podem codificar para mais de uma proteína. Um resumo das funções destas proteínas dos vírus Influenza B está descrito na Tabela 1.1.



Segmentos de RNA (em nucleotídeos) no sentido positivo e sua proteína codificante (em aminoácidos). As linhas que estão nas regiões 5' e 3' representam as regiões não codificantes. O segmento de NA contém uma ORF -1 adicional iniciando quatro nucleotídeos antes do códon de iniciação da NA, resultando na proteína NB. O segmento M codifica para as proteínas M1 e BM2. O códon UAA de terminação M1 sobrepõe com o de iniciação AUG em um *stop/start* códon pentanucleotídeo UAAUG. O segmento NS codifica para NS1 e NEP/NS2. NS1 é um produto da tradução de um RNAm co-linear enquanto NEP/NS2 é um produto de *splice* do RNAm.

Figura 1.6 – Representação esquemática do genoma dos vírus Influenza B (vírus B/Lee/40).

Fonte: Adaptado de (Palese e Shaw, 2007).

Tabela 1.1 - Segmentos gênicos do vírus Influenza B, proteína e suas respectivas funções.

Gene	Proteína	Função
PB2	PB2	Componente da RNA polimerase, reconhecimento
PB1	PB1	Componente da RNA polimerase; atividade de endonuclease; e alongamento
PA	PA	Componente da RNA polimerase
HA	HÁ	Glicoproteína de superfície; receptor de ligação; atividade de fusão; e maior antígeno
NP	NP	Ligação e síntese de RNA
NA	NB	Proteína de membrana; e canal iônico
NA	NA	Glicoproteína de superfície; e atividade de neuraminidase
M	M1	Proteína de matriz; interação com RNPs virais e glicoproteínas; e proteína de membrana
M	BM2	Proteína de membrana; canal iônico e montagem
NS	NS1	Proteína multifuncional, antagonista IFN viral
NS	NEP/NS2	Exportação nuclear dos RNPs virais

Fonte: Adaptado de (Palese e Shaw, 2007).

1.2.2. Hemaglutinina dos vírus influenza B

O gene que codifica para a proteína HA dos vírus Influenza B é composto por cerca de 1882 nucleotídeos e possui uma fase aberta de leitura (ORF), com o códon de iniciação AUG na posição 34, e um códon de terminação UAA na posição 1786, codificando uma proteína composta por 584 aminoácidos. A proteína HA é composta por duas regiões HA1 e HA2, com 345 e 223 aminoácidos, respectivamente (Berton e cols., 1984; Palese e Shaw, 2007). A variabilidade antigênica ocorre principalmente no domínio HA1 da molécula (Wiley e Skehel, 1987).

A espícula de HA consiste na maior glicoproteína da superfície viral (Sleigh e cols., 1981). Esta glicoproteína apresenta duas funções primordiais: ligação aos receptores siálicos da superfície celular e fusão do envelope viral com a membrana interna do endossomo, possibilitando a liberação final das RNPs dentro da célula (Palese e Shaw, 2007). É para esta estrutura protéica que os anticorpos neutralizantes são dirigidos (Yewdell e cols., 1986), o que explica a sua grande variabilidade (Wiley e Skehel, 1987). Desta forma, a HA é a peça chave para a emergência de novas variantes virais (Wiley e Skehel, 1987).

1.2.3. Neuraminidase

A espícula glicoprotéica de superfície NA tem sido considerada importante na eficácia das vacinas antiinfluenza. No entanto, é sabido que os anticorpos dirigidos a este antígeno desempenham um papel secundário, no que diz respeito à aquisição de imunidade do hospedeiro quando comparada a HA (Murphy e cols., 1972). O segmento gênico que codifica para a glicoproteína NA do vírus Influenza B possui aproximadamente 1557 nucleotídeos (Shaw e cols., 1982; Palese e Shaw, 2007). O gene NA possui duas ORFs. A ORF 0 codifica para NA e a ORF -1, para o canal de prótons NB, como pode ser observado na Figura 1.6.

O segmento gênico que codifica para NA é composto por 466 aminoácidos (Palese e Shaw, 2007). A glicoproteína NA apresenta uma atividade sialidásica, presente na superfície celular. Essa atividade foi inicialmente observada por Hirst (1941), após notar a impossibilidade de re-aglutinação de hemácias, quando anteriormente submetidas à aglutinação por vírus influenza (Hirst, 1941). Assim, a partir desses experimentos, conferiu-se a essa estrutura a atividade de destruição

dos receptores siálicos. Esta atividade enzimática ocorre nos gêneros A e B dos vírus influenza. E tem por finalidades principais: a clivagem de resíduos siálicos da camada de mucina, permitindo o acesso das partículas virais às células epiteliais do trato respiratório no início da infecção; assim como liberar as novas partículas virais dos resíduos siálicos da membrana celular (onde ocorre a montagem e brotamento da nova progênie viral), o que impediria a dispersão natural dos novos virions (Wright e cols., 2007). Nem todos os vírus que requerem resíduos siálicos para adsorção à superfície celular via HA apresentam esta atividade enzimática (sialidásica) de destruição dos receptores celulares. Entretanto, as atividades enzimáticas similares às de sialidase da NA, para os vírus influenza A e B, ou de acetilsterase, para os vírus influenza C, mostram-se fundamentais para os vírus envelopados que possuem ácido siálico como receptor (Hofling e cols., 1997).

Muitas diferenças entre as NAs das linhagens Vic87 e Yam88 estão localizadas na haste e na região superior da molécula, ou ainda porção que codifica para a proteína transmembrana NB (Rota e cols., 1990; McCullers e cols., 1999b).

O segmento gênico do gene NA que codifica para a proteína transmembrana NB é composto por 100 aminoácidos (Hay, 1998; Palese e Shaw, 2007). Esta proteína é expressa abundantemente na superfície de células infectadas pelo vírus influenza B e encontra-se dividida em diferentes domínios: um ectodomínio de 18 aminoácidos, um domínio transmembrana de 22 aminoácidos, e uma cauda de 60 aminoácidos (Brassard e cols., 1996). Essa estrutura protéica desempenha a função de canal de prótons, essencial para o processo de replicação (Chizhnikov e cols., 1998; Hay, 1998).

1.3. Replicação viral

O principal alvo da infecção por vírus Influenza em humanos são as células ciliadas do trato respiratório, por apresentarem resíduos siálicos nas suas membranas. Esses resíduos permitem a interação com a glicoproteína de superfície HA, possibilitando a penetração viral por endocitose (Palese e Shaw, 2007).

A clivagem da HA e fusão da membrana endossomal com o envelope viral acontece apenas na presença de baixo pH. A acidificação ocorre pelo fluxo de prótons H^+ do citoplasma para o interior da partícula viral através dos canais iônicos formados pelas proteínas BM2 e MB (Chizhnikov e cols., 1998; Kollerova e

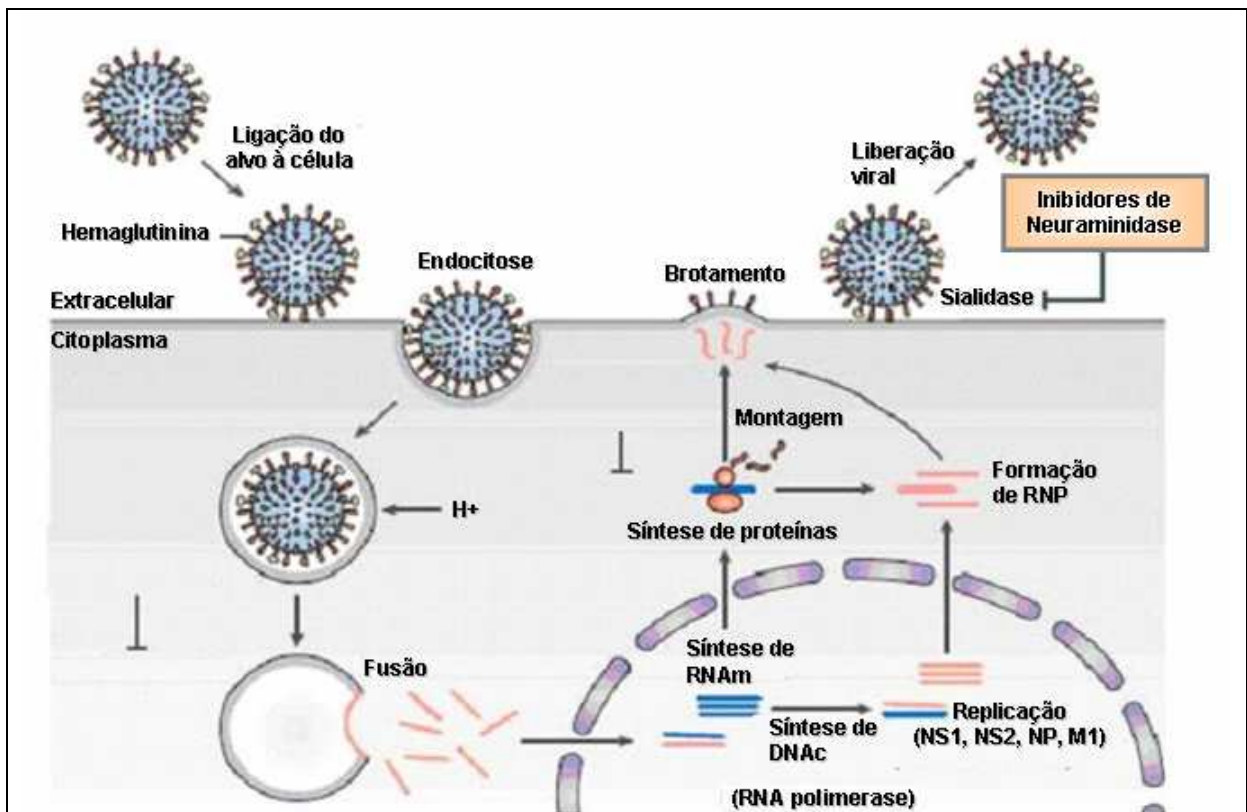
Betakova, 2006; Imai e cols., 2008). O pH ácido, entre cinco e seis, provoca uma mudança conformacional na subunidade HA2 da HA, deixando expostos os domínios hidrofóbicos da proteína, o que resulta na fusão do envelope viral com o endossoma. O pH ácido no endossoma também facilita a migração das RNPs para o citoplasma, devido à dissociação ácido dependente da proteína M1 (Nayak e cols., 2004).

As RNPs livres no citoplasma migram para o núcleo celular através de poros na membrana nuclear. Então, no núcleo pela atividade do complexo da polimerase viral é iniciada a transcrição e a replicação do RNAv. No núcleo são produzidos os segmentos do genoma que entrarão na composição da progênie viral (Palese e Shaw, 2007).

As proteínas virais como, a NP, o complexo RNA-polimerase e a M1 possuem sequência sinal de distribuição nuclear, enquanto as proteínas BM2, NB, NA e HA são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e passam pelo complexo de Golgi. No núcleo, as NPs e as proteínas do complexo RNA-polimerase associam-se aos ácidos ribonucléicos virais (RNAv) recém sintetizados, formando as RNPs (Bergmann e Muster, 1996). As proteínas M1 interagem com as RNPs e migram para o citoplasma. O mecanismo de seleção dos oito diferentes segmentos genéticos ainda não foi elucidado, entretanto, sabe-se que a proteína NEP tem um papel importante na saída das RNPs do núcleo para o citoplasma (O'Neill e cols., 1998).

No citoplasma, ocorre a migração das RNPs protegidos pela proteína M1 até a membrana celular, onde são recobertos por um envelope lipídico contendo as glicoproteínas da superfície viral e a proteína BM2 e a NB (Palese e Shaw, 2007). A NA é responsável pelo brotamento do vírus recém sintetizado, pois como citado, cliva o ácido siálico da superfície da membrana, impedindo assim a sua aglomeração ou retenção na superfície da célula, devido à interação da HA com os resíduos siálicos (Nayak e cols., 2004).

A replicação viral e o sítio de ação dos inibidores de neuraminidase (iNA) principais antivirais, utilizados atualmente para as infecções por vírus Influenza encontram-se esquematicamente representados na Figura 1.7.



A interação do vírus influenza à célula se dá por resíduos siálicos presentes na superfície celular. Então ocorre a internalização do vírus por endocitose. O baixo pH no endossomo desencadeia a fusão das membranas viral e endossomal, liberando as RNPs virais para o citoplasma, que são importadas para o núcleo, onde servem como modelo para a transcrição. Novas proteínas são sintetizadas a partir do RNA mensageiro (RNAm) viral. O genoma viral é replicado por meio de um RNA complementar (RNAc) de sentido positivo. As ribonucleoproteínas (RNPs) recém-sintetizadas são exportadas do núcleo para o local de montagem no citoplasma, então protegidas pela proteína M1 migram até a membrana celular, onde são recobertos por um envelope lipídico contendo as glicoproteínas da superfície viral e a proteína M2. A neuraminidase é responsável pelo brotamento do vírus recém sintetizado, pois cliva o ácido siálico da superfície da membrana, impedindo assim sua aglomeração ou retenção na superfície da célula devido à interação da HA com os resíduos siálicos. Os inibidores de Neuraminidase podem impedir a NA de realizar sua atividade sialidásica.

Figura 1.7 – Figura esquemática da replicação do vírus Influenza B e os sítios de ação dos inibidores de neuraminidase, antivirais utilizados no controle destes vírus.

Fonte: Adaptado de (von Itzstein, 2007).

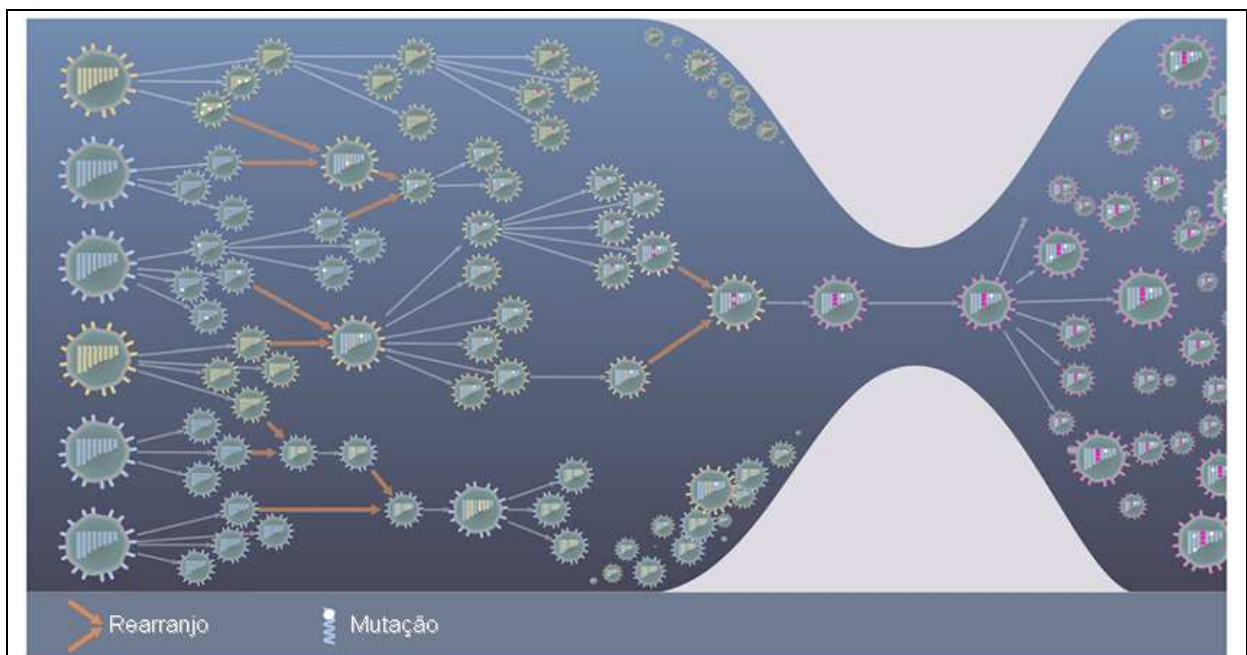
1.4. Mecanismos evolutivos e epidemiologia molecular dos vírus Influenza B

Seja sob a perspectiva da genética de populações ou da evolução de vírus RNA, as mudanças evolucionárias encontram-se relacionadas a diferentes processos: mutação, recombinação ou rearranjo gênico, seleção, deriva genética e migração. Estes processos são interativos e delineiam a estrutura das populações.

Algumas características dos vírus RNA são também importantes para o processo evolutivo. Frequentemente, estes vírus encontram-se sob a forma de grandes populações (o número de partículas virais pode chegar à ordem de 10^{12}).

Isto ocorre em consequência do processo replicativo, onde uma única partícula viral pode produzir até 100.000 novas cópias em 10 horas. Ainda, a baixa fidelidade das polimerases – que não possuem a atividade exonuclease 5' → 3' - faz com que os vírus RNA exibam grandes taxas de mutação (cerca de 1 mutação/genoma/replicação) (Moya e cols., 2004; Suzuki, 2005).

Em contraste com o vírus Influenza A, os vírus Influenza B são quase exclusivamente encontrados em humanos (Osterhaus e cols., 2000; Nicholson e cols., 2003), de modo que o *shift* antigênico não ocorre entre os últimos. Contudo, o *drift* antigênico – mutações pontuais no genoma viral – constitui um mecanismo evolutivo comum a ambos os vírus (Figura 1.8) e tem sido responsável pela contínua evasão viral à resposta imune do hospedeiro, consequente do acúmulo gradual de mutações nas glicoproteínas HA e NA, por conseguinte, ocasionando mudanças nas respectivas estruturas antigênicas.



Os vírus amarelos e azuis representam duas linhagens antigênicamente distintas do vírus influenza B, circulando na mesma população humana. A diversidade genética da população viral circulante aumenta através dos processos de mutação e rearranjo. As setas brancas indicam as relações entre os vírus ancestrais e descendentes. As marcas brancas nos segmentos indicam as mutações neutras, e as vermelhas, indicam as mutações que afetam as regiões antigênicas nas proteínas de superfície. As setas laranja indicam a geração de vírus oriundos de rearranjo, contendo segmentos dos dois ancestrais. Conforme estes vírus permanecem circulando, a imunidade da população aumenta, sendo representada na figura pelo afunilamento em forma de gargalo. Paralelamente, os vírus contendo mudanças antigênicas nas proteínas de superfície se acumulam na população viral. Em algum momento, ocorrerá a emergência da nova variante antigênica (*drift*), menos afetada pela imunidade populacional (indicada pelas setas vermelhas). Esta variante emergente será capaz de causar novas infecções e fundar um novo *cluster*, composto por variantes similares.

Figura 1.8 – Geração da diversidade genética e *drift* antigênico.

Fonte: Adaptado de (McHardy e Adams, 2009)

Os vírus B não se encontram subdivididos em subtipos (segundo HA e NA), mas em duas linhagens filogenética e antigenicamente distintas, a B/Victoria/2/87-*like* (Vic87) and B/Yamagata/16/88-*like* (Yam88) (Rota e cols., 1990; McCullers e cols., 2004; Chen e Holmes, 2008).

Estudos envolvendo um maior número de segmentos gênicos revelam que os genes HA e NA são os que apresentam as maiores taxas de substituição nucleotídica (Lindstrom e cols., 2004). Quando comparadas as duas linhagens Vic87 e Yam88, maiores taxas de substituição tem sido encontradas na HA da linhagem Vic87 (Chen e Holmes, 2008).

Outros mecanismos contribuem para a variabilidade viral, dentre os quais: i) a co-circulação de múltiplas linhagens por longos períodos; ii) o frequente rearranjo entre os vírus circulantes (Figura 1.9), dando origem a uma constelação de genomas (Lindstrom e cols., 1999; Puzelli e cols., 2004; Chen e Holmes, 2008); iii) o desaparecimento e re-emergência de linhagens e iv) a sistemática inserção e deleção de nucleotídeos no gene HA (Lindstrom e cols., 1999).

Desta forma, apesar das menores taxas evolucionárias observadas entre os vírus Influenza B, este conjunto de estratégias é utilizado, favorecendo a emergência de novas variantes e resultando nas epidemias sazonais. Este padrão filogenético complexo constitui a base da variabilidade necessária para que estes vírus continuem circulando (Lindstrom e cols., 1999).

Um estudo do genoma completo de vírus Influenza B, isolados entre 1979 e 2003, revelou uma alta diversidade genética, associada ao rearranjo entre os segmentos gênicos. Ao menos, 14 genótipos virais foram identificados. Com relação ao processo evolutivo dos diferentes genes, embora as taxas evolutivas tenham sido distintas segundo o gene específico e linhagem, os genes parecem evoluir linearmente (exceto NS1). O impacto destas mudanças nucleotídicas em termos de aminoácidos também varia segundo o gene e a linhagem. Finalmente, tem sido observada a dominância dos segmentos gênicos da linhagem II sobre a linhagem III, em termos do maior tempo de circulação e evolução contínua (McCullers e cols., 2004).

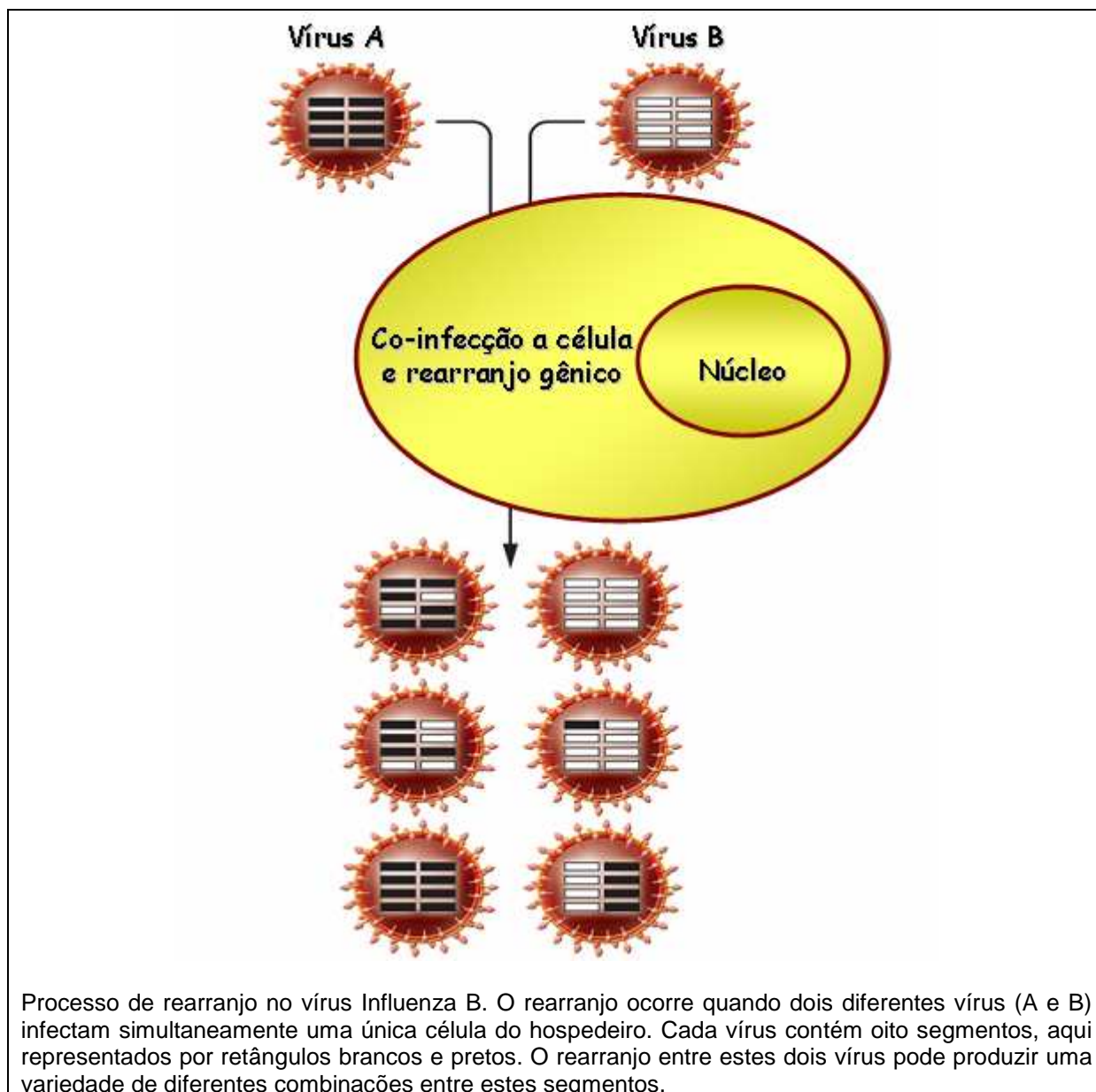


Figura 1.9 – Ilustração esquemática do mecanismo evolutivo de rearranjo gênico entre os fragmentos gênicos das linhagens do vírus Influenza B.

Fonte: Holmes, 2009

Embora a evolução dos vírus Influenza B seja linear, não existem padrões similares ou estabelecidos nas epidemias causadas por este patógeno. Em alguns anos, eles predominam globalmente durante as epidemias, em outros circulam em baixa frequência na população. O processo de rearranjo gênico poderia, em parte, explicar este perfil epidemiológico (Lindstrom e cols., 1999; McCullers e cols., 1999a). Em contrapartida, as mudanças antigênicas da HA parecem ser menos importantes para o processo evolutivo viral do que a aquisição de novos genes por rearranjo (McCullers e cols., 2004).

Entender os mecanismos evolucionários dos vírus Influenza e a sua interação é de fundamental relevância para estimar o futuro impacto desta virose na população e adequar estratégias para o seu controle.

De 1940 até o início da década de 80, os vírus influenza B apresentavam apenas uma linhagem circulante. Contudo, em algum momento entre os anos 70 e 80, esta única linhagem divergiu, originando duas novas linhagens virais antigênica e filogeneticamente distintas dentro do gênero B (Rota e cols., 1990; Rota e cols., 1992). Inicialmente, os vírus influenza B circulantes eram denominados de linhagem I. Desta forma, as duas linhagens divergentes (Yam88 e Vic87), ficaram conhecidas como linhagens II e III respectivamente (Lindstrom e cols., 1999; McCullers e cols., 2004), tendo como representantes as cepas B/Yamagata/16/88 (Yam88) e B/Victoria/2/87 (Vic87) (Rota e cols., 1990).

Logo após o processo de divergência, a co-circulação de ambas as linhagens foi relatada em alguns países (Kanegae e cols., 1990; Rota e cols., 1990). Posteriormente, elas passaram a circular individualmente e, em alguns períodos, cada linhagem era encontrada apenas em determinadas regiões (McCullers e cols., 1999b).

Durante o período de 1987 a 1989, a linhagem mais freqüentemente isolada no mundo era a Vic87, sendo responsável pela epidemia de 1996/1997 restrita ao leste Asiático (Chen e Holmes, 2008). Na década de 90, a Vic87 foi substituída pela linhagem Yam88.

A partir de 2001, diversos autores descreveram a re-emergência da linhagem Vic87 e sua co-circulação com a linhagem Yam88, a partir da análise de fragmentos gênicos de HA e/ou HA e NA (Shaw e cols., 2002; Ansaldi e cols., 2003; Barr e cols., 2003; Chi e cols., 2003; Motta e cols., 2006b). A co-circulação favorece os eventos de rearranjo gênico entre as diferentes linhagens virais e, de fato, a circulação de vírus, produto de rearranjo gênico, começou a ser observada (Puzelli e cols., 2004; Tsai e cols., 2006; Lee e cols., 2009). Desta forma, uma nova linhagem composta pelo gene HA da linhagem Vic87 e pelo gene NA da linhagem Yam88 começou a circular entre a população (Xu e cols., 2004).

Na Figura 1.10, a circulação dos vírus Influenza B e suas respectivas linhagens encontram-se esquematizada ao longo do tempo, desde 1940 até os anos atuais.

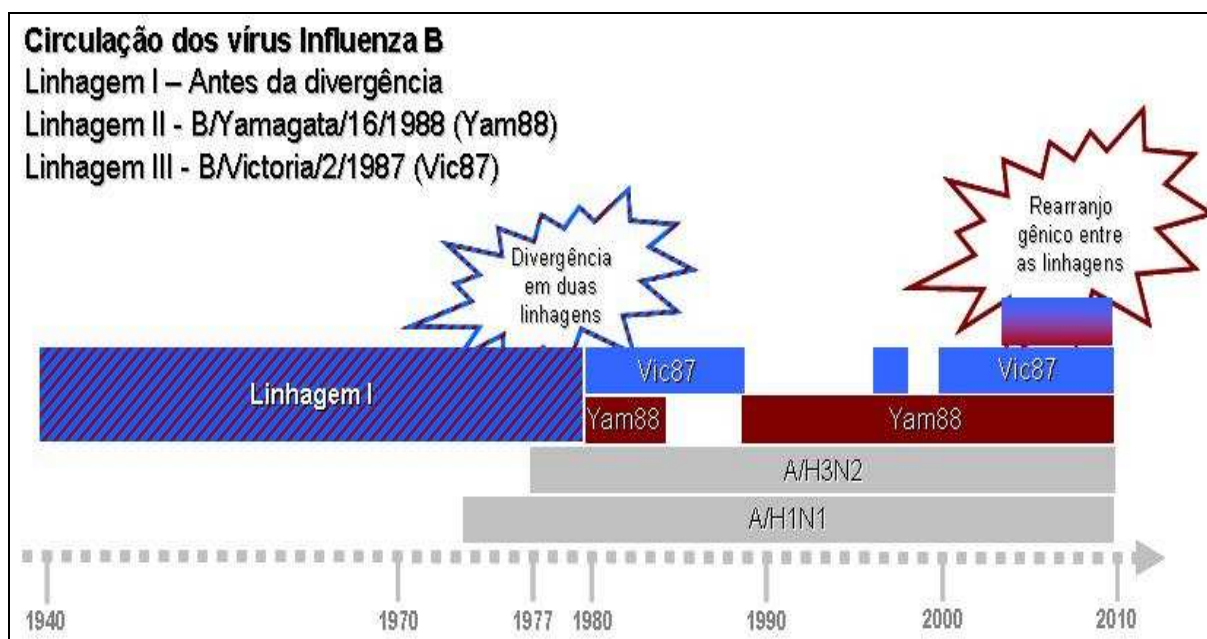


Figura 1.10 – Ilustração esquemática da circulação dos vírus Influenza B ao longo dos anos (1940-2010).

1.5. Aspectos clínicos

A infecção pelos vírus Influenza A e B são clinicamente indistinguíveis. Contudo, a frequência de infecções graves, com necessidade de hospitalização, ocasionadas pela segunda é cerca de quatro vezes menor que para as infecções pelo vírus A (Wright e cols., 2007). A gripe é uma infecção viral aguda do sistema respiratório e pode se manifestar sob diferentes formas clínicas, ocasionando desde infecções assintomáticas até pneumonia viral primária, com rápida evolução para o óbito (Cox e Subbarao, 1999; Eccles, 2005). O período de incubação pode variar de 24 horas a 4-5 dias, dependendo da carga viral e do estado imunológico do hospedeiro (Cox e Subbarao, 1999; Eccles, 2005). A doença associada à infecção pelos vírus influenza B ocorre principalmente em indivíduos de 0 a 18 anos e é mais frequente em zonas rurais do que em ambientes urbanos (Wright e cols., 2007).

Classicamente, o quadro clínico da influenza tem início abrupto, com febre acima de 38°C, cefaléia, calafrios e tosse seca, seguido por mialgia, mal-estar, prostração e anorexia. Pode ocorrer também a inflamação da conjuntiva, com lacrimejamento excessivo. Os sintomas sistêmicos costumam ser muito intensos nos

primeiros dias da doença da doença, mas a tosse e prostração podem persistir por 1 a 2 semanas adicionais, o que caracteriza a alta taxa de morbidade desta virose (Wright e cols., 2007). Entretanto, a doença é autolimitada (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009).

Em crianças, algumas manifestações adicionais podem ser observadas como quadros de bronquite e bronquiolite, aumento na temperatura febril, acompanhado por convulsões e/ou aumento na incidência de manifestações gastrintestinais, como vômitos e dor abdominal, especialmente naqueles menores de 3 anos (Price e cols., 1976; Cox e Subbarao, 1999). A infecção em recém-nascidos pode manifestar-se clinicamente com febre alta inexplicável, podendo levar ao óbito (Meibalane e cols., 1977).

Complicações pulmonares e pneumonia viral primária são responsáveis pela alta taxa de mortalidade (Cox e Subbarao, 1999) e por um grande número de internações hospitalares no Brasil (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010). Estas complicações do trato respiratório inferior podem acometer tanto adultos quanto crianças, sendo mais freqüente em idosos (Wright e cols., 2007). As mais comuns são as pneumonias bacterianas secundárias, sendo geralmente provocadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus* e *Haemophilis influenzae*. Nos imunocomprometidos, o quadro clínico é geralmente mais arrastado e, muitas vezes, mais grave. Gestantes com quadro de influenza no segundo ou terceiro trimestre de gravidez costumam ser mais propensas à internação hospitalar (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009).

Manifestações extrapulmonares como miosite, síndrome de Reye e sintomas gastrointestinais são mais comuns nas infecções pelo vírus influenza B (Baine e cols., 1980; Wright e cols., 2007). A forma difusa da miosite tem início com a diminuição dos sintomas respiratórios, seguido de amolecimento e inchaço dos músculos, podendo ocorrer dor generalizada, sensibilidade e fraqueza muscular. Estes sintomas podem ser acompanhados por insuficiência renal aguda. O curso desta complicação geralmente é benigna e reversível (Dietzman e cols., 1976).

A Síndrome de Reye caracteriza-se por uma encefalopatia de natureza não inflamatória, com progressão rápida, onde são observadas infiltrações gordurosas das vísceras, especialmente no fígado, podendo ocasionar disfunção hepática grave

(Cox e Subbarao, 1999; McCullers e cols., 1999a; Wright e cols., 2007). A taxa de letalidade desta complicação varia entre 22% e 42% (Hurwitz e cols., 1982).

Nas infecções por Influenza, a viremia é infrequente. Em ínfimas quantidades, o vírus já foi isolado no sangue em pacientes no quarto dia de infecção. Na infecção natural ou experimental, o vírus pode ser detectado no sangue durante os três primeiros dias de infecção, nunca após este período. A viremia costuma ser mais comum nas infecções por Influenza A/H5N1 (Beigel e cols., 2005).

As situações reconhecidamente de risco para as infecções por Influenza incluem doença pulmonar crônica (asma e doença pulmonar obstrutiva crônica – DOPC), doença metabólica crônica, cardiopatias, imunodeficiência ou imunodepressão, gestação, doença (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009, 2010)

1.6. Diagnóstico laboratorial e caracterização antigênica e molecular dos vírus Influenza

A qualidade da coleta, acondicionamento e transporte das amostras é imprescindível para a realização do diagnóstico e caracterização viral com resultados fidedignos.

O sítio primário de replicação dos vírus Influenza são as células epiteliais do trato respiratório superior, portanto, o material de escolha para a detecção destes vírus é a secreção de nasofaringe (SNF). A coleta oportuna do material clínico deve ser realizada até o 5^o dia (preferencialmente até o terceiro dia), a partir do início dos sintomas. Os espécimes clínicos podem ser o swab combinado nasal e orofaríngeo (Figura 1.11 – A e B) ou o aspirado de nasofaringe (Figura 1.11 - C) (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009).

Após a coleta, o material deve ser acondicionado em tampão PBS estéril ou em meio de transporte viral, contendo uma solução balanceada de sal com pH neutro, estabilizadores protéicos (gelatina ou albumina de soro bovino) e antibióticos (para reduzir/inibir o crescimento de bactérias comensais ou patogênicas). Para o transporte o material deve ser refrigerado a 4°C ou congelado a -70°C (Zambon, 1998).

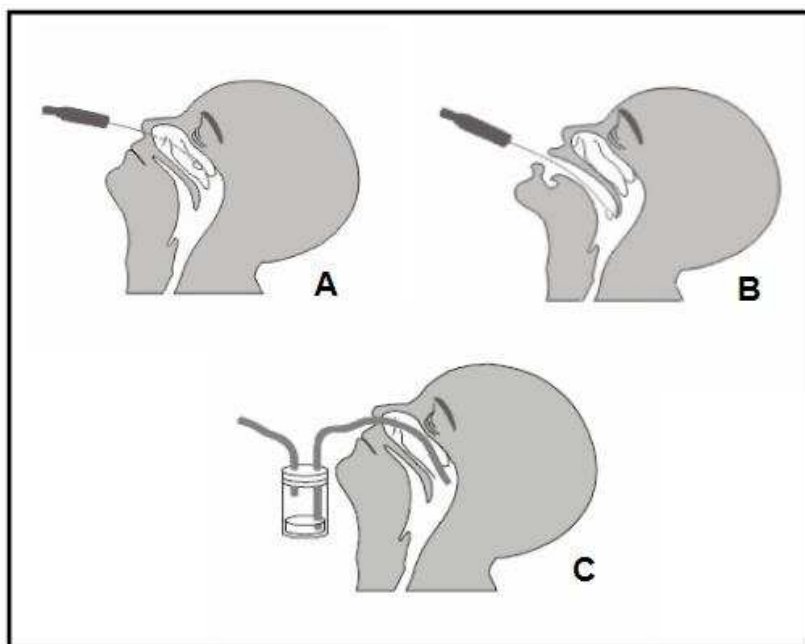


Figura 1.11 – Procedimento para coleta de secreção de nasofaringe, utilizando swab combinado nasal (A) e orofaríngeo (B) e aspirado de nasofaringe (C).

Fonte: Adaptado de (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009).

Diferentes métodos podem ser utilizados para diagnóstico das infecções por Influenza. Contudo, o isolamento viral e a RT-PCR são considerados os ensaios de referência (Centers for Disease Control and Prevention, 2009). As diferentes técnicas utilizadas para o diagnóstico de Influenza encontram-se sumariamente descritas na Tabela 1.2.

O isolamento viral constitui uma das técnicas clássicas para o diagnóstico dos vírus influenza. O cultivo e isolamento viral podem ser realizados utilizando-se ovos embrionados ou linhagens de células de mamíferos (MDCK - *Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells*) (Burnet e Ferry, 1934). Nas últimas, os vírus se replicam, causando efeito citopático, caracterizado pela formação de placas. A replicação viral é detectada pela técnica de hemaglutinação, que se baseia na capacidade aglutinante viral. Uma vez que existem outros patógenos com capacidade hemaglutinante, a identificação de vírus Influenza se dá pelo uso da técnica de inibição da hemaglutinação, onde são utilizados anticorpos específicos. Esta última técnica também pode ser utilizada para subtipagem e caracterização antigênica dos vírus Influenza (Zambon, 1998; Cox e Subbarao, 1999)

Tabela 1.2 - Técnicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial das infecções por Influenza

Técnica	Tipos virais detectados	Amostras clínicas	Tempo
Cultura viral	A e B	Swab de nasofaringe, swab de garganta, lavado nasal ou bronquial, aspirado nasal, catarro	3 dias
Imunofluorescência	A e B	Swab de nasofaringe, swab de garganta, lavado nasal ou bronquial, aspirado nasal, catarro	2-4 horas
RT-PCR	A e B	Swab de nasofaringe, swab de garganta, lavado nasal ou bronquial, aspirado nasal, catarro	2-4 horas
Sorologia	A e B	Soro pareado da fase aguda e convalescente	Mínimo de 2 semanas
Ensaio imunoenzimático	A e B	Swab de nasofaringe, swab de garganta, lavado nasal ou bronquial	2 horas
Testes rápidos			
3M™ Teste Rápido de detecção Flu A+B (3M)	A e B	Swab ou aspirado de nasofaringe; lavado ou aspirado nasal	15 minutos
Directigen EZ Flu A+B (Becton-Dickinson)	A e B	Swab ou aspirado de nasofaringe; lavado ou aspirado nasal, swab de garganta, lavado broncoalveolar	15 minutos
BinaxNOW Influenza A&B (Inverness)	A e B	Swab ou aspirado de nasofaringe; lavado ou aspirado nasal	15 minutos
OSOM® Influenza A&B (Genzyme)	A e B	swab nasal	15 minutos
Teste QuickVue Influenza (Quidel)	Influenza	Swab ou aspirado de nasofaringe; lavado ou aspirado nasal	15 minutos
Teste QuickVue Influenza A+B (Quidel)	A e B	Swab ou aspirado de nasofaringe; lavado ou aspirado nasal	15 minutos
SAS FluAlert (AS Scientific)	A e B	Lavado ou aspirado nasal	15 minutos
TRU FLU (Meridian Bioscience)	A e B	Swab ou aspirado de nasofaringe; lavado ou aspirado nasal	15 minutos
XPECT Flu A&B (Remel)	A e B	Swab ou aspirado de nasofaringe; swab de garganta; lavado ou aspirado nasal	15 minutos

Fonte: Adaptado de (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

Os ensaios de imunofluorescência são amplamente utilizados para o diagnóstico das infecções por Influenza. A técnica baseia-se na detecção de antígenos virais presentes nas amostras clínicas. Após fixação do material clínico em lâmina, anticorpos anti-Influenza marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A reação antígeno-anticorpo é evidenciada pela presença de fluorescência (método direto). No formato indireto, o anticorpo antiviral não é marcado e é detectado por um segundo anticorpo – que é conjugado com FITC. Este segundo anticorpo reconhece imunoglobulinas da espécie utilizada para produzir os anticorpos antivirais. O método indireto é ligeiramente mais sensível e versátil (Minnich e Ray, 1987; Zambon, 1998).

Testes rápidos têm sido desenvolvidos e são capazes de detectar a presença de infecção por Influenza em menos de meia-hora (Tabela 1.2). Estes testes devem ser empregados para auxiliar o diagnóstico e manejo clínico de indivíduos com síndrome gripal em consultórios e hospitais ou em estudos epidemiológicos. Contudo, não são adequados para fins de diagnóstico, dada a sua menor sensibilidade (50-70%) quando comparados às técnicas convencionais (Centers for Disease Control and Prevention, 2009).

A transcrição reversa (RT), seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores específicos constitui a técnica de referência para diagnóstico molecular (Mullis e cols., 1986). O método se baseia na amplificação exponencial das fitas de DNA, contemplando diversos ciclos compostos pelas etapas de desnaturação – anelamento dos iniciadores – e alongamento da cadeia de DNA. Atualmente, existem vários desenhos e variações com base da técnica clássica, como o *nested* RT-PCR, RT-PCR multiplex, PCR em tempo real, dentre outros (Stockton e cols., 1998; Vabret e cols., 2000; Koenig e cols., 2003; Gronesova e cols., 2008; Liu e cols., 2009; World Health Organization, 2009a; Biere e cols., 2010; Wu e cols., 2010).

Para a caracterização molecular dos vírus influenza, o método de referência é o sequenciamento de Sanger (Sanger e cols., 1974). O ensaio se baseia na análise de produtos gerados numa reação de polimerização, utilizando didesoxinucleotídeos (não contém o grupo hidroxil 3' terminal da pentose), marcados com um fluoróforo específico (A, C, T e G). A adição da base modificada pára o crescimento da cadeia de DNA, durante o processo de alongamento, de modo que são gerados fragmentos de diferentes tamanhos. O produto da reação (contendo fragmentos de diferentes tamanhos) é, então, submetido à eletroforese capilar. Os fragmentos são discriminados por excitação com laser de argônio no analisador automático de nucleotídeos. As emissões capturadas são decodificadas indicando as bases específicas, o que viabiliza conhecer a sequência de nucleotídeos do produto amplificado. Contudo, o sequenciamento direto ainda é uma metodologia dispendiosa e poucos laboratórios têm acesso ao equipamento.

Outras metodologias vêm sendo utilizadas para fins de tipagem molecular como a eletroforese em gel com gradientes desnaturantes (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* - DGGE) e ensaios de alta resolução de desnaturação (*High*

Resolution Melting - HRM), baseada na técnica de PCR em tempo real. Ambos têm sido empregados, inclusive para diferenciar variantes do vírus influenza B (Nakagawa e cols., 2009; Biere e cols., 2010).

A metodologia de DGGE – objeto do presente estudo - foi descrita na década de 1980 (Fischer e Lerman, 1983) e é capaz de separar moléculas de DNA diferentes entre si por até um único par de bases (Myers e cols., 1985). Durante a corrida em gel de poliacrilamida, os fragmentos permanecem como fita dupla até alcançarem uma concentração de desnaturantes equivalente ao seu ponto de desnaturação. A partir deste ponto, ocorre a abertura da dupla hélice, o que reduz a mobilidade do fragmento no gel (Sheffield e cols., 1989). Padrões eletroforéticos distintos não são determinados somente pelo número de diferenças nucleotídicas entre as moléculas, mas eles também se diferenciam pelo tipo de base envolvida e a sua posição no fragmento (Harris e Teo, 2001). Esta técnica é mais sensível na identificação de polimorfismos em gel do que as análises por enzimas de restrição (RFLP), comumente utilizadas em estudos epidemiológicos (Zambon, 1998); (Motta e cols., 2002).

A metodologia de DGGE tem sido utilizada para detectar variantes na porção do gene do envelope (*env*) de lentivirus de ovino (Woodward e cols., 1994), do Vírus da Imunodeficiência Símia (Dhar e cols., 2000), e variabilidade genética do HIV-1 durante o ciclo de infecção (Andersson e cols., 1993) e Influenza A/H3N2 ((Motta e cols., 2002).

1.7. Epidemiologia

A gripe ocorre mundialmente, sob a forma de surtos localizados ou regionais, em epidemias ou como pandemias associadas ao *shift* antigênico entre os subtipos de Influenza A. Globalmente, estas infecções ocasionam cerca de 3 a 5 milhões de casos severos, com 250 a 500 mil óbitos (World Health Organization, 2009c).

Em anos epidêmicos, a taxa de ataque na comunidade atinge, aproximadamente, 15%, podendo alcançar até 70%, nas comunidades fechadas. A taxa de ataque secundária é da ordem de 30%. Tanto a morbidade quanto a mortalidade por Influenza podem variar ano a ano, dependendo das cepas circulantes, do grau de imunidade da população geral e da população susceptível

(Chen e Holmes, 2008; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009; World Health Organization, 2009c).

Segundo o Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Influenza (Sivep_Gripe) ao analisar o total de atendimentos nas unidades sentinelas em 2008, 9,5% dos indivíduos apresentaram síndrome gripal (influenza sazonal). A maior concentração dos casos foi em crianças na faixa etária de 0 a 4 anos (43,3%), seguida da faixa de 5 a 14 anos (22,9%) e de 15 a 24 anos (10,9%). As demais faixas contribuíram com 22,8%. No ano de 2008 foram caracterizadas 6317 amostras de secreção nasofaríngea para vírus respiratórios. Destas, 310 (25,7%) amostras foram positivas para o vírus Influenza, das quais 183 (59%) foi Influenza A e 127 Influenza B. Os demais vírus identificados foram: Parainfluenza 1, 2 e 3 (35,1%), Vírus Respiratório Sincicial (28,7%) e Adenovírus (10,5%) (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005).

A distribuição global de Influenza na semana epidemiológica 29 de 2010 encontra-se graficamente representada na Figura 1.12 (World Health Organization, 2010b).

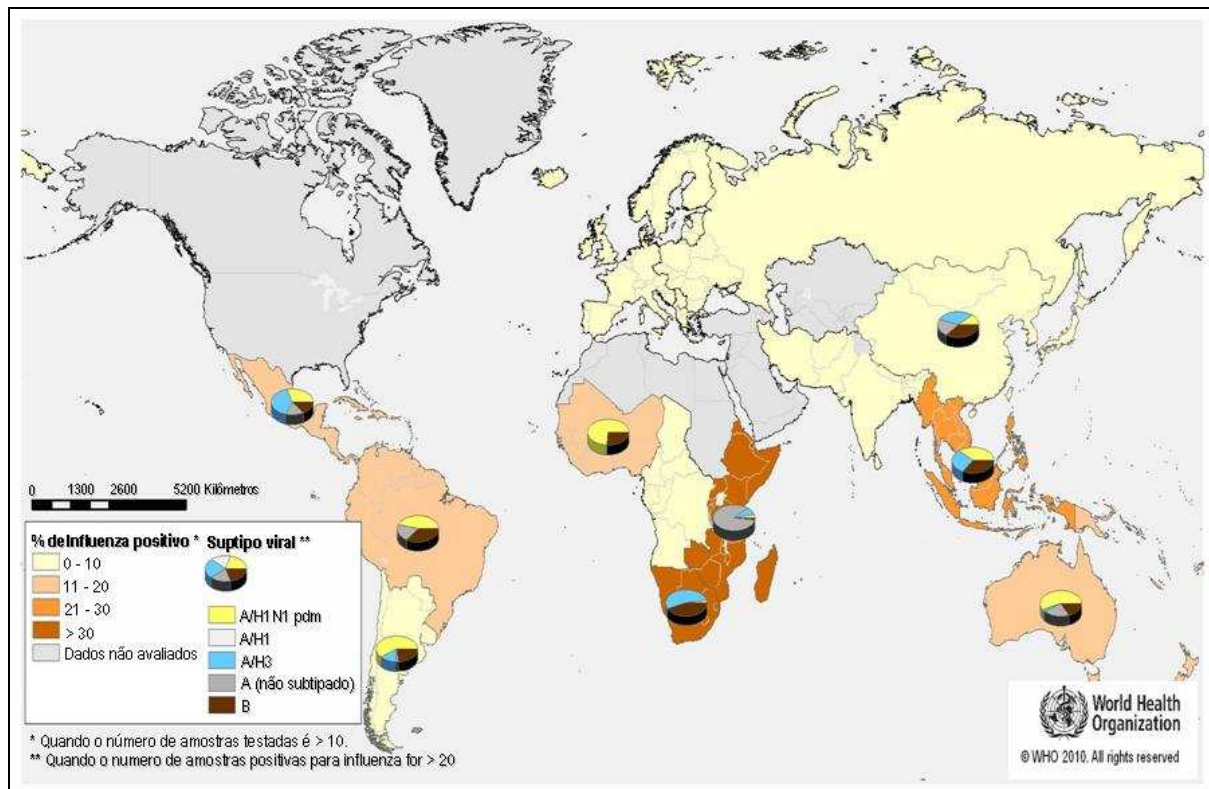


Figura 1.12 - Distribuição de casos confirmados por Influenza, segundo o subtipo e região do mundo no período da semana epidemiológica 29 (18 a 24 de julho).

Fonte: Adaptado de (World Health Organization, 2010b)

As infecções por vírus Influenza apresentam um padrão sazonal (Figura 1.13). Nas regiões temperadas, observamos picos epidemiológicos durante o outono e o inverno, contudo, este padrão costuma ser menos aparente nas regiões tropicais (Shek e Lee, 2003; Viboud e cols., 2006).

Nas áreas tropicais, três padrões podem ser observados: i) ocorrência de infecções o ano todo, com picos nas estações chuvosas (como pode ser visto na Índia, Senegal e Indonésia); ii) ocorrência de infecções o ano todo, com picos semestrais associados à estação chuvosa e durante os meses de inverno; e iii) ocorrência de infecções sem sazonalidade clara (Doraisingham e cols., 1988; Rao e Banerjee, 1993; Shek e Lee, 2003; Beckett e cols., 2004; Chow e cols., 2006; Nguyen e cols., 2007)

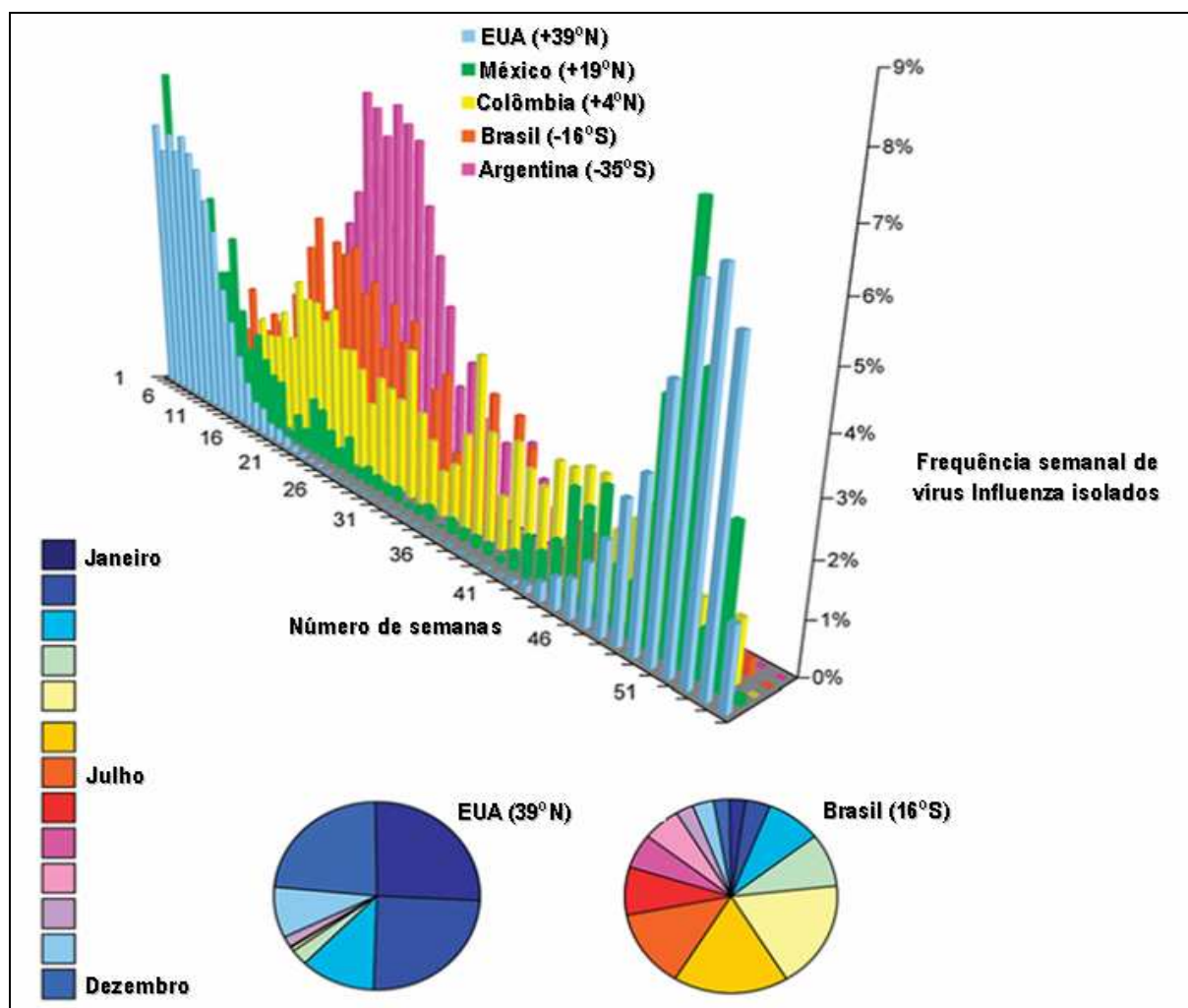


Figura 1.13 - Comparação dos padrões sazonais dos vírus Influenza, em regiões de clima temperado (EUA) e tropicais (Brasil).

Fonte: Adaptado de (Viboud e cols., 2006)

O Brasil é um país com dimensões continentais. Desta forma, engloba uma grande disparidade climática, compreendendo regiões de clima equatorial (região Norte) a subtropical (região Sul). Conseqüentemente são observados diferentes padrões de sazonalidade (de Mello e cols., 2009). Observa-se um gradiente latitudinal no momento do pico da epidemia – no Norte do país, este costuma ocorrer cerca de três meses antes (março-abril) daquele observado na região Sul (Alonso e cols., 2007; de Mello e cols., 2009).

A gripe pode afetar seriamente todas as faixas etárias. A infecção ocasionada pelos vírus Influenza B acomete predominantemente crianças e adolescentes em idade escolar (Clark e cols., 1970). Contudo o risco mais elevado de complicações ocorre entre crianças menores de dois anos de idade, e idosos maiores de 65 anos. Complicações também podem ser observadas em adultos e pessoas de qualquer idade, que apresentam fatores de risco, como: imunocomprometimento; condições crônicas (insuficiência cardíaca, renal, pulmonar e hepática); gestação; e doenças metabólicas (diabetes, obesidade mórbida).

1.7.1. Transmissão

O modo de transmissão mais comum é a transmissão direta (pessoa a pessoa) por meio de pequenas gotículas de aerossol (> 5 milímetros de diâmetro), expelidas por indivíduos infectados com o vírus Influenza ao falar, espirra ou tossir. Contudo eventualmente pode ocorrer transmissão pelo ar, pela inalação de pequenas partículas residuais, que podem ser levadas a distância maiores que um metro. Existem também evidências de transmissão pelo modo indireto, por meio de contato com as secreções dos doentes, onde as mãos são o principal veículo levando a introdução de partículas virais diretamente nas mucosas nasal, oral e ocular. A eficiência de transmissão pela via indireta depende muito da carga viral, de fatores ambientais, como temperatura e umidade, e do tempo transcorrido entre contaminação e contato com a superfície contaminada (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005, 2009).

Apesar da transmissão inter-humana ser a mais comum, vários casos já foram documentados revelando transmissão do vírus Influenza A entre seres de espécies diferentes, especialmente aves e suínos para o homem (Donatelli e cols., 2003; Shinde e cols., 2009; Yassine e cols., 2010). Os vírus estão presentes

principalmente em fezes, sangue e secreções de aves infectadas, portanto a contaminação humana, ainda que rara pode ocorrer por meio da inalação dessas secreções (inclusive durante limpeza e manutenção de criadouros, sem equipamento de proteção individual - EPI) ou durante abate e manuseio de aves infectadas (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005, 2009; Yassine e cols., 2010).

Indivíduos adultos saudáveis infectados podem transmitir o vírus 24 a 48 horas antes do início dos sintomas, porém a títulos muito mais baixos durante o período sintomático, onde o pico da excreção viral é observado nas primeiras 24 a 72 horas de doença e declina até níveis não detectáveis por volta do quinto dia (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005, 2009).

Indivíduos com alto grau de imunodepressão podem excretar vírus por semanas ou meses (Kawai e cols., 2007; Leekha e cols., 2007). As crianças ao serem comparadas com os adultos, também excretam vírus precocemente, por longos períodos e com maior carga viral (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005, 2009).

1.7.2. Vigilância epidemiológica

Devido às características evolutivas e epidemiológicas dos vírus influenza (McCullers e cols., 1999b; Chen e Holmes, 2008), é de fundamental importância a constante vigilância destes vírus, bem como, a rápida identificação de cepas mutantes, com potencial pandêmico.

Na década de 40, já se compreendia que o agente etiológico da gripe não se tratava de um vírus estável, que as epidemias eram provocadas por cepas que sofriam mutações (o que lhes conferia vantagem seletiva sobre as cepas antecessoras) e que as aves migratórias funcionavam como um reservatório para o vírus. Este conjunto de fatores indicava a necessidade de monitoramento contínuo (Nicholson e cols., 2003).

Desde 1947, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu um programa de vigilância que opera através de uma Rede Mundial. Atualmente, esta Rede consiste em quatro principais centros de referência para monitoramento da atividade dos vírus influenza. Esses centros estão localizados em Londres (Inglaterra), Melbourne (Austrália), Atlanta (EUA) e Tóquio (Japão) e tem como

responsabilidade identificar e caracterizar novas cepas virais, enviadas por 130 centros nacionais em 83 países do mundo (World Health Organization, 2009b). Assim, a definição da composição anual das vacinas para Influenza passou a variar, segundo os dados informados por estes centros.

O Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), localizado no Rio de Janeiro, juntamente com o Instituto Adolfo Lutz (IAL), localizado em São Paulo e Instituto Evandro Chagas (IEC), localizado em Belém, fazem parte da Rede nacional de vigilância do vírus Influenza para Organização Mundial de Saúde (OMS) e para o Ministério da Saúde (MS) (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009).

1.8. Tratamento e prevenção

Atualmente além da vigilância epidemiológica dos vírus Influenza são adotadas mais duas estratégias para o controle da circulação viral no mundo, sendo elas, a utilização de drogas antivirais e a vacinação anual antiinfluenza.

1.8.1. Antivirais

Atualmente, existem duas classes de antivirais utilizadas para o tratamento das infecções por Influenza, aprovadas pela agência reguladora americana, o *Food and Drug Administration* (FDA). Os adamantanos (Amantadina e Rimantadina) - que atuam bloqueando os canais de prótons M2, inseridos no envelope lipídico dos vírus Influenza A - e os inibidores de neuraminidase (iNA) (Oseltamivir; Tamiflu[®], Roche e Zanamivir; Relenza[®], GlaxoSmithKline) (Leophonte, 2005).

As primeiras drogas a serem utilizadas foram os adamantanos. Contudo, esta classe de antivirais não bloqueiam os canais de prótons BM2 e NB e, portanto, não são adequadas ao uso nas infecções por Influenza B. Ainda, a emergência de cepas de Influenza A resistentes a estas drogas tem sido observada em diversos países (Fleming, 2001; Saito e cols., 2007; Saito e cols., 2008; Deyde e cols., 2010).

Desde 1999/2000, os iNA (oseltamivir e zanamivir) têm sido utilizados para o tratamento de infecções pelos vírus A e B. No Brasil, o antiviral Oseltamivir é vendido apenas sob prescrição médica (ANVISA, 2000, 2009), sendo indicado apenas para os pacientes que apresentam Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005, 2009).

Alguns autores descrevem a emergência de variantes virais resistentes a esta classe de drogas e algumas mutações associadas à resistência já foram descritas. Os dados de vigilância epidemiológica de Influenza em alguns países indicam que menos de 1% dos vírus Influenza identificados são resistentes aos iNA (McKimm-Breschkin e cols., 2003; Monto e cols., 2006; World Health Organization, 2007a; Sheu e cols., 2008; Kramarz e cols., 2009; Tashiro e cols., 2009). A relevância clínica da doença causada por estas cepas ainda é pouco conhecida (Sheu e cols., 2010; Ujike e cols., 2010).

Os vírus Influenza B apresentam uma maior suscetibilidade ao Oseltamivir quando comparados aos vírus Influenza A (Tashiro e cols., 2009). Para o vírus B, poucos marcadores encontram-se descritos, cuja identificação vem sendo realizada por pirosequenciamento (Lackenby e cols., 2008; Sheu e cols., 2008; Deyde e cols., 2009; Deyde e cols., 2010). Alguns marcadores de resistência aos iNA já identificados para o vírus Influenza B encontram-se descritos na Figura 1.3.

Tabela 1.3 - Marcadores de resistência encontrados na literatura referente à resistência dos vírus Influenza B frente aos inibidores de Neuraminidase.

Mutação na NA		Variante Viral	Referência
B NA	NA N2		
E117A	E119A	B/Beijing/1/87*	(Jackson e cols., 2005)
		B/Illinois/03/2008	(Sheu e cols., 2010)
E117D	E119D	B/Beijing/1/87*	(Jackson e cols., 2005)
E117G	E119G	B/Beijing/1/87*	(Jackson e cols., 2005)
E117V	E119V	B/Beijing/1/87*	(Jackson e cols., 2005)
R150K	R152K	B/Beijing/1/87*	(Jackson e cols., 2005)
		B/Memphis/20/1996	(Gubareva e cols., 1998)
D197N	D198N	B/Rochester/2/2001	(Ison e cols., 2006)
		B/Guatemala/558/2008	(Sheu e cols., 2010)
		B/Canada/88/2007	(Sheu e cols., 2010)
D197E	D198E	B/Texas/38/2008	(Sheu e cols., 2010)
I221T	I222T	B/California/5/2005	(Sheu e cols., 2008)
H273Y	H274Y	B/Michigan/20/2005	(Sheu e cols., 2008)
R292K	R294K	B/Beijing/1/87*	(Jackson e cols., 2005)
R374K	R371K	B/Hong Kong/36/2005	(Sheu e cols., 2008)

*Estudo in vitro com a variante B/Beijing/1/87recombinada.

1.8.2. Vacinas

Conforme anteriormente abordado, os mecanismos evolutivos dos vírus Influenza os tornam capazes de escapar da resposta imune do indivíduo, o que demanda a formulação anual da vacina globalmente utilizada (World Health Organization, 2009c).

As vacinas inativadas são particuladas e compostas, basicamente, pelas glicoproteínas de superfície HA e NA. Estas vacinas são trivalentes, conferindo imunidade para os três vírus Influenza de maior importância epidemiológica: A/H1N1, A/H3N2 e B (Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

No Brasil, a vacina para Influenza sazonal é gratuitamente oferecida para a população de idosos (acima dos 60 anos de idade) e profissionais de saúde. Os demais indivíduos adquirem imunidade contra os vírus por infecção natural, durante as epidemias anuais (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005).

Na última década, a co-circulação e o rearranjo entre os segmentos gênicos das linhagens dos vírus Influenza B vem sendo sinalizada (Shaw e cols., 2002; Ansaldi e cols., 2003; Barr e cols., 2003; Chi e cols., 2003; Matsuzaki e cols., 2004; Lin e cols., 2007; Jian e cols., 2008). E, com isso, a emergência de uma nova variante viral com o segmento de HA da linhagem Yam88 e o segmento de NA da linhagem Vic87 tem sido descrita (Matsuzaki e cols., 2004; Xu e cols., 2004; Chi e cols., 2005; Daum e cols., 2006; Tsai e cols., 2006; Lin e cols., 2007; Chen e Holmes, 2008; Jian e cols., 2008). Este novo cenário motivou a OMS a recomendar a reformulação da vacina (componente do vírus B), que atualmente utiliza a cepa de Influenza B, produto de rearranjo entre as linhagens Vic87 e Yam88 (HAVic/NAYam).

As cepas recomendadas para as vacinas anuais administradas nos Hemisfério Norte (Centers for Disease Control and Prevention, 2001; World Health Organization, 2001a, 2002a; World Health Organization, 2003b; World Health Organization, 2004a, 2005a, 2006a, 2007b, 2008a, 2009d) e Sul (World Health Organization, 2000, 2001b; World Health Organization, 2002b; World Health Organization, 2003a, 2004b, 2005b, 2006b, 2007c, 2008b, 2009e) nos últimos 10 anos encontram-se descritas na Tabela 1.4 .

Tabela 1.4 - Componentes vacinais do Hemisfério Norte e Sul referente aos anos 2000 a 2010.

Hemisfério Norte		Cepas vacinais		
Epidemias	A/H3N2	A/H1N1	B	Linhagem (NA-HA)
2000-01	A/Panama/2007/1999	A/New Caledonia/20/1999	B/Beijing/184/1993	YamHA/YamNA
2001-02	A/Panama/2007/1999	A/New Caledonia/20/1999	B/Sichuan/379/1999	YamHA/YamNA
2002-03	A/Panama/2007/1999	A/New Caledonia/20/1999	B/Hong Kong/330/2001	VicHA/VicNA
2003-04	A/Panama/2007/1999	A/New Caledonia/20/1999	B/Hong Kong/330/2001	VicHA/VicNA
2004-05	A/Fujian/411/2002	A/New Caledonia/20/1999	B/Shanghai/361/2002	YamHA/YamNA
2005-06	A/Califórnia/7/2004	A/New Caledonia/20/1999	B/Shanghai/361/2002	YamHA/YamNA
2006-07	A/Wisconsin/67/2005	A/New Caledonia/20/1999	B/Malaysia/2506/2004	VicHA/VicNA
2007-08	A/Wisconsin/67/2005	A/Solomon Islands/3/2006	B/Malaysia/2506/2004	VicHA/VicNA
2008-09	A/Brisbane/10/2007	A/Brisbane/59/2007	B/Florida/4/2006	YamHA/YamNA
2009-10	A/Brisbane/10/2007	A/Brisbane/59/2007	B/Brisbane/60/2008	VicHA/YamNA
2010-11	A/Perth/16/2009	A/Califórnia/7/2009	B/Brisbane/60/2008	VicHA/YamNA
Hemisfério Sul		Cepas vacinais		
Epidemias	A/H3N2	A/H1N1	B	Linhagem (NA-HA)
2001	A/Panama/2007/1999	A/New Caledonia/20/1999	B/Sichuan/379/1999	YamHA/YamNA
2002	A/Panama/2007/1999	A/New Caledonia/20/1999	B/Sichuan/379/1999	YamHA/YamNA
2003	A/Panama/2007/1999	A/New Caledonia/20/1999	B/Hong Kong/330/2001	VicHA/VicNA
2004	A/Fujian/411/2002	A/New Caledonia/20/1999	B/Hong Kong/330/2001	VicHA/VicNA
2005	A/Wellington/1/2004	A/New Caledonia/20/1999	B/Shanghai/361/2002	YamHA/YamNA
2006	A/Califórnia/7/2004	A/New Caledonia/20/1999	B/Malaysia/2506/2004	VicHA/VicNA
2007	A/Wisconsin/67/2005	A/New Caledonia/20/1999	B/Malaysia/2506/2004	VicHA/VicNA
2008	A/Brisbane/10/2007	A/Solomon Islands/3/2006	B/Florida/4/2006	YamHA/YamNA
2009	A/Brisbane/10/2007	A/Brisbane/59/2007	B/Florida/4/2006	YamHA/YamNA
2010	A/Perth/16/2009	A/Califórnia/7/2009	B/Brisbane/60/2008	VicHA/YamNA

* indica uma mudança na vacina após uma recomendação prévia.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de morfologicamente semelhantes ao vírus Influenza A, os vírus Influenza B apresentam diferenças importantes, inclusive, da perspectiva epidemiológica. Os vírus influenza B circulam predominantemente entre humanos, causam doença menos severa e, desde meados da década de 80, tem sido observada a circulação alternada de duas linhagens (Vic87 e Yam88) antigenica e filogeneticamente distintas durante as epidemias anuais (Chen e Holmes, 2008). A partir de 2001, tais linhagens passaram a co-circular na população, favorecendo o rearranjo gênico entre ambas, já relatado em diversos países (Puzelli e cols., 2004; Xu e cols., 2004; Daum e cols., 2006; Tsai e cols., 2006; Lin e cols., 2007). No Brasil, a epidemiologia molecular dos vírus Influenza B ainda é pouco conhecida e tais informações são de grande relevância, em virtude da formulação anual da vacina para Influenza.

O principal objetivo deste projeto consiste em investigar o perfil de circulação destes vírus durante as epidemias anuais de 2004 a 2008, através da análise filogenética dos fragmentos gênicos de HA e NA, que codificam para as glicoproteínas de superfície, as principais estruturas antigênicas do virion. A vacina trivalente é composta por estes dois antígenos, o que nos permite comparar a adequação dos componentes vacinais frente às linhagens circulantes no Brasil durante este período.

Atualmente, a biologia molecular se torna cada vez mais presente na rotina dos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico clínico. Entretanto, o ensaio de utilizado para a diferenciação entre as duas linhagens virais ainda é o sequenciamento de Sanger, dificultando a sua ampla aplicação para fins de diagnóstico, sendo um método laborioso e de alto custo. Visando buscar novas alternativas metodológicas, de menor complexidade e custo, para a rápida discriminação entre as linhagens de Influenza B, propomos a padronização da metodologia de DGGE, utilizando o segmento gênico da HA. Tal ensaio poderia ser utilizado como uma etapa de triagem, reduzindo o número de amostras a serem submetidas ao sequenciamento nucleotídico e, por conseguinte, permitindo a sua utilização por uma gama mais ampla de laboratórios.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente projeto consiste na análise molecular dos segmentos gênicos de HA e NA, a partir de amostras clínicas coletadas durante as epidemias de Influenza no período de 2004 a 2008, de modo a elucidar o perfil de circulação dos vírus Influenza B no Brasil. De uma perspectiva complementar, é proposta a padronização da técnica de DGGE, para rápida diferenciação das linhagens virais, como ferramenta metodológica alternativa ao sequenciamento de nucleotídeos.

3.2. Objetivos específicos

- Padronização do protocolo de sequenciamento do segmento gênico de NA do vírus Influenza B;
- Sequenciamento e análise filogenética dos segmentos gênicos de HA e NA, utilizando um banco de sequências composto pelas cepas vacinais e amostras de diferentes países;
- Identificação das cepas de Influenza B circulantes em alguns estados do Brasil no período de 2004 a 2008;
- Caracterização molecular dos genes HA e NA: emergência de mutantes e marcadores de resistência a antivirais e presença de rearranjo gênico;
- Padronização da técnica de DGGE para diferenciação rápida das linhagens dos vírus influenza B.

4. METODOLOGIA

4.1. Casuística

O LVRS/IOC-FIOCRUZ constitui o Laboratório de Referência Nacional para o Ministério da Saúde, integrando a Rede Nacional de Vigilância para Influenza. Desta forma, recebe continuamente amostras clínicas (aspirado ou secreção de nasofaringe) de pacientes com síndrome gripal – seja no escopo da vigilância sentinela de Influenza ou na ocorrência de surtos ou epidemias.

Durante as epidemias de 2004 a 2008, foram encaminhadas ao LVRS amostras clínicas provenientes de duas unidades sentinelas da cidade do Rio de Janeiro (Hospital Lourenço Jorge e Hospital Souza Aguiar) e amostras de casos confirmados de influenza por imunofluorescência nos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS) de outros estados brasileiros como Paraná (PR), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS), Minas Gerais (MG), Bahia (BA), Espírito Santo (ES) e Sergipe (SE). Conforme algoritmo previamente estabelecido, estas amostras foram submetidas à técnica de RT-PCR Multiplex (Stockton e cols., 1998), para detecção molecular dos vírus Influenza A (subtipos A/H1 e A/H3), Influenza B e Vírus Respiratório Sincicial (VRS, subtipos A e B).

Do conjunto de amostras positivas para Influenza no teste molecular, 142 foram caracterizadas como Influenza B positivas. Destas, 75 (53%) amostras foram selecionadas para nosso estudo. Os critérios de inclusão compreenderam a disponibilidade de volume suficiente para os ensaios pretendidos e a representatividade em diferentes unidades federadas, sob coordenação direta do LVRS. As demais amostras foram excluídas do estudo, por não atenderem aos critérios estabelecidos.

A distribuição de amostras positivas para Influenza B e o quantitativo de amostras elencadas para o presente estudo, segundo a unidade federada encontram-se descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Distribuição de amostras positivas para Influenza B (N) e quantitativo de amostras utilizadas npara o estudo (n), segundo a unidade federada (2004-2008).

Ano/UF	ES		RJ		MG		PR		SE		BA		SC		RS	
	N	n	N	N	N	n	N	n	N	N	N	n	N	N	N	n
2004	0	(0)	2	(9)	0	(4)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
2005	1	(1)	0	(6)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4	(5)
2006	0	(0)	0	(0)	3	(5)	2	(6)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	8	(16)
2007	0	(0)	1	(10)	1	(3)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4	(5)
2008	0	(1)	0	(1)	15	(18)	10	(20)	1	(1)	5	(5)	1	(3)	17	(23)
Total	1	(2)	3	(26)	19	(30)	12	(26)	1	(1)	5	(5)	1	(3)	33	(49)

Fonte: Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, IOC, FIOCRUZ.

4.2. Etapas do estudo

Para execução deste trabalho, diferentes protocolos e técnicas foram utilizados. Parte deles necessitaram de padronização, como o sequenciamento de nucleotídeos do gene NA e a técnica de DGGE para HA. A última, visando à rápida diferenciação entre as linhagens de Influenza B.

O fluxograma contendo as etapas envolvidas no desenvolvimento do presente estudo encontra-se ilustrado na Figura 4.1.

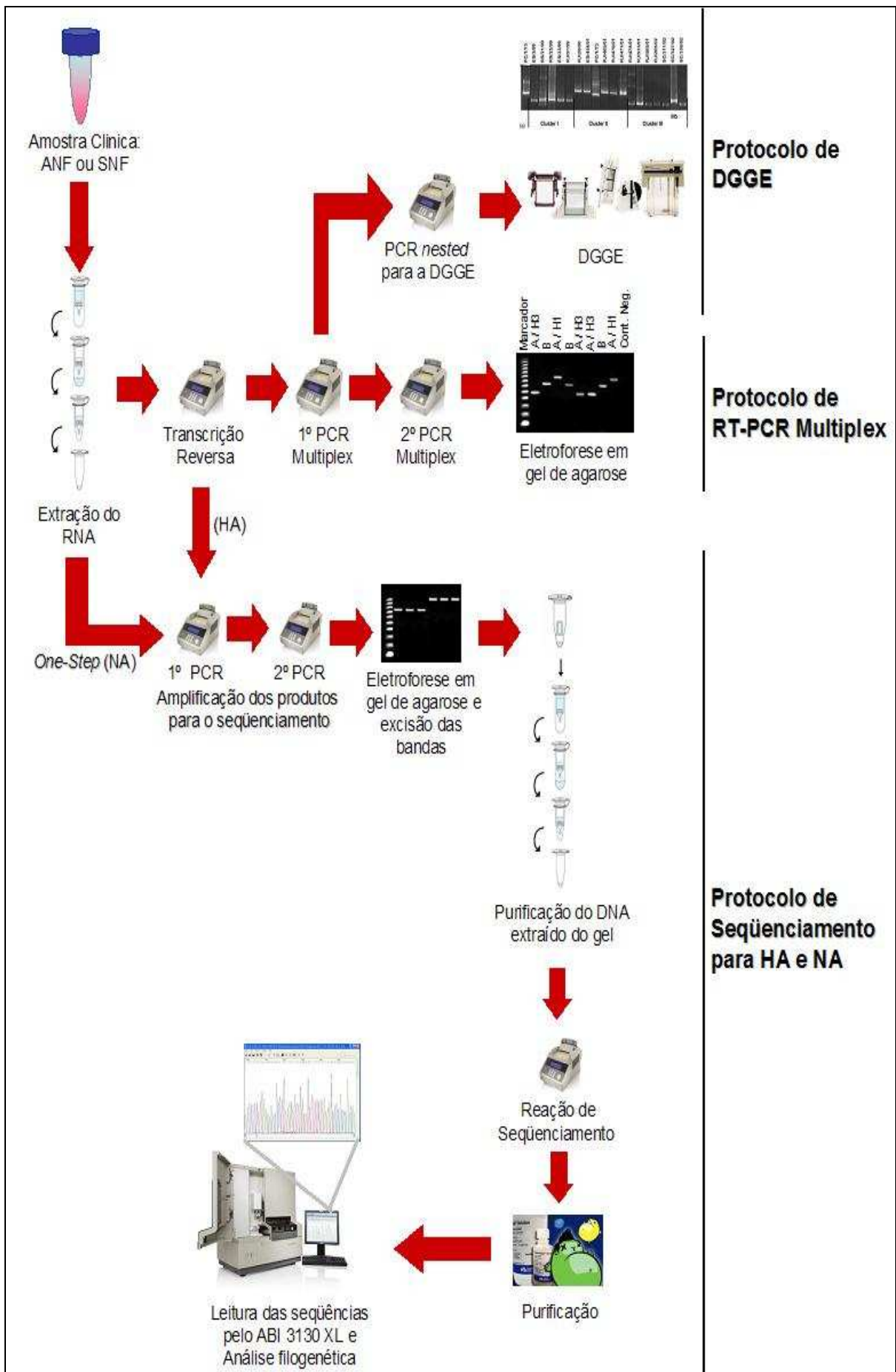


Figura 4.1 - Fluxograma das etapas e técnicas utilizadas para realização do presente estudo.

4.3. Extração de RNA e transcrição reversa

O RNA foi extraído a partir de 140µL da amostra clínica, utilizando o kit comercial QIAamp RNA Viral Mini Kit (QIAGEN Inc., CA). Neste método, a amostra é inicialmente tratada sob condições desnaturantes (tampão AVL) para inativar RNAses e assegurar a liberação do RNA. Condições tamponantes são então ajustadas para permitir uma ligação ótima do RNA à membrana de sílica em gel “QIAamp”. Contaminantes são eliminados em duas etapas de lavagem sucessivas, usando os tampões AW1 e AW2. O RNA é então eluído com o tampão AVE, podendo ser imediatamente usado ou estocado a – 80 °C. A técnica foi realizada seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante, bem como os procedimentos estabelecidos pelo POP-LVRS-TC-006 (FIOCRUZ. LVRS. Motta, 2010c).

A transcrição reversa (RT) para a síntese de DNA complementar (DNAc) foi realizada segundo o POP-LVRS-TVR-012 (FIOCRUZ. LVRS. Motta, 2010e). À mistura contendo 4µL de Tris-HCl a 20mM (pH 8.4), 6µL de MgCl₂ (50mM), 6µL de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP) a 10mM, 1µL da enzima *Myeloblastosis Vírus Reverse Transcriptase* (MMLV) 200U/µL (Invitrogen, USA), 0,4µL de RNAsin 40U/µL (Invitrogen, USA) e 0,4µL de iniciadores randômicos 3,2µg/µL (*Random hexamer primer* - Invitrogen, USA) foi adicionado 22µL do RNAv extraído totalizando um volume final de 40µL.

A mistura + RNA foi submetida a 37°C/60 minutos, com um ciclo final de desnaturação de 95°C/5 minutos, convertendo assim o RNAv a DNAc.

4.4. Amplificação dos fragmentos gênicos da HA pré-sequenciamento

A porção HA1 do segmento gênico da HA dos vírus Influenza B foi sequenciada conforme o POP-LVRS-TC-007 (FIOCRUZ. LVRS. Motta, 2010d). A partir do DNAc, realizamos duas etapas consecutivas de PCR nas quais utilizamos as estratégias ilustradas na Figura 4.2.

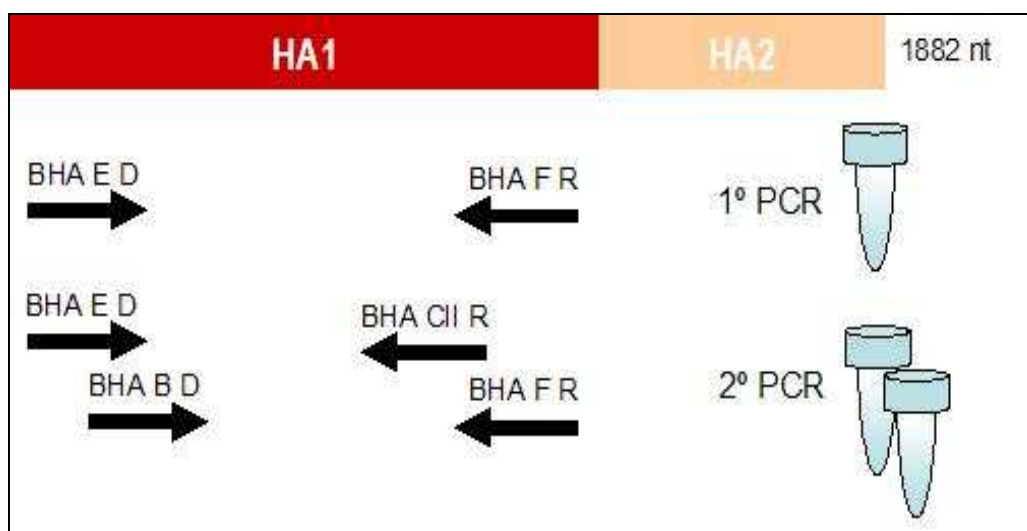


Figura 4.2 - Ilustração da estratégia utilizada para o sequenciamento do fragmento gênico HA1 da Hemaglutinina.

Na primeira PCR, amplificamos um fragmento de aproximadamente 1142 pares de bases (pb) utilizando os iniciadores BHA E direto (D) e o BHA F reverso (R). Na segunda PCR, buscamos gerar produtos menores para o sequenciamento: em uma reação combinamos os iniciadores BHA E D com o iniciador BHACII R (que gera um produto com cerca de 944 pb) e, em outra reação, o iniciador BHAB D com o BHA CII R (753 pb) ou com o BHA F R (927 pb) - dependendo da dificuldade na amplificação do produto para a obtenção da sequência. As sequências e características dos iniciadores encontram-se descritas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Informações gerais dos iniciadores utilizados para o sequenciamento do segmento gênico da Hemaglutinina (domínio HA1).

Nome	Iniciadores		Sequência (5'-3')	GC (%)	T _m (°C)	Tamanho (pb)
	Posição do nucleotídeo (5')					
BHA B d	196		CATTTTGCAAATCTCAAAGC	35	58.7	20
BHA CII r	949		GGTGAAGCAGATTGCCTCCA	55	66.4	20
BHA F r	1123		TTCTTCGGAGCTATTGCTGG	50	63.1	20
BHA E d	5		GAAGCAGAGCATTTTCTAAT	35	48.0	20

GC=Guanina e Citosina, T_m=Temperatura de *melting*; pb=pares de bases; d=direto; r=reverso.

Para a realização da primeira PCR, utilizamos os seguintes componentes: 1µL dos iniciadores a 5pmol/µL; 8µL de Tris-HCl a 20mM (pH 8.4); 2µL de MgCl₂ (50mM); 66,7µL de água livre de DNAses e RNAses; e 0,3µL de enzima Taq Platinum polimerase a 5U/µL (Invitrogen, USA). A esta mistura foram adicionados 22µL do DNAc gerado na reação de RT. Após a mistura os componentes foram submetidos a amplificação com o auxílio de um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), equipamento que permite variar automaticamente as condições de

temperatura e tempo. Para a desnaturação inicial das moléculas, utilizamos a temperatura de 94°C/2min. A seguir, programamos 35 ciclos para amplificação de 94°C/1min para desnaturação, 50°C/1min para hibridização, 72°C/1min para extensão e 1 ciclo final de 72°C/2min.

Na realização da segunda PCR, utilizamos 2µL do produto amplificado na primeira PCR para compor a mistura que contém: 5µL de Tris-HCl a 20mM (pH 8.4); 2,5µL de MgCl₂ (50mM); 37,35µL de água livre de DNAses e RNAses; 0,15 da enzima Taq Platinum polimerase 5U/µL (Invitrogen, USA); 1µL de dNTP (10mM de cada nucleotídeo); e 1µL de iniciadores, direto e reverso. As condições de amplificação destes produtos foram idênticas àquelas descritas para a primeira PCR.

4.5. Padronização da amplificação do fragmento gênico da NA

Os vírus Influenza B apresentam na sexta porção de seu genoma o segmento gênico de NA, composto por 1557 nucleotídeos (Shaw e cols., 1982; Palese e Shaw, 2007). A glicoproteína de superfície de mesmo nome é formada pela tradução em 466 aminoácidos, que se inicia no nucleotídeo 54 e vai até o nucleotídeo 1451 (Shaw e cols., 1982). Com base nestas informações, padronizamos a técnica para a amplificação do segmento gênico de NA, visando o posterior sequenciamento de nucleotídeos.

4.5.1. Desenho dos iniciadores

Para o desenho dos iniciadores, analisamos sequências do gene NA obtidas em vários países e depositadas nas últimas duas décadas no banco de genes (GenBank) do Centro Nacional para Informações Biotecnológicas (*National Center For Biotechnology for Information* – NCBI, *site*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

As sequências de NA foram alinhadas pelo programa Clustal W, parte do pacote MEGA 4.0 (Tamura e cols., 2007), *site*: <http://www.megasoftware.net/>). A seguir, observamos ao longo dos sítios conservados do gene de NA, possíveis locais para síntese dos iniciadores. O cálculo da temperatura dos iniciadores foi realizado utilizando-se o programa AnnHyb4 versão 4 (*site*: <http://www.bioinformatics.org/annhyb/>).

A estratégia para a amplificação pré-sequenciamento do segmento de NA foi idealizada seguindo os moldes de estratégia para a amplificação pré-sequenciamento do segmento HA e encontra-se esquematizada na Figura 4.3.

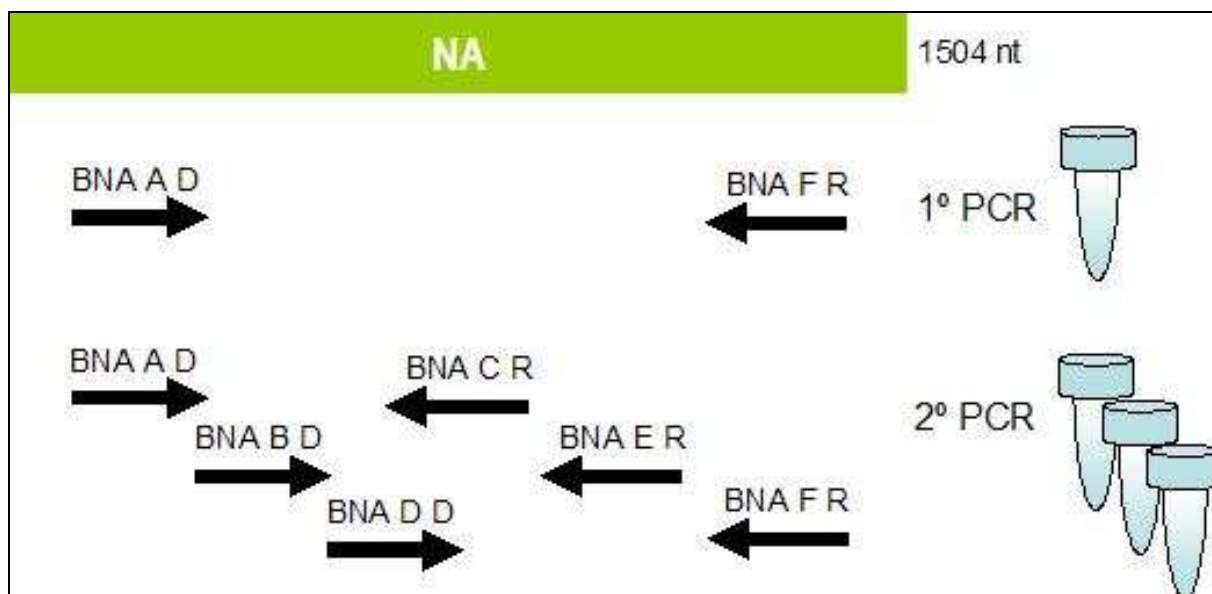


Figura 4.3 - Estratégia idealizada para o desenho dos iniciadores direto e reverso, a serem utilizados na amplificação pré-sequenciamento do segmento gênico de Neuraminidase.

Na primeira PCR, amplificamos um fragmento maior e na segunda PCR, obtivemos três produtos. De maneira estratégica estes iniciadores diretos e reversos da segunda PCR podem ser combinados entre si, gerando diferentes produtos, como exemplo BNA A D e BNA E R.

4.5.2. Primeira e segunda PCR do sequenciamento de NA

Na padronização da primeira PCR, utilizamos o Kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq (Invitrogen, USA), o qual permite a síntese do DNAc e da primeira PCR em único tubo. Tal estratégia agiliza o processo e diminui as chances de contaminação. O protocolo foi realizado seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante. Utilizamos 25µL de mistura da reação (*Reaction Mix 2x*), 2µL dos iniciadores BNA A D e BNA F R, 1µL da enzima Taq Platinum polimerase 5U/µL, 10µL de água livre de DNAses e RNAses e 12µL do RNAv.

Na segunda PCR, trabalhamos com 0,3µL da enzima Taq Platinum polimerase 5U/µL (Invitrogen, USA), 5µL de Tris-HCl a 20mM (pH 8.4), 1,5µL, 1,8 µL ou 2,0µL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen, USA), 1µL de dNTP (10mM de cada

nucleotídeo) e 1µL dos iniciadores a 25 µmolar, de acordo com a estratégia ilustrada na Figura 4.3.

Buscando os melhores parâmetros para o desenvolvimento de uma reação, com bom rendimento e especificidade, três concentrações de MgCl₂ e um gradiente de cinco diferentes temperaturas de anelamento (58°C, 60°C, 61°C, 62°C e 64°C) foram testados. Para tal, utilizamos o termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), que possibilita a construção de gradientes de temperatura facilitando, assim, a padronização da PCR.

4.6. Reação de sequenciamento para os fragmentos gênicos de HA e NA

Todo o volume dos amplicons gerados após a segunda PCR (tanto para os fragmentos gênicos do segmento de HA, quanto para de NA), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para verificação e excisão dos produtos amplificados. Os produtos foram extraídos do gel com uma lâmina de bisturi e armazenados em tubos de 1,5 mL (Eppendorf), livres de RNAses e DNAses. Após excisão, os produtos foram purificados utilizando o kit QIAquick PCR Purification spin columns (QIAGEN, Canadá), conforme descrito no manual do fabricante e no POP-LVRS-TC-004 (FIOCRUZ. LVRS. Motta, 2010b).

O DNA purificado foi quantificado conforme descrito no POP-LVRS-TC-003 (FIOCRUZ. LVRS. Motta, 2010a). A quantificação de DNA baseou-se na comparação da intensidade de brilho do marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, USA) com a intensidade de brilho das bandas dos produtos purificados após a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Sabendo disso realizamos uma eletroforese aplicando 4µL do DNA purificado e do marcador molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, USA) com 2µL do tampão de solubilização de amostra (azul de bromofenol a 0,05% e xileno cianol a 0,05%). A visualização das bandas foi realizada após a revelação do gel em solução de Brometo de Etídeo (10mg/mL) sobre o transiluminador de Ultravioleta (UV). Dessa forma com auxílio da especificação do fabricante foi possível comparar a intensidade de brilho das amostras e quantificar as amostras que apresentaram 40 a 80 ng de DNA, quantidade ideal para realização do sequenciamento.

Após a purificação e quantificação, realizamos a reação de sequenciamento utilizando o Kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems),

conforme descrito no manual do fabricante e no POP-LVRS-TC-007 (FIOCRUZ. LVRS. Motta, 2010d). Este ensaio é baseado no sequenciamento de Sanger, onde ocorre uma reação de polimerização contendo nucleotídeos sem o grupo hidroxil 3` terminal da pentose (didesoxinucleotídeos) e quatro diferentes fluoróforos associados às bases Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G), respectivamente. A presença das bases modificadas bloqueia o processo de alongação, a partir da adição do nucleosídeo, gerando produtos intermediários com a extremidade 5` fluorescente. Para a reação, utilizamos iniciadores específicos para cada fragmento de HA (Tabela 4.2) e NA (sintetizados neste trabalho) numa concentração de 3,2µmolar e uma quantidade de 20 a 40ng do DNA purificado. O volume final da reação foi de 20µL e as condições de desnaturação foram: desnaturação inicial de 96°C/1min, com 30 ciclos de 96°C/10seg, 50°C/5seg e 60°C/4min, sendo que configuramos o termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) para realizar uma rampa de 1°C/seg, facilitando o anelamento dos iniciadores.

Após a reação acima descrita, procedemos à novo processo de purificação, utilizando o Kit de purificação BigDye X Terminator[®] (Applied Biosystems), conforme descrito no manual do fabricante. Este ensaio garante a linearidade da sequência e elimina todos os componentes da reação de sequenciamento não incorporados, como íons de sal, ddNTPs (didesoxinucleotídeos) e dNTPs. O produto purificado (apenas as moléculas de DNA) permanece no sobrenadante, e é injetado nos capilares do sequenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, 16 capilares), através de injeção eletrocinética. Finalmente, a leitura é realizada das sequências de DNA dos fragmentos de NA e HA.

4.7. Alinhamento e análise filogenética dos fragmentos de HA e NA

Os eletroferogramas com a extensão *.ab1, gerados pelo sequenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), foram analisados utilizando-se o programa *Sequencing Analyses*[®] (Applied Biosystems), onde foi avaliada a viabilidade das sequências obtidas. Para o alinhamento das sequências, os arquivos foram inseridos em um projeto, criado com o programa *SeqScape*[®] (Applied Biosystems). Este permite a comparação e montagem dos segmentos gênicos de HA e NA, com base em sequências consenso, construídas a partir de bibliotecas específicas para cada gene. As bibliotecas foram estabelecidas, utilizando-se

sequências nucleotídicas de variantes virais de diferentes regiões do mundo, depositadas no GenBank entre os anos de 2004 a 2008.

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA 4 (Tamura e cols., 2007). As árvores filogenéticas foram construídas com uso do método de agrupamento de vizinhos – *Neighbor-Joining*, NJ (Saitou e Nei, 1987), com re-amostragem – “*bootstrap*”, 1000 repetições (Felsenstein, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas com base na distancia p e todas as posições que continham lacunas de alinhamento (*gaps*) e dados perdidos foram eliminados apenas com a utilização da opção *Pairwise deletion* do programa.

O aminoácido número 1 foi definido como o primeiro aminoácido codificante. Os nucleotídeos foram numerados, utilizando-se a cepa B/Lee/40 como referência, por esta ter sido a primeira amostra identificada de influenza B. Desta forma, a sequência que codifica para o domínio HA1 foi composta por 345 aminoácidos, com o primeiro nucleotídeo localizado na posição 79. A sequência de NA possui 1557 nucleotídeos, codificando 466 aminoácidos, a partir do nucleotídeo localizado na posição 54.

4.8. Identificação das sequências

Todas as amostras sequenciadas foram depositadas no GenBank e os respectivos números de acesso encontram-se relacionados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Números de acesso das sequências dos genes HA e NA do vírus Influenza B obtidas no presente trabalho e depositadas no GenBank. Brasil, 2004-2008.

Identificação	Acesso no GenBank		Identificação	Acesso no GenBank	
	HÁ	NA		HA	NA
B/RJ/792/04	CY063365	CY063431	B/RS/57/08	CY063391	CY063450
B/RJ/809/04	CY063366	CY063432	B/MG/106/08	CY063333	CY063406
B/RS/189/05	CY063369	NR	B/MG/114/08	CY063334	CY063407
B/RS/284/05	CY063370	NR	B/MG/117/08	CY063335	CY063408
B/RS/286/05	CY063371	NR	B/MG/120/08	CY063336	NR
B/RS/294/05	CY063372	NR	B/MG/122/08	CY063337	CY063409
B/ES/347/05	CY063332	NR	B/MG/125/08	CY063338	CY063410
B/MG/459/06	CY063349	NR	B/MG/129/08	CY063339	NR
B/MG/461/06	CY063350	NR	B/SC/150/08	CY063400	CY063452
B/MG/466/06	CY063351	NR	B/RS/157/08	CY063367	CY063433
B/PR/566/06	CY063362	CY063429	B/RS/161/08	CY063368	CY063434
B/RS/707/06	CY063392	NR	B/SE/258/08	CY063401	CY063453
B/RS/710/06	CY063393	NR	B/MG/261/08	CY063340	CY063411
B/RS/714/06	CY063394	NR	B/MG/263/08	CY063341	CY063412
B/RS/734/06	CY063395	CY063451	B/MG/264/08	CY063342	CY063413
B/RS/741/06	CY063396	NR	B/PR/282/08	CY063353	CY063420
B/RS/744/06	CY063397	NR	B/PR/283/08	CY063354	CY063421
B/PR/756/06	CY063363	NR	B/PR/284/08	CY063355	CY063422
B/RS/775/06	CY063398	NR	B/PR/286/08	CY063356	CY063423
B/RS/782/06	CY063399	NR	B/PR/288/08	CY063357	CY063424
B/MG/4/07	CY063348	CY063419	B/PR/290/08	CY063358	CY063425
B/MG/5/07	CY063352	NR	B/PR/292/08	CY063359	CY063426
B/RJ/347/07	CY063380	CY063442	B/PR/293/08	NR	NR
B/RJ/379/07	CY063364	CY063430	B/PR/294/08	CY063360	CY063427
B/RS/397/07	CY063381	NR	B/PR/295/08	CY063361	CY063428
B/RS/398/07	CY063382	NR	B/BA/301/08	CY063330	CY063404
B/RS/399/07	CY063383	NR	B/RS/312/08	CY063373	CY063435
B/BA/25/08	CY063327	NR	B/RS/314/08	CY063374	CY063436
B/BA/26/08	CY063328	CY063402	B/RS/316/08	CY063375	CY063437
B/BA/27/08	CY063329	CY063403	B/RS/317/08	CY063376	CY063438
B/BA/31/08	CY063331	CY063405	B/RS/321/08	CY063377	CY063439
B/RS/44/08	CY063384	CY063443	B/RS/324/08	CY063378	CY063440
B/RS/47/08	CY063385	CY063444	B/RS/327/08	CY063379	CY063441
B/RS/48/08	CY063386	CY063445	B/MG/349/08	CY063343	CY063414
B/RS/52/08	CY063387	CY063446	B/MG/350/08	CY063344	CY063415
B/RS/53/08	CY063388	CY063447	B/MG/351/08	CY063345	CY063416
B/RS/55/08	CY063389	CY063448	B/MG/352/08	CY063346	CY063417
B/RS/56/08	CY063390	CY063449	B/MG/355/08	CY063347	CY063418

NA = Neuraminidase; HÁ = Hemaglutinina; NR = Não Realizado

Para a análise de nossos resultados, utilizamos sequências do vírus Influenza B, depositadas no GenBank e descritas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Número de acesso das sequências das cepas vacinais (genes Hemaglutinina e Neuraminidase), depositadas no Genbank e utilizadas no presente trabalho

Cepas de Influenza B utilizadas na vacina para influenza (Hemisfério Sul)	Linhagem	Período	Número de Acesso (GenBank)	
			HA	NA
B/Lee/40	Linhagem I	-	K00423	J02095
B/Victoria/2/87	HAVic87/NAVic87	-	M58428	AB036870
B/Yamagata/16/88	HAYam88/NAYam88	-	M36105	X67013
B/HongKong/330/01	HAVic87/NAVic87	2004	AF532549	AY139066
B/Shanghai/361/02	HAYam88/NAYam88	2005	AJ784056	EF541477
B/Malaysia/2506/04	HAVic87/NAVic87	2006 e 2007	EU124274	CY038289
B/Florida/4/06	HAYam88/NAYam88	2008 e 2009	CY033876	CY033878
B/Brisbane/60/08	HAVic87/NAYam88	2010	FJ766840	FJ766841

HÁ = Hemaglutinina; NA = Neuraminidase

4.9. Padronização do protocolo de DGGE para o vírus Influenza B

A técnica de DGGE permite a distinção entre moléculas de DNA, com base nas suas características específicas de desnaturação (Fischer e Lerman, 1983). Sendo assim, para escolha de um fragmento alvo que diferenciase as linhagens de influenza B foi necessário que a divergência entre eles fosse significativa quanto ao conteúdo GC e disposição destes nucleotídeos ao longo da molécula. Visamos identificar um fragmento na porção HA1 do gene da hemaglutinina, que atendesse a estas premissas e que apresentasse resultados comparáveis aos obtidos por sequenciamento de nucleotídeos - utilizado como teste de referência, no escopo deste estudo.

4.9.1. Cálculo teórico de desnaturação para aplicação da DGGE

A seleção do fragmento foi realizada utilizando o programa Melt95 (Ingeny, Leiden, Holanda). Este nos possibilita calcular a desnaturação das sequências de nucleotídeos, numa faixa entre 60°C a 100°C. A cada mudança da ordem de 0,2°C, informações são captadas, permitindo identificar a temperatura de desnaturação a cada resíduo.

As informações contidas nos dois arquivos (extensões *.PBR e *.5MM) gerados pelo programa Melt95 podem ser convertidas em gráficos, com o auxílio do programa Excel (Pacote Microsoft Office, Microsoft Corporation). Com o arquivo de

extensão *.PBR geramos, para cada molécula alvo, um gráfico onde podemos visualizar os pontos inicial e final de desnaturação (Gráfico de mobilidade) e a Temperatura de *melting* (T_m) – temperatura na qual 50% da molécula encontra-se desnaturada. O gráfico gerado com o arquivo de extensão *.5MM, evidencia o perfil de desnaturação de cada resíduo no fragmento versus o gradiente de temperatura pré-determinado (Gráfico de desnaturação).

Utilizando o gráfico de desnaturação, analisamos o comportamento dos resíduos 79 a 1119 (porção HA1 do gene de HA), tanto nas sequências-alvo deste estudo como naquelas representantes das sequências vacinais (2004 a 2010). Com base nesta análise, selecionamos um fragmento que permitisse a efetiva diferenciação entre as linhagens de Influenza B. Para avaliar a equivalência e representatividade do fragmento selecionado na utilização da DGGE frente às sequências completas de HA1 da HA do vírus Influenza B, reconstruímos árvores filogenéticas, utilizando os dois conjuntos de sequências.

4.9.2. Desenho dos iniciadores para a *nested* PCR da DGGE

Foram desenhados iniciadores para as regiões conservadas flanqueando o fragmento escolhido. Além da sequência específica, uma sequência complementar rica em GC de 40 bases (Grampo GC) foi adicionada à extremidade 5' do iniciador direto, de modo a maximizar a diferenciação entre sequências com grande identidade (Sheffield e cols., 1989). O programa AnnHyb4 versão 4 foi empregado para avaliar a eficiência dos iniciadores desenhados, analisando a presença de possíveis estruturas secundárias, dímeros entre os iniciadores desenhados, conteúdo GC e a temperatura de desnaturação/hibridização.

4.9.3. Padronização da *Nested* PCR da DGGE

Para a realização da *nested* PCR, utilizamos 2 μ L do produto da primeira PCR do ensaio multiplex. A mistura da reação, com volume de 48 μ L foi composta por: 5 μ L de Tris-HCl a 20mM (pH 8.4), 1 μ L de dNTPs (10mM cada), 1 μ L de iniciadores direto e reverso a 10 μ molar e 0,15 de Taq polimerase Platinum a 5U/ μ L (Invitrogen, USA). A fim de obter relação eficiência x especificidade, foram testadas três concentrações de MgCl₂, 1.5mM, 1.8mM e 2.0mM (Invitrogen, USA).

Visando obter maior estringência no reconhecimento dos iniciadores, testamos diferentes temperaturas de hibridização (58°C a 62°C). Amplificamos os produtos no termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), buscando uma melhor estringência no reconhecimento dos iniciadores. O programa para amplificação compreendeu a desnaturação inicial de 95°C/2min; seguida por 30 ciclos de 95°C/30seg (desnaturação), 58°C a 62°C/1min (hibridização), e 72°C/1min (extensão). Posteriormente, foi realizada uma extensão final de 72°C/5min.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 1x (tampão Tris-borato-EDTA), utilizando 6µL do produto com 2µL do tampão de solubilização de amostra (azul de bromofenol a 0,05% e xileno cianol a 0,05%) e o marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Promega). Após a eletroforese, o gel foi incubado por 10min em solução de Brometo de Etídeo (10mg/mL) e visualizado sobre o transiluminador UV.

4.9.4. Padronização do gel com desnaturantes químicos

Conforme anteriormente descrito, no gráfico de mobilidade observamos o perfil teórico de deslocamento dos fragmentos sob um gradiente de temperatura (60°C a 100°C), bem como a T_m de cada fragmento alvo. Com base nestas informações, estabelecemos a relação entre o gradiente de temperatura e o percentual de uréia/formamida (URF) a ser utilizado na DGGE, aplicando a fórmula, apresentada na Figura 4.4.

$$\text{URF}(\%) = \frac{T_m - 60}{32} \times 100$$

Temperatura de *melting*
Temperatura constante do tampão de corrida do DGGE

Porcentagem de Uréia e Formamida
Constante

Figura 4.4 - Fórmula para conversão da temperatura para o gradiente químico

Fonte: Adaptado de (Motta e cols., 2002)

4.9.1. Confeção do gel de poliacrilamida, com gradiente químico desnaturante

Os experimentos de DGGE foram realizados em cuba de eletroforese do Sistema DCode Universal Mutation Detection (Bio-RAD, Richmond, USA). Os géis de poliacrilamida foram preparados para uma concentração final de 6% (37,5:1 acrilamida:bis-acrilamida) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 0,5x. Utilizamos uma mistura proporcional de duas soluções de poliacrilamida: a primeira - denominada solução 100% -, contendo uréia 7M e formamida desionizada a 40% de uréia (v/v), e a segunda - denominada solução 0% -, desprovida de agentes desnaturantes. As soluções foram misturadas, com o auxílio do equipamento formador de gradiente do sistema de detecção de mutações. A reação de polimerização foi catalisada pela adição de 50µL de persulfato de amônio a 10% e 10µL de N,N,N,N-tetrametilenodiamina (TEMED) por cada 12mL de solução. Sobre o gel de gradiente, foi confeccionado um gel de empilhamento (com concentração final de 6% de poliacrilamida e sem denaturantes químicos), sobre o qual foi fixado o pente de 16 poços. As imagens dos géis foram registradas com auxílio de um sistema digital de captura Gel Doc™ XR (BIO-RAD) e do programa Quantity One®.

4.9.5. DGGE

Após a polimerização, o gel foi inserido na cuba de eletroforese em tampão TAE 1x. A cuba foi aquecida até atingir a temperatura de 60°C, para ser iniciada a aplicação das amostras e a corrida eletroforética.

Para a padronização do tempo de corrida eletroforética, foram aplicados 4µL de tampão de solubilização de amostra (azul de bromofenol a 0,05% e xileno cianol a 0,05%) e 6µL do produto amplificado de amostras filogeneticamente identificadas como representantes das linhagens Vic87 e Yam88. As aplicações no gel foram realizadas em intervalos de uma em uma hora, totalizando três aplicações. A corrida foi conduzida a 60°C por 3 horas, com voltagem de 150V. O tempo de corrida mais eficiente foi selecionado enquanto padrão para os ensaios posteriores.

4.9.6. Validação dos resultados obtidos na DGGE

Para a avaliação da eficiência do protocolo padronizado, confrontamos os resultados obtidos pela DGGE com a identificação das cepas realizada através da análise filogenética das sequências nucleotídicas de Influenza B.

4.10. Aspectos éticos

As amostras clínicas utilizadas neste trabalho foram coletadas no escopo do Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica de Influenza do Ministério da Saúde, o que dispensa a aprovação do Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos.

Neste trabalho, a identidade de todos os pacientes foi preservada, uma vez que as amostras foram identificadas apenas pelo número de registro de entrada no banco de dados do LVRS.

5. RESULTADOS

5.1. Sequenciamento e análise filogenética do gene da hemaglutinina (domínio HA1)

Como a variabilidade antigênica dos vírus Influenza ocorre principalmente no domínio HA1 do gene da hemaglutinina (Wiley e Skehel, 1987), realizamos o sequenciamento desta região nas 75 amostras, previamente caracterizadas como Influenza B. O alinhamento das sequências analisadas encontra-se na Tabela 5.1.

As relações filogenéticas entre as sequências brasileiras de Influenza B e as cepas vacinais utilizadas durante as epidemias de 2004 a 2008 podem ser visualizadas na árvore filogenética ilustrada na Figura 5.1.

O resultado da análise filogenética evidenciou a divergência em duas linhagens distintas: Vic87 e Yam88. Na árvore, observamos a formação de grupos dentro de cada linhagem, aqui denominados conforme se segue: Grupo I/Vic87, Grupo II/Vic87 e Grupo I/Yam88, Grupo II/Yam88, Grupo III/Yam88, respectivamente. Dentre as sequências da linhagem Vic87 (inseridas no grupo da sequência vacinal B/Malaysia/2506/2004) observamos o Grupo I/Vic87, com 41 amostras coletadas nas epidemias de 2006 a 2008. No Grupo II/Vic87 encontramos apenas três amostras detectadas em 2005 e originárias do estado do RS.

É importante destacar que, apesar da cepa vacinal B/HongKong/330/2001 (linhagem Vic87) ter sido utilizada na composição da vacina para influenza do Hemisfério Sul em 2004, na árvore filogenética, esta constituiu um grupo externo em relação às demais sequências da mesma linhagem analisadas neste trabalho.

A cepa vacinal B/Florida/4/2006 - utilizada na composição da vacina do ano de 2008 e 2009 - agrupou-se com as cepas do grupo I/Yam88, circulantes no Brasil em 2006 (n=2), 2007 (n=2) e 2008 (n=8). No grupo II/Yam88, observamos cepas que circularam durante as epidemias de 2004 a 2006. A cepa vacinal utilizada nas epidemias de 2005 e 2006 (B/Shanghai/361/2002), não se agrupou com as sequências brasileiras circulantes naquele período. Finalmente, no grupo III/Yam88 agruparam-se as demais cepas analisadas em 2008.

Tabela 5.1 - Alinhamento do segmento gênico de HA (domínio HA1) referente a 333 aminoácidos (nucleotídeos 79 ao 1078).

B/HongKong/330/2001	DRICTGITSS	NSPHVVKAT	QGEVNVTVGI	PLTTTPTKSH	FANLKGTKTR	GKLCPKCLNC	TDLVALGRP	KCTGNIPSAK	VSILHEVRPV	TSGCFPIIMHD	RTKIRQLPNL	L	[111]
B/Malaysia/2506/2004E.....R.....	[111]
B/Brisbane/60/2008E.....K.....R.....	[111]
B/RS/284/05	-----	-----	-----	-----E.....E.....	[111]
B/RS/286/05	-----	-----	-----	-----E.....E.....	[111]
B/RS/294/05	-----	-----	-----	-----E.....E.....	[111]
B/MG/461/06E.....R.....	[111]
B/RS/710/06E.....R.....	[111]
B/RS/744/06	-----	-----	-----	-----E.....R.....	[111]
B/PR/756/06	-----	-----	-----	-----E.....R.....	[111]
B/RS/782/06	-----	-----	-----	-----E.....R.....	[111]
B/MG/4/07E.....R.....	[111]
B/MG/5/07E.....R.....	[111]
B/RS/347/07E.....R.....I.....	[111]
B/RS/397/07E.....R.....	[111]
B/RS/399/07E.....R.....	[111]
B/BA/25/08E.....R.....	[111]
B/BA/27/08E.....R.....	[111]
B/RS/44/08T.....E.....R.....	[111]
B/RS/47/08E.....R.....	[111]
B/RS/48/08E.....R.....	[111]
B/RS/52/08E.....R.....	[111]
B/RS/55/08E.....R.....	[111]
B/RS/56/08	-----E.....R.....	[111]
B/RS/57/08	H.....E.....R.....	[111]
B/MG/114/08E.....R.....	[111]
B/MG/117/08E.....R.....	[111]
B/MG/120/08E.....L.....R.....	[111]
B/MG/125/08E.....R.....	[111]
B/MG/129/08E.....R.....	[111]
B/SC/150/08	-----	-----	-----	-----E.....R.....	[111]
B/RS/157/08E.....R.....	[111]
B/MG/161/08P.....E.....R.....	[111]
B/SE/258/08E.....R.....	[111]
B/PR/282/08E.....R.....	[111]
B/PR/286/08E.....R.....	[111]
B/PR/288/08L.....E.....R.....	[111]
B/PR/290/08E.....R.....	[111]
B/PR/292/08E.....P.....R.....	[111]
B/PR/294/08E.....R.....	[111]
B/PR/295/08E.....R.....	[111]
B/RS/312/08E.....R.....	[111]
B/RS/316/08E.....R.....	[111]
B/RS/317/08E.....R.....	[111]
B/RS/321/08E.....R.....	[111]
B/RS/327/08	-----	-----	-----	-----E.....R.....	[111]
B/MG/349/08E.....R.....V.....	[111]
B/RJ/792/04	-----	-----	-----	-----YR.....D.....	M.V.TT.....	A.....	[111]
B/RJ/809/04	-----	-----	-----	-----YR.....D.....	M.V.TT.....	A.....	[111]
B/RS/189/05YR.....D.....	M.V.TT.....	A.....	[111]
B/ES/347/05	-----	-----	-----	-----YR.....D.....	M.V.TT.....	A.....	[111]

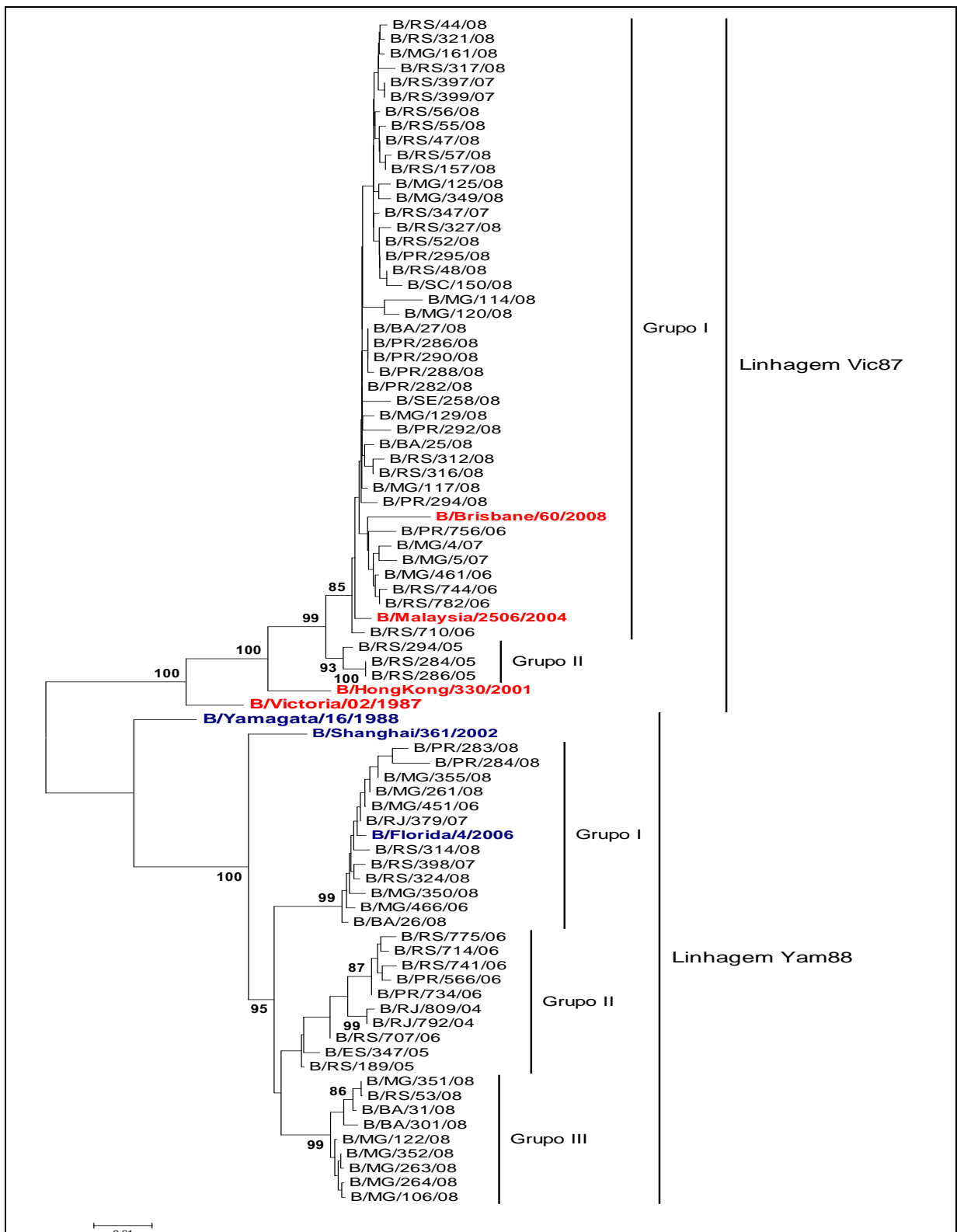
B/HongKong/330/2001	DRICTGITSS	NSPHVVKTAT	QGEVNVTVGI	PLTTTPTKSH	FANLKGTKTR	GKLCPKCLNC	TLDVALGRP	KCTGNIPSAK	VSILHEVRPV	TSGCFPIHMD	RTKIRQLPNL	L	[111]
B/MG/451/06	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/466/06	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/PR/566/06	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----A	-----	[111]
B/RS/707/06	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----A	-----	[111]
B/RS/714/06	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----A	-----	[111]
B/PR/734/06	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----A	-----	[111]
B/RS/741/06	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----A	-----	[111]
B/RS/775/06	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----A	-----	[111]
B/RS/398/07	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/RJ/379/07	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/BA/26/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/BA/31/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/RS/53/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/106/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/122/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/261/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/263/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/264/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/PR/283/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/PR/284/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/BA/301/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/RS/314/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/RS/324/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/350/08	-----	L	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/351/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/352/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/MG/355/08	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]
B/Florida/4/2006	-----	-----	-----	-----Y	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	K	-----	-----	[111]
B/Shanghai/361/2002	-----	-----	-----	-----I	-----R	-----D	-----	M.V.TT	A	-----	-----	-----	[111]

B/HongKong/330/2001	RGYERIRLSN	HNVINA EKAP	GGPYKIGTSG	SCPNVTNGNG	FFATMAWAVP	KNENNKTATN	SLTIEVPYIC	TEGEDQITVW	GFHSDSETQM	AKLYGDSKPQ	KFTSSANGVT	T	[222]
B/Malaysia/2506/2004	...H...T	...N..	..S.	-----	-----	..D.	-----	-----	...N.A.	-----	-----	-----	[222]
B/Brisbane/60/2008	...H...T	...N..	-----	...I.	-----	..DK.	...P.	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/RS/284/05	...H...T	-----	-----	-----	-----	..D.	-----	...I.	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/RS/286/05	...H...T	-----	-----	-----	-----	..D.	-----	...I.	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/RS/294/05	...H...T	-----	-----	...I.	-----	..D.	-----	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/MG/461/06	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..D.	-----	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/RS/710/06	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..D.	-----	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/RS/744/06	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..D.	-----	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/PR/756/06	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/RS/782/06	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..D.	-----	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/MG/4/07	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..D.	-----	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/MG/5/07	...H...T	...N.	-----	...K.	-----	..D.	-----	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/RS/347/07	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	...K.	...N.	AK	-----	-----	[222]
B/RS/397/07	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	...K.	...N.	DK	-----	-----	[222]
B/RS/399/07	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	...K.	...N.	DK	-----	-----	[222]
B/BA/25/08	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	-----	...N.	-----	-----	-----	[222]
B/BA/27/08	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	-----	...N.	DK	-----	-----	[222]
B/RS/44/08	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	...K.	...N.	DK	-----	-----	[222]
B/RS/47/08	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	...K.	...N.	DK	-----	-----	[222]
B/RS/48/08	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	...K.	...N.	DK	-----	-----	[222]
B/RS/52/08	...H...T	...N.	-----	-----	-----	..DK.	-----	...K.	...N.	DK	-----	-----	[222]

B/HongKong/330/2001	RGYERIRLSN	HNVINAEKAP	GGPYKIGTSG	SCPNVTNGNG	FFATMAWAVP	KNENNKTATN	SLTIEVPYIC	TEGEDQITVW	GFHSDSETQM	AKLYGDSKPQ	KFTSSANGVT	T	[222]
B/RS/55/08	. . . H . . . T N DK K N	[222]
B/RS/56/08	. . . H . . . T N DK K N	[222]
B/RS/57/08	. . . H . . . T N DK K N	[222]
B/MG/114/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/MG/117/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/MG/120/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/MG/125/08	. . . H . . . T N DK K N	[222]
B/MG/129/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/SC/150/08	. . . H . . . T N DK K N S	[222]
B/RS/157/08	. . . H . . . T N DK K N	[222]
B/MG/161/08	. . . H . . . T N DK K N	[222]
B/SE/258/08	. . . H . . . T N KDK N	[222]
B/PR/282/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/PR/286/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/PR/288/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/PR/290/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/PR/292/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/PR/294/08	. . . H . . . T N DK N	[222]
B/PR/295/08	. . . H . . . T N DK K N	[222]
B/RS/312/08	. . . H . . . T N DK P N	[222]
B/RS/316/08	. . . H . . . T N DK P N	[222]
B/RS/317/08	. . . H . . . T N DK K N	[222]
B/RS/321/08	. . . H . . . T N DK K N	[222]
B/RS/327/08	. . . H . . . T N DK KK N	[222]
B/MG/349/08	. . . H . . . T N DK K N R	[222]
B/RJ/792/04	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/RJ/809/04	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V . . F NK KN N	[222]
B/RS/189/05	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS V -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/ES/347/05	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N R . . .	[222]
B/MG/451/06	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/MG/466/06	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/PR/566/06	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/RS/707/06	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/RS/714/06	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/PR/734/06	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/RS/741/06	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/RS/775/06	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/RS/398/07	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/RJ/379/07	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/BA/26/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/BA/31/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKI -D . . Y . N P . . V NK KN N	[222]
B/RS/53/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKI -D . . Y . N P . . V NK KN N	[222]
B/MG/106/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKI -D . . Y . N P . . V NK KN N	[222]
B/MG/122/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKI -D . . Y . N P . . V NK KN N	[222]
B/MG/261/08	. . . KN . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/MG/263/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKI -D . . Y . N P . . V NK KN N	[222]
B/MG/264/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKI -D . . Y . N P . . V NK KN N	[222]
B/PR/283/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/PR/284/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/BA/301/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKI -D . . Y . NV P . . V NK KN N	[222]
B/RS/314/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]
B/RS/324/08	. . . N . . . T	Q . . . D RL A . SKS -D . . N P . . V NK KN N	[222]

B/HongKong/330/2001	RGYERIRLSN	HNVINAEKAP	GGPYKIGTSG	SCPNVTNGNG	FFATMAWAVP	KNENNKATN	SLTIEVPYIC	TEGEDQITVW	GFHSDSETQM	AKLYGDSKPQ	KFTSSANGVT	T	[222]
B/MG/350/08	...N...T	Q...D....	...RL....	...A.SKS.	-D..N..	P..V.....NK...KN....N..	[222]
B/MG/351/08	...N...T	Q...D....	...RL....	...A.SKI.	-D.Y.N..	P..V.....NK...KN....N..	[222]
B/MG/352/08	...N...T	Q...D....	...RL....	...A.SKI.	-D.Y.N..	P..V.....NK...KN....N..	[222]
B/MG/355/08	...N...T	Q...D....	...RL....	...A.SKS.	-D..N..	P..V.....NK...KN....N..	[222]
B/Florida/4/2006	...N...T	Q...D....	...RL....	...A.SKS.	-D..N..	P..V.....DK...KN....N..	[222]
B/Shanghai/361/2002	...N...T	Q...D...L	...RL....	...A.SKS.	-D..N..	P..V.....DK...KN....N..	[222]
B/HongKong/330/2001	HYVSQIGGFP	NQTEDGGLPQ	SGRIVVDYMV	QKSGKTGTIT	YQRGILLPQK	VWCASGRSKV	IKGSLPLIGE	ADCLHEKYGG	LNKSKPYTGG	EHAKAIGNCP	IWVKTPLKLA	N	[333]
B/Malaysia/2506/2004	[333]
B/Brisbane/60/2008	[333]
B/RS/284/05	[333]
B/RS/286/05	[333]
B/RS/294/05	[333]
B/MG/461/06	[333]
B/RS/710/06	[333]
B/RS/744/06	[333]
B/PR/756/06S..	[333]
B/RS/782/06	[333]
B/MG/4/07	..I.....	[333]
B/MG/5/07	[333]
B/RS/347/07	[333]
B/RS/397/07D..	[333]
B/RS/399/07D..	[333]
B/BA/25/08	[333]
B/BA/27/08	[333]
B/RS/44/08	[333]
B/RS/47/08	[333]
B/RS/48/08	[333]
B/RS/52/08	[333]
B/RS/55/08	[333]
B/RS/56/08	[333]
B/RS/57/08	[333]
B/MG/114/08	[333]
B/MG/117/08	[333]
B/MG/120/08	[333]
B/MG/125/08	[333]
B/MG/129/08S	[333]
B/SC/150/08	[333]
B/RS/157/08	[333]
B/MG/161/08	[333]
B/SE/258/08	[333]
B/PR/282/08	[333]
B/PR/286/08	[333]
B/PR/288/08	[333]
B/PR/290/08	[333]
B/PR/292/08K..	[333]
B/PR/294/08	[333]
B/PR/295/08	[333]
B/RS/312/08	[333]
B/RS/316/08	[333]
B/RS/317/08V..Y..	[333]
B/RS/321/08	[333]

B/HongKong/330/2001	HYVSQIGGFP	NQTEDGGLPQ	SGRIVVDYMV	QKSGKTGTIT	YQRGILLPQK	VWCASGRSKV	IKGSLPLIGE	ADCLHEKYGG	LNKSKPYYTG	EHAKAIGNCP	IWVKTPLKLA	N	[333]
B/RS/327/08													[333]
B/MG/349/08													[333]
B/RJ/792/04		D		M	P	V	V						[333]
B/RJ/809/04		D		M	P	V	V						[333]
B/RS/189/05		D		M	P	V	V						[333]
B/ES/347/05		D		M	P	V	V						[333]
B/MG/451/06	S	D		M	P	V	V						[333]
B/MG/466/06	S	D		M	P	V	V						[333]
B/PR/566/06		D		M	P	V	V						[333]
B/RS/707/06		D		M	PR	V	V						[333]
B/RS/714/06		D		M	P	V	V						[333]
B/PR/734/06		D		M	P	V	V						[333]
B/RS/741/06		D		M	P	V	V						[333]
B/RS/775/06		D		M	P	V	V						[333]
B/RS/398/07	S	D		M	P	V	V	R					[333]
B/RJ/379/07	S	D		M	P	V	V						[333]
B/BA/26/08	S	D		M	P	V	V						[333]
B/BA/31/08	D	D		M	P	V	V						[333]
B/RS/53/08	D	D		M	P	V	V						[333]
B/MG/106/08	D	D		M	P	V	V						[333]
B/MG/122/08	D	D		M	P	V	V						[333]
B/MG/261/08	S	D		M	P	V	V	R					[333]
B/MG/263/08	D	D		M	P	V	V						[333]
B/MG/264/08	D	D		M	P	V	V						[333]
B/PR/283/08	S	D		M	P	V	V	R					[333]
B/PR/284/08	S	D		M	P	V	V	R	K				[333]
B/BA/301/08	D	D		M	P	V	V						[333]
B/RS/314/08	S	D		M	P	V	V			F			[333]
B/RS/324/08	S	D		M	P	V	V	R					[333]
B/MG/350/08	S	D		M	P	V	V						[333]
B/MG/351/08	D	D		M	P	V	V						[333]
B/MG/352/08	D	D		M	P	V	V						[333]
B/MG/355/08	S	D		M	P	V	V	R					[333]
B/Florida/4/2006	S	D		M	P	V	V						[333]
B/Shanghai/361/2002		D		P	V	V							[333]



Os valores de *bootstrap* acima de 85% encontram-se indicados próximo aos ramos. A distância evolucionária foi calculada pela distância p (Felsenstein, 1985). Os números de acesso das sequências das cepas vacinais utilizadas encontram-se a seguir: B/Brisbane/60/2008 (FJ766840), B/Malaysia/2506/2004 (EU124274) e B/HongKong/330/2001 (AF532549) da linhagem Vic87 (em vermelho); e B/Shanghai/361/2002 (AJ784056) e B/Florida/4/2006 (CY033876) da linhagem Yam88 (em azul), e as sequências padrões B/Victoria/02/1987 (M58428) e B/Yamagata/16/1988 (M36105).

Figura 5.1 - Relação filogenética das cepas de Influenza B (região HA1 do gene HA) circulantes no Brasil de 2004 a 2008 inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Saitou e Nei, 1987).

A distribuição das sequências brasileiras, segundo a linhagem de Influenza B e ano de coleta encontra-se representada na Figura 5.2. Do total de 75 amostras, 44 (59%) foram classificadas como linhagem Vic87 e 31 (41%), Yam88.

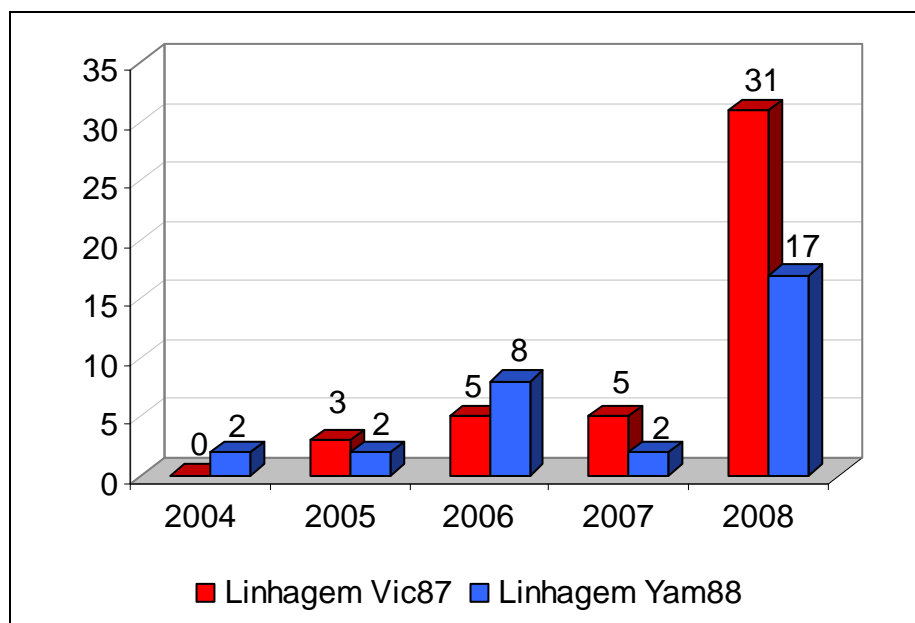


Figura 5.2 – Distribuição das amostras sequenciadas para o domínio HA1 (gene HA) do vírus Influenza B, segundo a linhagem e o ano de coleta (2004 a 2008).

Em 2004, as duas amostras analisadas foram da linhagem Yam88, ao passo que das cinco amostras coletadas em 2005, três foram da linhagem Vic87 e duas da Yam88. Em 2006, um maior número de amostras foi analisado, sendo oito da linhagem Yam88 e cinco Vic87. Durante a epidemia de 2007, sete amostras foram investigadas, duas da linhagem Yam88 e cinco Vic87. Finalmente, das 48 amostras de Influenza B no ano de 2008, 31 eram da linhagem Vic87 e 17 da linhagem Yam88.

5.1.1. Variabilidade na sequência de aminoácidos do gene HA - Linhagem Vic87

Em 2005, a cepa utilizada na formulação vacinal foi a B/Shanghai/361/2002 (linhagem Yam88). Contudo, das cinco cepas circulantes no Brasil naquele ano, identificamos três cepas da linhagem Vic87, todas do RS. Por esta razão, comparamos sequência de aminoácidos das cepas brasileiras frente às vacinais da linhagem Vic87, utilizadas nos anos de 2004 (B/HongKong/330/2001) e 2006-2007 (B/Malaysia/2506/2004). Os respectivos resultados podem ser observados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Vic87 circulantes durante a epidemia de 2005, em relação às cepas vacinais dos anos de 2004 (B/HongKong/330/2001) e 2006/2007 (B/Malaysia/2506/2004).

Amostras	Resíduos de aminoácidos										
	48	80	116	121	129	134	146	164	190	197	199
B/Hong Kong/330/2001	K	K	R	N	K	P	V	E	V	S	T
B/RS/284/2005		E	H	T				D	I	N	
B/RS/286/2005		E	H	T				D	I	N	
B/RS/294/2005	-	E	H	T			I	D		N	
B/Malaysia/2506/2004	E	R	H	T	N	S	V	D	V	N	A
B/RS/284/2005	K	E			K	P			I		T
B/RS/286/2005	K	E			K	P			I		T
B/RS/294/2005	-	E			K	P	I				T

Sequências compostas por aproximadamente 365 aminoácidos e pertencentes à linhagem Vic87. K=Lisina; R=Arginina; N=Asparagina; P=Prolina; V=Valina; E=Ácido Glutâmico; S=Serina; T=Treonina; H=Histidina; I=Isoleucina; D=Ácido Aspártico; A=Alanina.

Um total de sete substituições foram observadas nas sequências de 2005. Ao serem comparadas com a cepa vacinal de 2004 (B/Hong Kong/330/2001), foram observadas cinco substituições (K80E, R116H, N121T, E164D e S197N). Se comparadas à cepa vacinal 2006-2007 (B/Malaysia/2506/2004), encontramos substituições do aminoácido Valina (V) por Isoleucina (I) (V146I e V190I), em posições distintas. Outras substituições como E48K, N129K, S134P, A199T também foram observadas.

Dez amostras dos anos de 2006 (N=5) e 2007 (n=5) foram comparadas com a sequência de HA da cepa vacinal B/Malaysia/2506/2004 (2006 e 2007). As substituições encontram-se descritas na Tabela 5.3.

As substituições S134P e A199T foram encontradas em todas as sequências de 2006-2007. Apresentaram somente estas duas substituições três sequências do RS e uma de MG de 2006. A amostra do PR (B/PR/756/2006) de 2006 apresentou quatro substituições (S134P, N165K, A199T e G230S). Outras substituições foram encontradas em cinco sequências (linhagem Vic87) da epidemia de 2007. Duas sequências do estado de MG apresentaram três substituições, duas encontradas em todas as sequências (S134P e A199T) e outra específica para cada amostra, N148K para a amostra B/MG/5/2007 e V225I para B/MG/4/2007. As outras três amostras provenientes do estado do RS e RJ apresentaram cinco substituições. Quatro substituições S134P, T128K, N165K e A199T estavam presentes nas três sequências. A quinta foi específica para cada amostra, a sequência do RJ

(B/RJ/347/2007) apresentou a substituição V87I e as sequências do RS (B/RS/397/2007 e B/RS/399/2007) a substituição G230D.

Tabela 5.3 – Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Vic87 circulantes durante as epidemias de 2006 e 2007, em relação às cepas vacinais dos anos de 2004 (B/HongKong/330/2001) e 2006/2007 (B/Malaysia/2506/2004).

Amostras	Resíduos de aminoácidos							
	87	134	148	165	182	199	225	230
B/Malaysia/2506/2004	V	S	N	N	T	A	V	G
B/MG/461/2006		P				T		
B/RS/710/2006		P				T		
B/RS/744/2006		P				T		
B/RS/782/2006		P				T		
B/PR/756/2006		P		K		T		S
B/MG/4/2007		P				T	I	
B/MG/5/2007		P	K			T		
B/RJ/347/2007	I	P		K	K	T		
B/RS/397/2007		P		K	K	T		D
B/RS/399/2007		P		K	K	T		D

Sequências compostas por aproximadamente 365 aminoácidos e pertencentes à linhagem Vic87.

V=Valina; S=Serina; N=Asparagina; T=Treonina; A=Alanina; G=Glicina; P=Prolina; K=Lisina; I=Isoleucina; e D=Ácido Aspártico.

As substituições observadas nas sequências de 2008 encontram-se descritas na Tabela 5.4. Naquele ano, a cepa vacinal utilizada foi a B/Florida/4/2006 (Yam88). Como parte das sequências encontraram-se agrupadas com as cepas da linhagem Vic87, utilizamos a cepa vacinal B/Malaysia/2506/2004 (Yam88, componente vacinal de 2006 e 2007) para fins de comparação.

Substituições nos resíduos S134P, N165K e A199T foram comuns às 31 sequências brasileiras de Vic87 da epidemia de 2008. Sete sequências (B/BA/25/2008, B/BA/27/2008, B/MG/114/2008, B/MG/117/2008, B/PR/282/2008, B/PR/286/2008 e B/PR/294/2008) apresentaram somente estas três substituições. Substituições adicionais foram encontradas em outras sequências: B/RS/57/08 (N11H); B/MG/120/08 (I76L); B/MG/129/08 (T262S), B/SE/258/08 (N163K), B/PR/292/08 (L58P e R279K); B/RS/312/08 e B/RS/316/08 (S172P).

Assim como algumas sequências de 2007, um grupo do ano de 2008 apresentou a mesma mutação, T182K. Dentro deste grupo, algumas sequências apresentaram substituições específicas como: S12T (B/RS/44/2008) ou S12P (B/MG/161/08); P210S (B/SC/150/08); D294V e N320Y (B/RS/317/08); E183K (B/RS/327/08); e I83V e K212R (B/MG/349/08).

Tabela 5.4 - Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Vic87 circulantes durante a epidemia de 2008, em relação à cepa vacinal dos anos de 2006/2007 (B/Malaysia/2506/2004).

Amostras	Resíduos de aminoácidos																		
	11	12	58	76	83	134	163	165	172	182	183	199	210	212	262	279	294	320	
B/Malaysia/2506/2004	N	S	L	I	I	S	N	N	S	T	E	A	P	K	T	R	D	N	
B/SE/258/2008						P	K	K				T							
B/BA/25/2008						P		K				T							
B/BA/27/2008						P		K				T							
B/MG/114/2008						P		K				T						-	
B/MG/117/2008						P		K				T							
B/MG/120/2008				L		P		K				T							
B/MG/125/2008						P		K		K		T							
B/MG/129/2008						P		K				T			S				
B/MG/161/2008		P				P		K		K		T							
B/MG/349/2008					V	P		K		K		T		R					
B/SC/150/2008	-	-				P		K		K		T	S						
B/RS/157/2008						P		K		K		T							
B/RS/44/2008		T				P		K		K		T							
B/RS/47/2008						P		K		K		T							
B/RS/48/2008						P		K		K		T							
B/RS/52/2008						P		K		K		T							
B/RS/55/2008						P		K		K		T						-	
B/RS/56/2008						P		K		K		T							
B/RS/57/2008	H					P		K		K		T							
B/RS/157/2008						P		K		K		T							
B/RS/312/2008						P		K	P			T							
B/RS/316/2008						P		K	P			T							
B/RS/317/2008						P		K		K		T					V	Y	
B/RS/321/2008						P		K		K		T							
B/PR/282/2008						P		K				T							
B/PR/286/2008						P		K				T							
B/PR/288/2008		L				P		K				T							
B/PR/290/2008						P		K				T							
B/PR/292/2008			P			P		K				T				K			
B/PR/294/2008						P		K				T							
B/PR/295/2008						P		K		K		T							

Sequências compostas por aproximadamente 365 aminoácidos e pertencentes à linhagem Vic87.

N=Asparagina; S=Serina; L=Leucina; I=Isoleucina; T=Treonina; E=Ácido Glutâmico; A=Alanina; P=Prolina; K=Lisina; R=Arginina; D=Ácido Aspártico; H=Histidina; V=Valina; e Y=Tirosina.

5.1.2. Variabilidade na sequência de aminoácidos do gene HA - Linhagem Yam88

As sequências de HA representantes da linhagem Yam88 analisadas durante as epidemias de 2004 a 2007 foram comparadas com as sequências das cepas vacinais (linhagem Yam88) utilizadas nas epidemias de 2005 (B/Shanghai/361/2002) e de 2008-2009 (B/Florida/4/2006), como pode ser visualizado na Tabela 5.5. A cepa vacinal de 2006-2007 (B/Malaysia/2506/2004) não foi comparadas com as sequências da linhagem Yam88, pois pertence a linhagem Vic87.

Tabela 5.5 - Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Yam88 circulantes durante as epidemias de 2004 a 2007, em relação às cepas vacinais dos anos de 2005 (B/Shanghai/361/2002) e 2008-2009 (B/Florida/4/2006).

Amostras	Posições dos aminoácidos													
	37	40	48	88	108	131	159	179	197	212	230	252	256	272
B/Shanghai/361/02	I	H	R	R	P	L	A	Y	D	K	G	V	G	K
B/Florida/4/06	T	Y	R	K	P	P	A	Y	D	K	S	M	G	K
B/RJ/792/2004	-			R					N		G			
B/RJ/809/2004	-			R				F	N		G			
B/ES/347/2005			K	R					N	R	G			
B/RS/189/2005				R			V		N		G			
B/MG/451/2006	-			R					N					
B/MG/466/2006				R					N					
B/RS/707/2006				R	A				N		G		R	
B/RS/714/2006	-			R	A				N		G			
B/RS/741/2006	-			R	A				N		G			
B/RS/775/2006	-			R	A				N		G			
B/PR/566/2006	-			R	A				N		G			
B/PR/734/2006				R	A				N		G			
B/RJ/379/2007				R					N					
B/RS/398/2007				R					N					R

Sequências compostas por aproximadamente 365 aminoácidos e pertencentes à linhagem Yam88. I=Isoleucina; H=Histidina; R=Arginina; P=Prolina; L=Leucina; A=Alanina; Y=Tirosina; D=Ácido Aspártico; K=Lisina; G=Glicina; V=Valina; C=Cisteína; T=Treonina; S=Serina; M=Metionina; N=Asparagina; e F=Fenilalanina.

Todas as sequências de HA referentes às amostras da linhagem Yam88 das epidemias de 2004 a 2007 apresentaram as substituições K88R e D197N, quando comparadas com a cepa vacinais 2008-2009 (B/Florida/4/2006). Duas amostras do estado de MG e uma do RJ (B/MG/451/2006, B/MG/466/2006 e B/RJ/379/2007) apresentaram somente estas duas substituições.

A substituição S230G foi encontrada em amostras do grupo II/Yam88 (Figura 5.1). Apresentaram esta substituição as duas sequências de 2004 (B/RJ/792/2004 e B/RJ/809/2004), duas de 2005 (B/RS/189/2005 e B/ES/347/2005) e seis da região sul do Brasil de 2006 (B/PR/566/2006; B/RS/707/2006; B/RS/714/2006; B/PR/734/2006; B/RS/741/2006 e B/RS/775/2006) que também apresentam a alteração P108A. A exceção foi a sequência B/RS/707/06 que apresenta uma substituição a mais na posição G256R. As sequências de 2004 e 2005 não exibem a alteração P108A. Contudo, três delas possuem outros tipos de alterações, como as sequências das amostra B/RJ/809/04 (Y179F), B/RS/189/05 (A159V) e B/ES/347/05 (R48K e K212R).

As sequências de 2008 da linhagem Yam88 foram comparadas com as cepas vacinais das epidemias de 2005 (B/Shanghai/361/2002) e de 2008-2009 (B/Florida/4/2006). Esta comparação pode ser visualizada na Tabela 5.6.

Todas as sequências de 2008 da linhagem Yam88 apresentaram as substituições K88R e D197N assim como as sequências de 2004 a 2007. Contudo, outras substituições foram também observadas. As sequências mais próximas a HA da cepa vacinal B/Florida/4/2006 (2008 e 2009) foram as 12 localizadas no grupo I/Yam88 (Figura 5.1). Neste grupo encontramos as sequências que apresentaram somente as duas substituições comuns (K88R e D197N) - B/MG/451/2006, B/MG/466/2006, B/RJ/379/2007 e B/BA/26/2008. E ainda cinco amostras que possuíram, além das substituições citadas, a alteração no aminoácido K272R. Entre estas cinco sequências, duas se destacaram por apresentarem outros tipos de alterações, B/MG/261/08 (E115K) e B/PR/284/08 (Y40H e R279K).

As sequências B/RS/314/08 e B/MG/350/08 apresentaram as substituições C321F e V15L, respectivamente, além das substituições K88R e D197N.

As nove sequências de 2008 que compõem o grupo III/Yam88 (Figura 5.1) apresentaram cinco substituições, duas comuns a todas as sequências da linhagem Yam88 de 2004 a 2008 (K88R e D197N) e três nos resíduos S150I, N166Y e S230D. Dentro deste grupo duas amostras se destacam por possuírem uma alteração adicional além das já encontradas, B/MG/264/08 (N171K) e B/BA/301/08 (A169V).

Tabela 5.6 - Substituições nos resíduos de aminoácidos (domínio HA1) nas sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Yam88 circulante durante a epidemia de 2008, em relação às cepas vacinais dos anos de 2005 (B/Shanghai/361/2002) e 2008-2009 (B/Florida/4/2006).

Amostras	Posições dos aminoácidos															
	15	37	40	88	115	131	150	166	169	171	197	230	252	272	279	321
B/Shanghai/361/2002	V	I	H	R	E	L	S	N	A	N	D	G	V	K	R	C
B/Florida/4/2006	V	T	Y	K	E	P	S	N	A	N	D	S	M	K	R	C
B/BA/26/2008				R							N					
B/BA/31/2008				R			I	Y			N	D				
B/BA/301/2008				R			I	Y	V		N	D				
B/MG/106/2008				R			I	Y			N	D				
B/MG/122/2008				R			I	Y			N	D				
B/MG/261/2008				R	K						N			R		
B/MG/263/2008				R			I	Y			N	D				
B/MG/264/2008				R			I	Y		K	N	D				
B/MG/350/2008	L			R							N					
B/MG/351/2008				R			I	Y			N	D				
B/MG/352/2008				R			I	Y			N	D				
B/MG/355/2008				R							N			R		
B/RS/53/2008				R			I	Y			N	D				
B/RS/314/2008	-	-	-	R							N					F
B/RS/324/2008				R							N			R		
B/PR/283/2008				R							N			R		-
B/PR/284/2008	-	-	H	R							N			R	K	-

Sequências compostas por aproximadamente 365 aminoácidos e pertencentes à linhagem Yam88.

V=Valina; I=Isoleucina; H=Histidina; R=Arginina; E=Ácido Glutâmico; L=Leucina; S=Serina; N=Asparagina; A=Alanina; D=Ácido Aspártico; G=Glicina; K=Lisina; C=Cisteína; T=Treonina; Y=Tirosina; P=Prolina; M=Metionina; e F=Fenilalanina.

5.2. Desenho dos iniciadores e padronização do protocolo de PCR para o sequenciamento do gene NA.

Para o sequenciamento do segmento gênico NA – segundo a estratégia anteriormente descrita –, desenhamos três pares de iniciadores, cujas características encontram-se descritas na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Sequências e características dos iniciadores utilizados para o sequenciamento do segmento gênico NA do vírus Influenza B.

Iniciadores		Sequência (5´-3´)	GC (%)	T _m (°C)	Tamanho (pb)
Nome	Posição do nucleotídeo 5´				
BNA A d	81	ACCCTATTTCTCACATCAGGGG	50	63.9	22
BNA B d	415	CTTGTGGACCAAAGGAATGC	50	63.2	20
BNA C r	590	GTCCGCATGCCATGATGGTA	55	67.9	20
BNA D d	882	TGCACATGCGGATTTGCCAG	55	71.4	20
BNA E r	1018	ATTTGGACACCCCCAGACCA	55	67.5	20
BNA F r	1372	CAGCAGCAACAGCCATTTACTG	50	65.6	22

T_m = Temperatura de *melting*; NA = Neuraminidase; d = direto; r = reverso.

Os iniciadores foram desenhados para gerar três amplicons com o tamanho de aproximadamente 500pb (Figura 4.3). Contudo, para diminuir a quantidade de amplicons, foram testadas outras combinações. Dentre elas, utilizamos os pares de iniciadores BNA A direto com o BNA E reverso e BNA B direto com BNA F, gerando produtos de aproximadamente 800pb. A maioria das amostras foram sequenciadas com esta estratégia.

A transcrição reversa e a amplificação do produto da primeira PCR para sequenciamento foram realizadas em único tubo. Quando testadas diferentes temperaturas de hibridização dos iniciadores, não observamos diferença visual significativa nas respectivas bandas, após a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Assim, padronizamos a temperatura de 55°C para anelamento dos primers - a mais elevada dentre as testadas.

Visando otimizar os produtos gerados na segunda PCR, foram testadas três concentrações de MgCl₂ (1.5, 1.8 e 2.0mM) e oito condições de hibridização (temperaturas entre 53°C e 70°C). Como resultado não foram encontradas diferenças entre os produtos obtidos com as diferentes concentrações de MgCl₂, adotamos a concentração intermediária de 1,8mM. Com relação à temperatura de anelamento dos iniciadores, utilizamos a temperatura de 62°C, pois verificamos que,

acima desta temperatura, ocorria a diminuição do brilho das bandas eletroforéticas, e a partir de 66°C, não foi possível observá-las.

5.3. Sequenciamento e análise filogenética do gene NA

Cinqüenta e duas amostras, provenientes de sete estados brasileiros foram submetidas ao protocolo de sequenciamento automático. Quarenta e quatro amostras oriundas dos estados da BA, SE, MG, PR, RJ, RS e SC foram coletadas durante a epidemia de 2008. As demais (n=8) foram coletadas em outros anos: duas amostras do RJ do ano de 2004, duas detectadas em 2006, sendo uma do PR e outra do RS e três em 2007, duas do RJ e uma de MG. O alinhamento das sequências analisadas encontra-se na Tabela 5.8.

Comparando o alinhamento das sequências obtidas neste trabalho com as sequências vacinais dos anos de 2006 e 2007 (B/Malaysia/2506/2004, linhagem Vic87) e 2008-2009 (B/Florida/4/2006, linhagem Yam88) construímos a árvore filogenética ilustrada Figura 5.3.

Após a análise filogenética, observamos um grande grupo filogenético da linhagem Vic87, denominado Grupo I/Vic87, o qual foi dividido em quatro subgrupos (Ia, Ib, Ic e Id/Vic87).

O Grupo I/Vic87 foi composto por 29 sequências, sendo duas da epidemia de 2007 e o restante da epidemia de 2008. Os subgrupos Ib e Ic/Vic87 compreenderam somente sequências de 2008. Entretanto, encontramos uma sequência de 2007 dentro do subgrupo Ia/Vic87, e outra (B/MG/4/2007) mais distante filogeneticamente de todas as outras analisadas.

As sequências da linhagem Yam88, foram caracterizadas dentro de dois grupos, denominados Grupo I/Yam88, no qual temos dois subgrupos (Ia e Ib/Yam88) e Grupo II/Yam88. Dentro do Grupo I/Yam88, o subgrupo Ia incluiu nove amostras da epidemia de 2008 e no subgrupo Ib temos separadas filogeneticamente as duas únicas sequências de 2004. E no Grupo II/Yam88, observamos duas sequências do sul do Brasil coletadas em 2006, uma do RJ do ano de 2007 e oito da epidemia de 2008. As sequências deste grupo possuíram maior similaridade com a cepa vacinal B/Florida/4/2006 (2008-2009).

Tabela 5.8 - Alinhamento das 52 seqüências de NA dos vírus Influenza B.

B/Malaysia/2506/2004	MLPSTIQTLT	LFLTSGGVLL	SLYVSASLSY	LPYSDILLKF	PSTEITAPTM	PLDCANASNV	QAVNRSATKG	VTLLLPEPEW	TYPRLSCPGS	TFQKALLISP	HRFGETKGN	A	[111]
B/Victoria/02/87L...	.L.....	SP.K.I....	S.....	.A.H...E	M.F.....Q..A....		[111]
B/RJ/792/2004	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.H....		[111]
B/RJ/809/2004	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.H....		[111]
B/RS/734/2006	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.A....R..		[111]
B/PR/566/2006	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/RJ/379/2007	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/BA/26/2008	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/BA/31/2008	-----	-----L...	.L.....	SR...I..I.		[111]
B/RS/53/2008	-----	-----L...	.L.....	SR...I..I.		[111]
B/MG/106/2008	-----	-----L...	.L.....	SR...G.I.		[111]
B/MG/122/2008	-----	-----L...	.L.....	SR...G.I.		[111]
B/MG/261/2008	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/MG/263/2008	-----	-----L...	.L.....	SR...G.I.		[111]
B/MG/264/2008	-----	-----L...	.L.....	SR...G.I.		[111]
B/PR/283/2008	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/PR/284/2008	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/BA/301/2008	-----	-----L...	.L.....	SR...I..I.		[111]
B/RS/314/2008	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/RS/324/2008	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/MG/350/2008	-----	-----V...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/MG/351/2008	-----	-----L...	.L.....	SR...I..I.		[111]
B/MG/352/2008	-----	-----L...	.L.....	SR...G.I.		[111]
B/MG/355/2008	-----	-----L...	.L.....	SQ...I..I.		[111]
B/Florida/4/2006L...	.L.....	SQ...I..I.A....		[111]
B/Yamagata/16/88L...	.L.....	SP...KV	M...S...Q..	SR...		[111]
B/MG/4/2007	-----	-----L...	.L.....	SP.....		[111]
B/RJ/347/2007	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/BA/27/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/44/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/47/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/48/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/52/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/55/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/56/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/57/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/MG/114/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/MG/117/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/MG/125/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/SC/150/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/157/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/161/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/SE/258/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/PR/282/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/PR/286/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/PR/288/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/PR/290/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/PR/292/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...K.		[111]
B/RS/294/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/PR/295/2008	-----	-----L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]
B/RS/312/2008	-----	-----I.L...	.L.....	SP.....	H...T...		[111]

B/Malaysia/2506/2004	MLPSTIQTLT	LFLTSGGVLL	SLYVSASLSY	LPYSDILLKF	PSTEITAPTM	PLDCANASNV	QAVNRSATKG	VTLLLPEPEW	TYPRLSCP GS	TFQKALLISP	HRFGETK GNS	A	[111]
B/RS/316/2008	-----	-----L.....	SP.....		H.....						[111]
B/RS/317/2008	-----	-----L.....	SP.....		H.....	T...					[111]
B/RS/321/2008	-----	-----L.....	SP.....		H.....	T...					[111]
B/RS/327/2008	-----	-----L.....	SP.....		H.....	T...					[111]
B/MG/349/2008	-----	-----L.....	SP.....		H.....	T...					[111]
B/Malaysia/2506/2004	PLIIREPFIA	CGPKECKHFA	LTHYAAQPGG	YYNGTRGDRN	KLRHLISVKL	GKIPTVENS I	FHMAAWSGSA	CHDGKEWTYI	GVDGPDNNAL	LKIKYGEAYT	DTYHSYANNI	L	[222]
B/Victoria/02/87E...	.N.....			R.....	S...	I.....			[222]
B/RJ/792/2004E...				R.....	S...		K..		[222]
B/RJ/809/2004E...				R.....	S...		K..		[222]
B/RS/734/2006T.....E...					.V	S...		K..	[222]
B/PR/566/2006T.....E...					.V	S...		K..	[222]
B/RJ/379/2007E...						S...		K..	[222]
B/BA/26/2008T.....E...						S...		EK..	[222]
B/BA/31/2008E...				R.....	S...			K..	[222]
B/RS/53/2008E...				R.....	S...			K..	[222]
B/MG/106/2008E...				R.....	S...			K..	[222]
B/MG/122/2008E...				R.....	S...			K..	[222]
B/MG/261/2008T.....	.R.....	.E...						S...		K..	[222]
B/MG/263/2008E...				R.....	S...			K..	[222]
B/MG/264/2008E...				R.....	S...			K..	[222]
B/PR/283/2008M.....E...						S...		K..	[222]
B/PR/284/2008T.....E...						S...		K..	[222]
B/BA/301/2008E...				R.....	S...			K..	[222]
B/RS/314/2008T.....E...						S...		K..	[222]
B/RS/324/2008T.....E...						S...		K..	[222]
B/MG/350/2008T.....E...						S...		K..	[222]
B/MG/351/2008E...				R.....	S...			K..	[222]
B/MG/352/2008E...				R.....	S...			K..	[222]
B/MG/355/2008T.....E...						S...		K..	[222]
B/Florida/4/2006T.....E...						S...		K..	[222]
B/Yamagata/16/88E...				R.....	S...	I.....			[222]
B/MG/4/2007S.....									DK..	[222]
B/RJ/347/2007N.....										[222]
B/BA/27/2008N.....										[222]
B/RS/44/2008N.....										[222]
B/RS/47/2008N.....										[222]
B/RS/48/2008										[222]
B/RS/52/2008N.....										[222]
B/RS/55/2008N.....										[222]
B/RS/56/2008N.....										[222]
B/RS/57/2008N.....										[222]
B/MG/114/2008N.....										[222]
B/MG/117/2008	LN.....			LN.....							[222]
B/MG/125/2008N.....										[222]
B/SC/150/2008N.....										[222]
B/RS/157/2008N.....										[222]
B/RS/161/2008N.....										[222]
B/SE/258/2008N.....										[222]
B/PR/282/2008N.....										[222]
B/PR/286/2008N.....										[222]
B/PR/288/2008N.....										[222]

B/Malaysia/2506/2004	PLIIREPFIA	CGPKECKHFA	LTHYAAQPGG	YYNGTRGDRN	KLRHLISVKL	GKIPTVENS I	FHMAAWSGSA	CHDGKEWTYI	GVDGPDNNAL	LKIKYGEAYT	DTYHSYANNI	L	[222]
B/PR/290/2008		.N											[222]
B/PR/292/2008		.N											[222]
B/RS/294/2008		.N											[222]
B/PR/295/2008		.N											[222]
B/RS/312/2008		.N											[222]
B/RS/316/2008		.N											[222]
B/RS/317/2008		.N											[222]
B/RS/321/2008		.N											[222]
B/RS/327/2008		.N											[222]
B/MG/349/2008		.N											[222]
B/Malaysia/2506/2004	RTQESACNCI	GGNCYLMITD	GSASGVSECR	FLKIREGR II	KEIFPTGRIK	HTEECTCGFA	SNKTIECACR	DNSYTAKRPF	VKLNVEDTDA	EIRLMCTETY	LDTPRPDDGS	I	[333]
B/Victoria/02/87		.D	.I.K		.VE								[333]
B/RJ/792/2004		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/RJ/809/2004		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/RS/734/2006		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/PR/566/2006		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/RJ/379/2007		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/BA/26/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/BA/31/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/RS/53/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/MG/106/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/MG/122/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/MG/261/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/MG/263/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/MG/264/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/PR/283/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/PR/284/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/BA/301/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/RS/314/2008		.D	.P.I	.V	.V						.N		[333]
B/RS/324/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/MG/350/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/MG/351/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/MG/352/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/MG/355/2008		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/Florida/4/2006		.D	.P.I		.V						.N		[333]
B/Yamagata/16/88		.D	.I.K		.VE								[333]
B/MG/4/2007					.V						.D		[333]
B/RJ/347/2007					.V						.D		[333]
B/BA/27/2008					.V	R					.D		[333]
B/RS/44/2008					.V						.D		[333]
B/RS/47/2008					.V						.D		[333]
B/RS/48/2008					.V						.D		[333]
B/RS/52/2008					.V						.D		[333]
B/RS/55/2008					.V						.D		[333]
B/RS/56/2008					.V						.D		[333]
B/RS/57/2008					.V						.D		[333]
B/MG/114/2008					.V						.D		[333]
B/MG/117/2008					.V	R					.D		[333]
B/MG/125/2008					.V						.D		[333]
B/SC/150/2008					.V						.D		[333]
B/RS/157/2008					.V						.D		[333]

B/Malaysia/2506/2004	RTQESACNCI	GGNCYLMITD	GSASGVSECR	FLKIREGRII	KEIFPTGRIK	HTEECTCGFA	SNKTIEACACR	DNSYTAKRPF	VKLNVEDTDA	EIRLMCTETY	LDTPRPDDGS	I	[333]
B/RS/161/2008						.V.				.D.			[333]
B/SE/258/2008						.V.				.D.			[333]
B/PR/282/2008						.V.				.D.			[333]
B/PR/286/2008					R.	.V.				.D.			[333]
B/PR/288/2008					R.	.V.				.D.			[333]
B/PR/290/2008					R.	.V.				.D.			[333]
B/PR/292/2008						.V.				.D.			[333]
B/RS/294/2008						.V.				.D.			[333]
B/PR/295/2008						.V.				.D.			[333]
B/RS/312/2008					R.	.V.				.D.			[333]
B/RS/316/2008					R.	.V.				.D.			[333]
B/RS/317/2008						.V.				.D.			[333]
B/RS/321/2008						.V.				.D.			[333]
B/RS/327/2008						.V.				.D.			[333]
B/MG/349/2008						.V.			.N.	.D.			[333]

B/Malaysia/2506/2004	TGPCESNGDK	GSGGIKGGFV	HQRMASKIGR	WYSRTMSKTK	RMGMGLYVKY	DGDPWADSDA	LAFSGVMVSM	EEPGWYSFGF	EIKDKKCDVP	CIGIEMVHDG	GKETWWSAAT	A	[444]
B/Victoria/02/87	.E.	.R.		.E	.E	.T.	.P.	K.			.K.		[444]
B/RJ/792/2004						.T.	.E.	.L.					[444]
B/RJ/809/2004						.T.	.E.	.L.					[444]
B/RS/734/2006	.D.			.N.		.T.	.E.	.L.					[444]
B/PR/566/2006	.D.					.T.	.E.						[444]
B/RJ/379/2007	.D.					.T.	.E.	.L.					[444]
B/BA/26/2008	.D.					.T.	.E.	.L.					[444]
B/BA/31/2008						.T.	.E.	.L.					[444]
B/RS/53/2008						.T.	.E.	.L.					[444]
B/MG/106/2008						.T.	.E.	.L.					[444]
B/MG/122/2008						.T.	.E.	.L.					[444]
B/MG/261/2008	.D.N.		.T.			.T.	.E.	.L.					[444]
B/MG/263/2008						.T.	.E.	.L.					[444]
B/MG/264/2008						.T.	.E.	.L.					[444]
B/PR/283/2008	.D.					.T.	.E.	.L.					[444]
B/PR/284/2008	.D.					.T.	.E.	.L.					[444]
B/BA/301/2008						.T.	.E.	.L.					[444]
B/RS/314/2008	.D.					.T.	.E.	.L.					[444]
B/RS/324/2008	.D.					.T.	.E.	.L.					[444]
B/MG/350/2008	.D.					.T.	.E.	.L.					[444]
B/MG/351/2008						.T.	.E.	.L.					[444]
B/MG/352/2008						.T.	.E.	.L.			.T.		[444]
B/MG/355/2008	.D.N.					.T.	.E.	.L.					[444]
B/Florida/4/2006	.D.					.T.	.E.	.L.			.T.		[444]
B/Yamagata/16/88		.R.		.E	.E	.T.	.P.	K.			.K.		[444]
B/MG/4/2007				.E				K.					[444]
B/RJ/347/2007				.E	.E			K.					[444]
B/BA/27/2008				.E		.T.		K.					[444]
B/RS/44/2008				.E				K.	.R.				[444]
B/RS/47/2008			.T.	.E				K.					[444]
B/RS/48/2008				.E	.E			K.					[444]
B/RS/52/2008				.E				K.					[444]
B/RS/55/2008			.T.	.E				K.					[444]
B/RS/56/2008				.E	.E			K.					[444]
B/RS/57/2008			.T.	.E				K.					[444]

B/Malaysia/2506/2004	TGPCESNGDK	GSGGIKGGFV	HQRMASKIGR	WYSRTMSKTK	RMGMGLYVKY	DGDPWADSDA	LAFSGVMVSM	EEPGWYSFGF	EIKDKKCDVP	CIGIEMVHDG	GKETWHSAAAT	A	[444]
B/MG/114/2008	E	K	-	[444]
B/MG/117/2008	E	T	K	-	[444]
B/MG/125/2008	E	K	-	[444]
B/SC/150/2008	E	K	-	[444]
B/RS/157/2008	T	E	K	-	[444]
B/RS/161/2008	E	K	-	[444]
B/SE/258/2008	E	T	K	-	[444]
B/PR/282/2008	E	T	K	-	[444]
B/PR/286/2008	E	T	K	-	[444]
B/PR/288/2008	E	T	K	-	[444]
B/PR/290/2008	E	T	K	-	[444]
B/PR/292/2008	E	T	K	-	[444]
B/RS/294/2008	E	I	T	K	-	[444]
B/PR/295/2008	E	K	-	[444]
B/RS/312/2008	E	T	K	-	[444]
B/RS/316/2008	E	T	K	-	[444]
B/RS/317/2008	E	K	R	-	[444]
B/RS/321/2008	E	K	-	[444]
B/RS/327/2008	E	K	-	[444]
B/MG/349/2008	E	K	-	[444]

B/Malaysia/2506/2004	IYCLMGSGQL	LWDTVTGVNM	AL*WRNG*VC	SKPFVPILFE	QLSLLNL---	-----	[501]
B/Victoria/02/87D	-----	[501]
B/RJ/792/2004	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RJ/809/2004	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/734/2006	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/PR/566/2006	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RJ/379/2007	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/BA/26/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/BA/31/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/53/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/106/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/122/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/261/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/263/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/264/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/PR/283/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/PR/284/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/BA/301/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/314/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/324/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/350/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/351/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/352/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/355/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/Florida/4/2006DS	-----	[501]
B/Yamagata/16/88DIIVS	EKCSCYY	[501]
B/MG/4/2007	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RJ/347/2007	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/BA/27/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/44/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/47/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]

B/Malaysia/2506/2004	IYCLMGSGQL	LWDTVTGVNM	AL*WRNG*VC	SKPFVPILFE	QLSLLNL---	-----	[501]
B/RS/48/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/52/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/55/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/56/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/57/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/114/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/117/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/125/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/SC/150/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/157/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/161/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/SE/258/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/PR/282/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/PR/286/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/PR/288/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/PR/290/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/PR/292/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/294/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/PR/295/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/312/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/316/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/317/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/321/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/RS/327/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]
B/MG/349/2008	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[501]

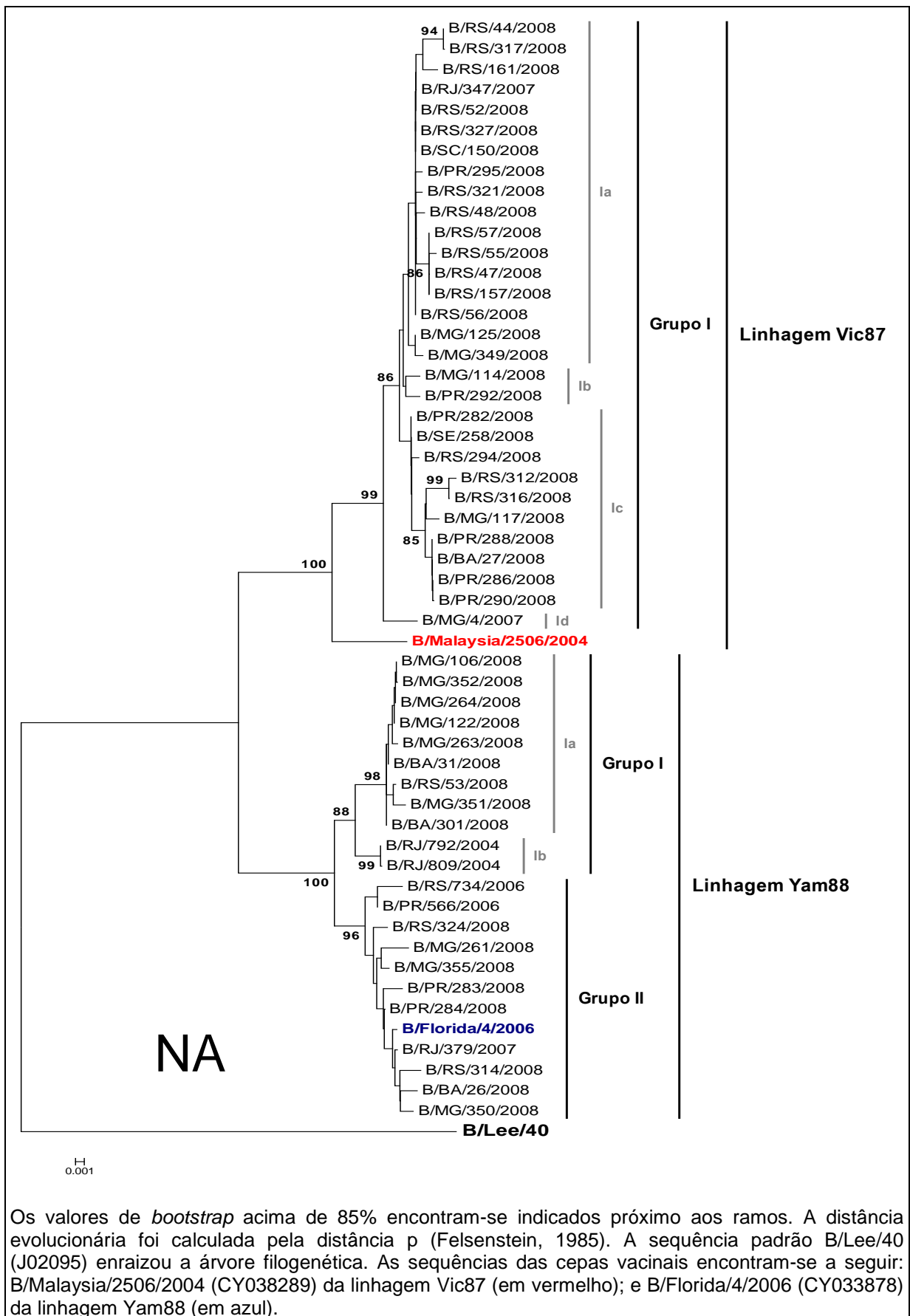


Figura 5.3 - Relação filogenética entre as 52 cepas de Influenza B (gene NA) circulantes no Brasil, inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Saitou e Nei, 1987).

A distribuição das sequências brasileiras, segundo a linhagem de Influenza B e ano de coleta encontra-se representada na Figura 5.3. Do total de 52 amostras, 30 (58%) foram classificadas como linhagem Vic87 e 22 (42%), Yam88.

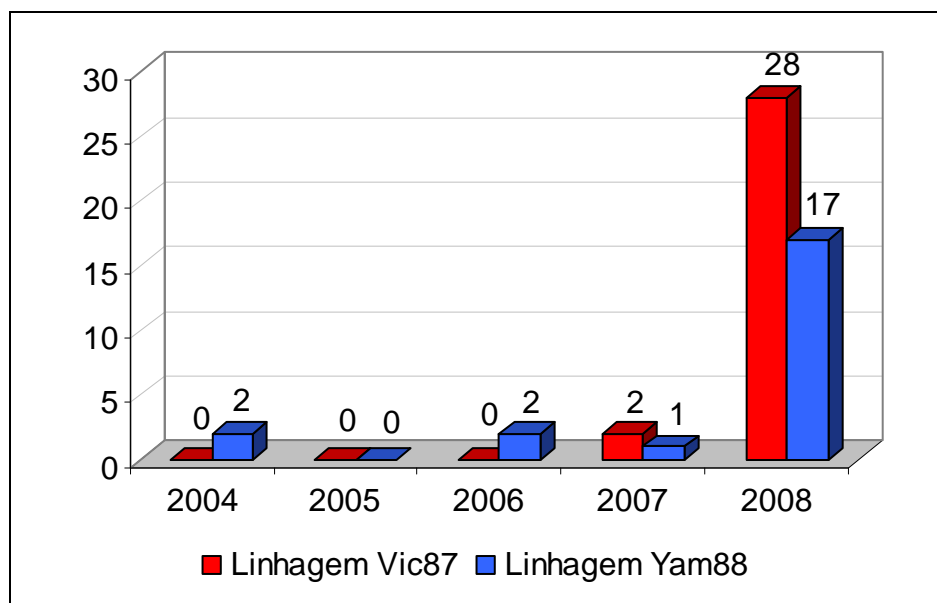


Figura 5.4 - Distribuição das amostras sequenciadas para o gene NA do vírus Influenza B, segundo a linhagem e o ano de coleta (2004 a 2008).

Em 2004 as duas amostras analisadas eram da linhagem Yam88. No ano de 2005, não analisamos nenhuma amostra para o segmento gênico de NA, devido à escassez de volume amostral. Da epidemia de 2006, duas amostras foram sequenciadas, sendo as duas da linhagem Yam88. Em 2007, analisamos três amostras, sendo uma da linhagem Yam88 e duas da linhagem Vic87. Em 2008 foram sequenciadas 45 amostras, e observamos uma inversão, onde 28 (62%) eram da linhagem Vic87 e 17 (38%) da linhagem Yam88.

5.3.1. Variabilidade na sequência de aminoácidos do gene NA - Linhagem Vic87

Trinta amostras foram caracterizadas como Influenza B linhagem Vic87, sendo duas (7%) amostras do ano de 2007 e 28 (93%) de 2008. Estas foram comparadas com a sequência da cepa vacinal B/Malaysia/2506/2004 (2006 e 2007). As substituições encontradas encontram-se descritas na Tabela 5.9. A maioria das sequências analisadas do ano de 2008 perteceram à linhagem Vic87, contudo a cepa vacinal deste ano (B/Florida/4/2006) pertenceu a linhagem Yam88, por este motivo não analisamos esta cepa com as sequências de Vic87.

Tabela 5.9 - Substituições nos resíduos de aminoácidos no segmento gênico de NA das sequências brasileiras do vírus Influenza B (linhagem Vic87) circulantes durante as epidemias de 2007 e 2008, em relação à cepa vacinal dos anos de 2006/2007 (B/Malaysia/2506/2004).

Amostras	Posições dos aminoácidos																					
	19	32	41	42	61	67	72	124	125	219	220	263	271	309	320	358	373	375	389	395	404	418
B/Malaysia/2506/2004	L	P	P	S	Q	A	T	P	K	N	N	K	I	T	E	A	K	M	A	A	E	K
B/RJ/347/2007	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/MG/4/2007		L	S	P					S	D	K		V		D		E					K
B/MG/114/2008	-	L	S	P	H				N				V		D		E					K
B/MG/117/2008	-	L	S	P	H			L	N			R	V		D		E		T			K
B/MG/125/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/MG/349/2008	-	L	S	P	H	T			N				V	N	D		E					K
B/SE/258/2008	-	L	S	P	H				N				V		D		E		T			K
B/BA/27/2008	-	L	S	P	H				N			R	V		D		E		T			K
B/RS/44/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/RS/47/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D	T	E					K
B/RS/48/2008		L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/RS/52/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/RS/55/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D	T	E					K
B/RS/56/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/RS/57/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D	T	E					K
B/RS/157/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D	T	E					K
B/RS/161/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/RS/294/2008	-	L	S	P	H				N				V		D		E	I	T			K
B/RS/312/2008	I	L	S	P	H				N			R	V		D		E		T			K
B/RS/316/2008	-	L	S	P	H				N			R	V		D		E		T			K
B/RS/317/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/RS/321/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/RS/327/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/SC/150/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K
B/PR/282/2008	-	L	S	P	H				N				V		D		E		T			K
B/PR/286/2008	-	L	S	P	H				N			R	V		D		E		T			K
B/PR/288/2008	-	L	S	P	H				N			R	V		D		E		T			K
B/PR/290/2008		L	S	P	H				N			R	V		D		E		T			K
B/PR/292/2008		L	S	P	H		K		N				V		D		E			T		K
B/PR/295/2008	-	L	S	P	H	T			N				V		D		E					K

Sequências compostas por aproximadamente 435 aminoácidos e pertencentes à linhagem Vic87.

L=Leucina; P=Prolina; S=Serina; Q=Glutamina; T=Treonina; K=Lisina; N=Asparagina; D=Ácido Aspártico; V=Valina; R=Arginina; M=Metionina; A=Alanina; E=Ácido Glutâmico; I=Isoleucina.

Ao compararmos as 30 amostras da linhagem Vic87 com a sequência vacinal, encontramos substituições em 22 aminoácidos. Todas as amostras da linhagem Vic87 sequenciadas de 2004 a 2008 apresentaram as mutações na região da haste, P32L, P41S, S42P, Q61H (exceto a amostra B/MG/4/2007) e na região da cabeça da molécula I271V, E320D, K373E e E404K.

Ao observar a árvore filogenética, percebemos que a sequência B/MG/4/2007 encontrou-se filogeneticamente isolada das demais. Nestas sequências, encontramos alterações características únicas: as substituições K125S, N219D e N220K, além de ser a única amostra que não possui alteração no aminoácido Q61. Quanto ao aminoácido K125 a única amostra que se mostrou semelhante a vacina foi B/RS/48/08, pois com exceção desta e da B/MG/4/2007 todas as outras apresentam a substituição K125N.

No grupo I/Vic87, o subgrupo Ia incluiu 17 sequências que, além das mutações comuns para todas as demais, apresentou a substituição A67T. Como pode ser observado na Tabela 5.9, sete sequências inseridas dentro deste subgrupo possuíam outras substituições.

O subgrupo Ib/Vic87 foi composto por duas sequências (B/MG/114/08 e B/PR/292/2008), sendo que B/PR/292/2008 apresentou duas substituições adicionais (T72K e A395T) em comparação com a cepa vacinal, além das substituições comuns a todas as amostras.

O subgrupo Ic foi composto por 11 sequências. A substituição A389T foi comum a todas. Além destas, observamos outras substituições como K263R, P124L (B/MG/117/08) e M375I (B/RS/294/08).

5.3.2. Variabilidade na sequência de aminoácidos do gene NA - Linhagem Yam88.

Quando comparadas à cepa vacinal B/Florida/4/2006 (vacina 2008-2009), encontramos substituições de aminoácidos em 20 sequências circulantes no Brasil durante as epidemias de 2004 e 2006 a 2008, as quais encontram-se descritas na Tabela 5.10. As cepas vacinais de 2004 (B/Hong Kong/330/01) e de 2006-2007 (B/Malaysia/2506/2004) não foram comparadas com as sequências da linhagem Yam88, pois pertencem a linhagem Vic87.

Duas sequências brasileiras não foram inseridas na Tabela 5.10, por apresentarem sequências de aminoácidos idênticas à vacinal. Entretanto, estas amostras apresentaram mutações silenciosas. A amostra B/PR/284/2008 apresentou uma mutação silenciosa no aminoácido 201, possuindo uma guanina ao invés de uma adenina na terceira base do códon e isso garantiu a codificação para o mesmo aminoácido Leucina encontrado na sequência vacinal. Outra amostra com esta característica é a B/RS/324/08, na qual foram detectadas quatro destas mutações. Nos aminoácidos 97 e 201 transições de adenina para guanina ocorreram na terceira base do códon, mas continuaram codificando para Leucina, na Arginina e Glicina encontradas na posição 223 e 335 respectivamente, transições ocorreram também na terceira base do códon sendo guaninas substituídas por adeninas.

Tabela 5.10 - Substituições nos resíduos de aminoácidos do segmento gênico de NA das sequências brasileiras do vírus Influenza B linhagem Yam88 circulantes durante as epidemias de 2004, 2005-2008, em relação à cepa vacinal dos anos de 2008-2009 (B/Florida/4/2006).

Amostras	Posições dos aminoácidos																
	26	42	46	47	65	68	78	125	141	186	191	218	261	340	342	358	372
B/Florida/4/2006	A	Q	T	A	R	A	P	T	G	K	I	A	I	D	D	A	T
B/RJ/792/2004			I		H	T		K		R				N			
B/RJ/809/2004			I		H	T		K		R				N			
B/PR/566/2006											V						
B/RS/734/2006							R				V						N
B/RJ/379/2007								K									
B/BA/26/2008												E					
B/BA/31/2008		R				T		K		R				N			
B/BA/301/2008		R				T		K		R				N			
B/MG/106/2008		R		G		T		K		R				N			
B/MG/122/2008		R		G		T		K		R				N			
B/MG/261/2008									R						N		T
B/MG/263/2008		R		G		T		K		R				N			
B/MG/264/2008		R		G		T		K		R				N			
B/MG/350/2008	V																
B/MG/351/2008		R				T		K		R				N			
B/MG/352/2008		R		G		T		K		R				N			
B/MG/355/2008						T									N		
B/RS/53/2008		R				T		K		R				N			
B/RS/314/2008													V				
B/PR/283/2008								M									

Sequências compostas por aproximadamente 435 aminoácidos e pertencentes à linhagem Yam88. A=Alanina; Q=Glutamina; T=Treonina; R=Arginina; P=Prolina; G=Glicina; K=Lisina; I=Isoleucina; D=Ácido Aspártico; H=Histidina; N=Asparagina; V=Valina; E=Ácido Glutâmico; e M=Metionina.

Diferentemente do subgrupo Ic, as sequências dos subgrupos Ia e Ib (contendo sequências dos anos de 2008 e 2004, respectivamente) apresentaram substituições nos resíduos A68T, K125T, K186R e D340N. No ano de 2004,

identificamos as substituições T46I e R65H, ausentes nas sequências de 2008. Cinco amostras de MG do ano de 2008 apresentaram a substituição A47G.

No subgrupo Ic, as sequências de 2006 a 2008 foram semelhantes à cepa vacinal B/Florida/4/2006. Duas amostras (2006) apresentaram a substituição I191V, sendo que a amostra B/RS/734/06 também apresentou P78R e T372N. Em 2008, seis sequências pertencentes ao grupo II/Yam88 apresentaram substituições adicionais: B/BA/26/08 (A218E), B/MG/261/08 (G141R, D342N e A358T), B/PR/283/08 (T125M), B/RS/314/08 (I261V), B/MG/350/08 (A26V) e B/MG/355/08 (A68T e D342N).

Finalmente, analisando as 52 sequências de NA deste trabalho não encontramos nenhum marcador de resistência, previamente definidos na literatura (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Devido a ausência de substituições nos resíduos E117, R150, D197, I221, H273 e R374 nas sequências de NA analisadas.

5.4. Rearranjo entre os fragmentos gênicos de HA e NA

Analisamos filogeneticamente os fragmentos gênicos de HA e NA de 52 amostras para a verificação da ocorrência de rearranjo. Embora diversos trabalhos venham evidenciando o rearranjo entre os fragmentos gênicos das linhagens Vic87 e Yam88, nas amostras brasileiras isto não foi observado (Figura 5.5). Neste conjunto de amostras, os achados foram consistentes para ambos os genes analisados.

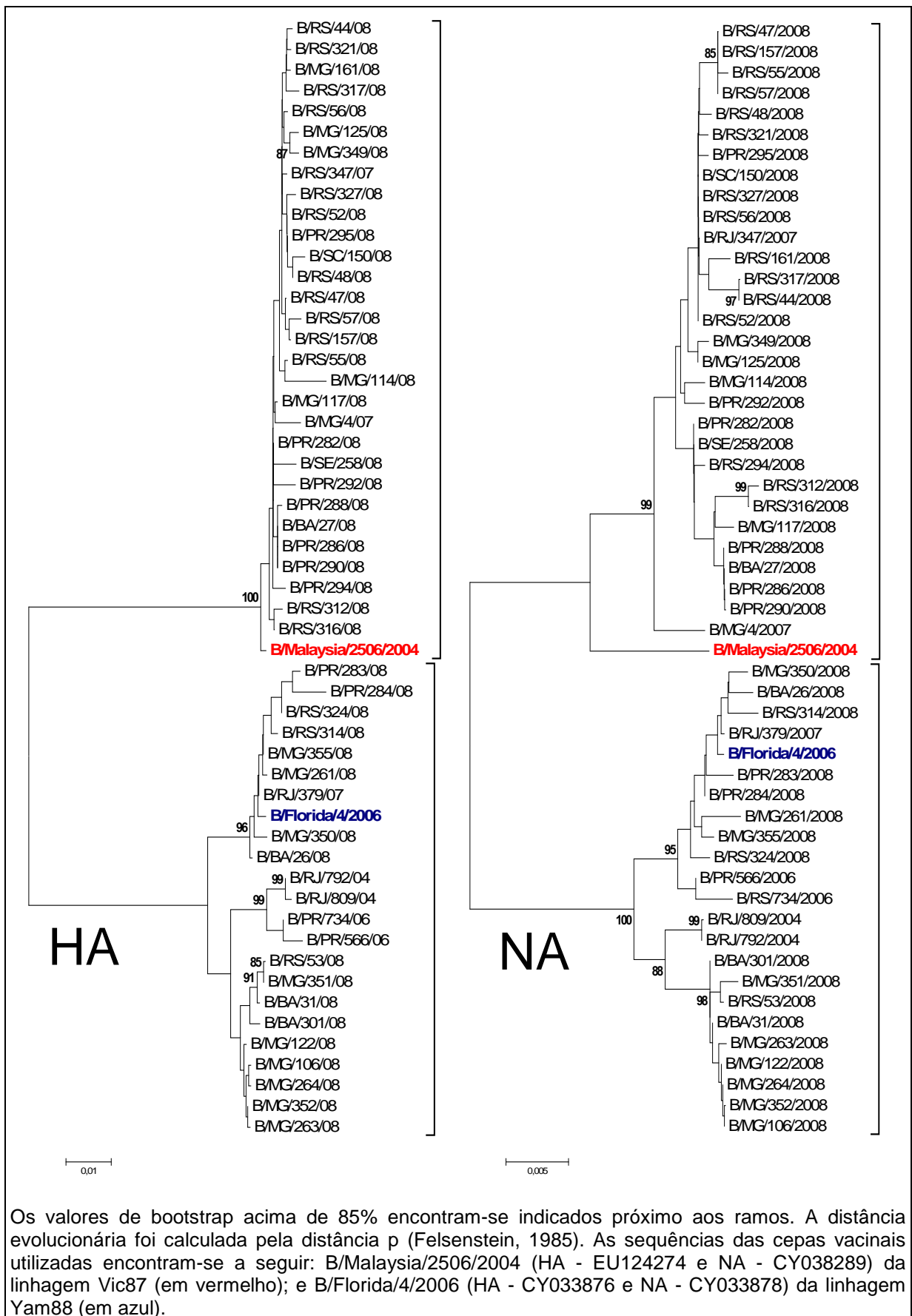


Figura 5.5 - Relação filogenética entre 52 cepas de Influenza B referente aos genes de HA (à esquerda) e NA (à direita) de variantes que circularam no Brasil de 2004 a 2008, inferida pelo método de agrupamento de vizinhos (Saitou e Nei, 1987)

5.5. Co-circulação das linhagens Vic87 e Yam88 durante as cinco epidemias

Como não encontramos rearranjo entre os segmentos gênicos das linhagens Vic87 e Yam88, analisamos ano a ano a circulação das linhagens de influenza B, baseados no resultado da análise filogenética do segmento gênico de HA (domínio HA1), conforme demonstrado na Tabela 5.11 e ilustrado na Figura 5.6.

Tabela 5.11 - Distribuição por Unidade Federada das linhagens Vic87 e Yam88 do vírus Influenza B das epidemias de 2004 a 2008.

UF	N		2004		2005		2006		2007		2008	
	Vic87	Yam88	Vic87	Yam88	Vic87	Yam88	Vic87	Yam88	Vic87	Yam88	Vic87	Yam88
RJ	1	3	0	2	-	-	-	-	1	1	-	-
ES	0	1	-	-	0	1	-	-	-	-	-	-
PR	8	3	-	-	-	-	1	2	-	-	7	2
RS	21	10	-	-	3	1	3	4	2	1	13	3
SC	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0
MG	9	11	-	-	-	-	1	2	2	0	7	9
BA	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3
SE	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0
Total	44	31	0	2	3	2	5	8	5	2	31	17

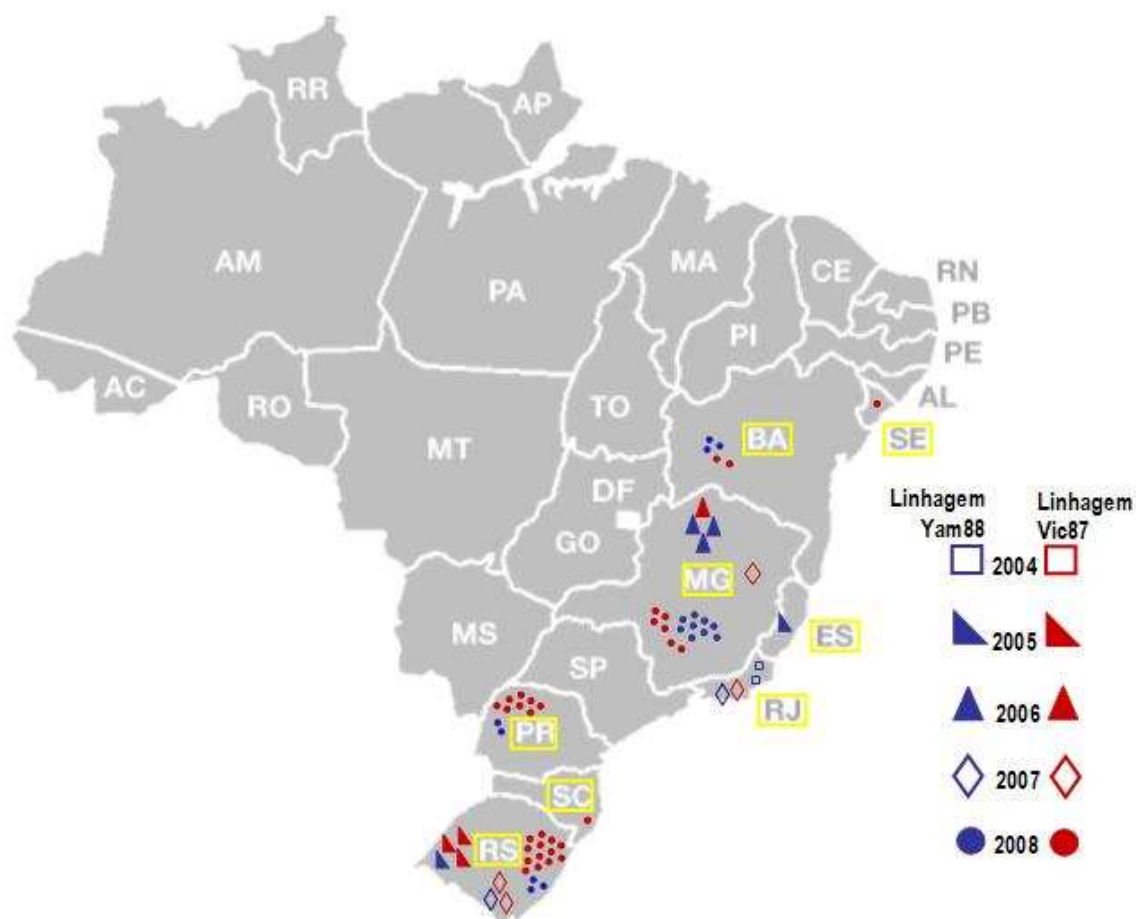


Figura 5.6 - Mapa da distribuição das linhagens Vic87 (vermelho) e Yam88 (azul) nos estados (amarelo) atendidos pelo serviço de referência do LVR/S/FIOCRUZ.

A distribuição das linhagens por ano evidenciou a co-circulação nos diferentes estados brasileiros a partir de 2005. Podemos observar que, durante o ano de 2004, foram sequenciadas somente duas amostras do estado do RJ. Estas pertenciam a linhagem Yam88 e neste ano a vacina trivalente do Hemisfério Sul tinha como representante de Influenza B a cepa B/HongKong/330/2001 (linhagem Vic87). Para esta epidemia de 2004 não podemos inferir a co-circulação devido ao reduzido número de amostras sequenciadas.

No ano de 2005, a amostra B/Shanghai/361/2002 (linhagem Yam88) compôs a vacina trivalente. Neste ano, pudemos evidenciar a co-circulação das linhagens Vic87 e Yam88 do vírus influenza B, em amostras coletadas no RS. Das quatro amostras do RS sequenciadas, três foram caracterizadas como linhagem Vic87 e uma como linhagem Yam88. Ainda no mesmo ano, uma amostra do estado do ES foi sequenciada sendo caracterizada como da linhagem Yam88.

A cepa B/Malaysia/2506/2004 (linhagem de Vic87) compôs a vacina anti-influenza em 2006 e 2007. Em 2006, treze sequências foram analisadas e detectamos a co-circulação nos estados de MG, com duas representantes Yam88 e uma Vic87, no estado do RS, com cinco Yam88 e três Vic87, no estado do PR, com uma Vic87 e uma Yam88. No ano seguinte, de seis amostras sequenciadas, duas eram do estado do RJ, sendo cada uma de uma linhagem. No estado do RS também houve co-circulação, pois entre as três amostras sequenciadas duas eram Vic87 e uma Yam88. A única amostra de MG sequenciada do ano de 2007 foi representante da linhagem Vic87.

No ano de 2008, 48 amostras Influenza B positivas foram sequenciadas, 17 foram Yam88 e 31 Vic87. Em alguns estados, houve predomínio da linhagem Vic87: no estado do RS das 17 amostras sequenciadas, somente três representaram a linhagem Yam88 e 14 amostras a linhagem Vic87, no estado do PR das 10 amostras, oito eram Vic87 e duas Yam88. Em outros estados, o predomínio foi de Yam88, como no estado da BA, de cinco amostras, três foram representantes da linhagem Yam88 e duas da linhagem Vic87, em MG das 15 amostras sequenciadas, nove eram da linhagem Yam88 e seis da linhagem Vic87. Dos estados de SC e SE sequenciamos apenas uma amostra, sendo ambas representantes da linhagem Vic87.

5.6. Padronização do protocolo de DGGE para diferenciação entre as linhagens do vírus Influenza B

5.6.1. Escolha da região a ser analisada pela DGGE e desenho dos iniciadores

Na Figura 5.7, podemos visualizar o gráfico de desnaturação da porção HA1 (resíduos de 79 a 970), utilizando as cepas vacinais (epidemias de 2004 a 2010). O mesmo perfil também foi encontrado para as cepas brasileiras sob estudo.

Os resultados obtidos no gráfico de desnaturação indicaram que a região localizada entre os nucleotídeos 79 e 185 apresenta um perfil diferenciado, contudo não apresentava variações de desnaturação entre as variantes das linhagens. A outra região entre os nucleotídeos 778 e 968 (aminoácidos 234 ao 296), apresentou um perfil de desnaturação diferenciado (diferença em torno de 1°C) para as linhagens Vic87 e Yam88, e também para suas variantes. Portanto, tal região poderia ser utilizada para a diferenciação entre estas linhagens pelo método de DGGE.

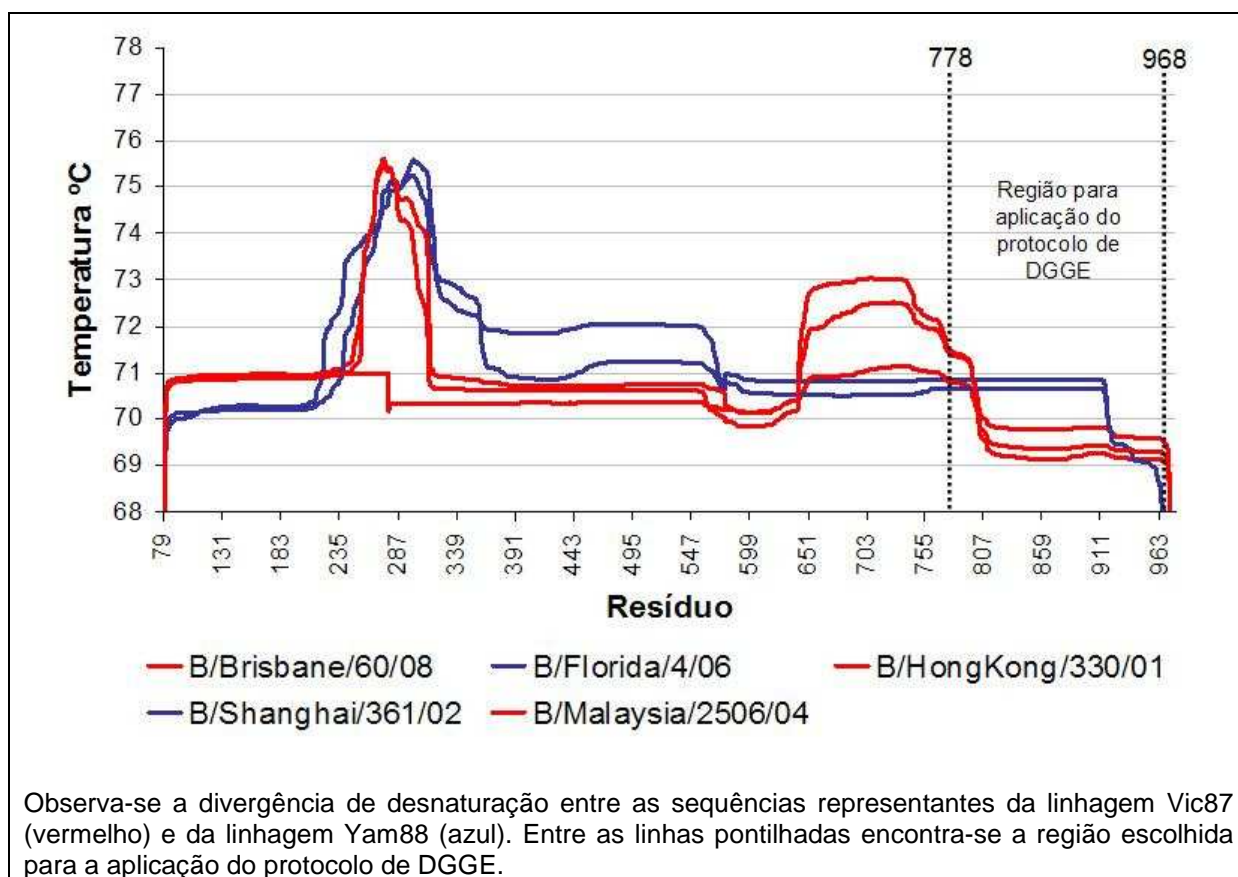


Figura 5.7 - Curva de desnaturação das sequências vacinais (2004 a 2010).

Com base nestes achados, os iniciadores foram desenhados para a amplificação do produto de PCR, flanqueando esta região. Os produtos da amplificação, portanto, seriam compostos por 231 pb (40 nucleotídeos do grampo GC + 191 nucleotídeos da porção escolhida). A sequência dos iniciadores, bem como suas características físico-químicas encontram-se descritos na Tabela 5.12.

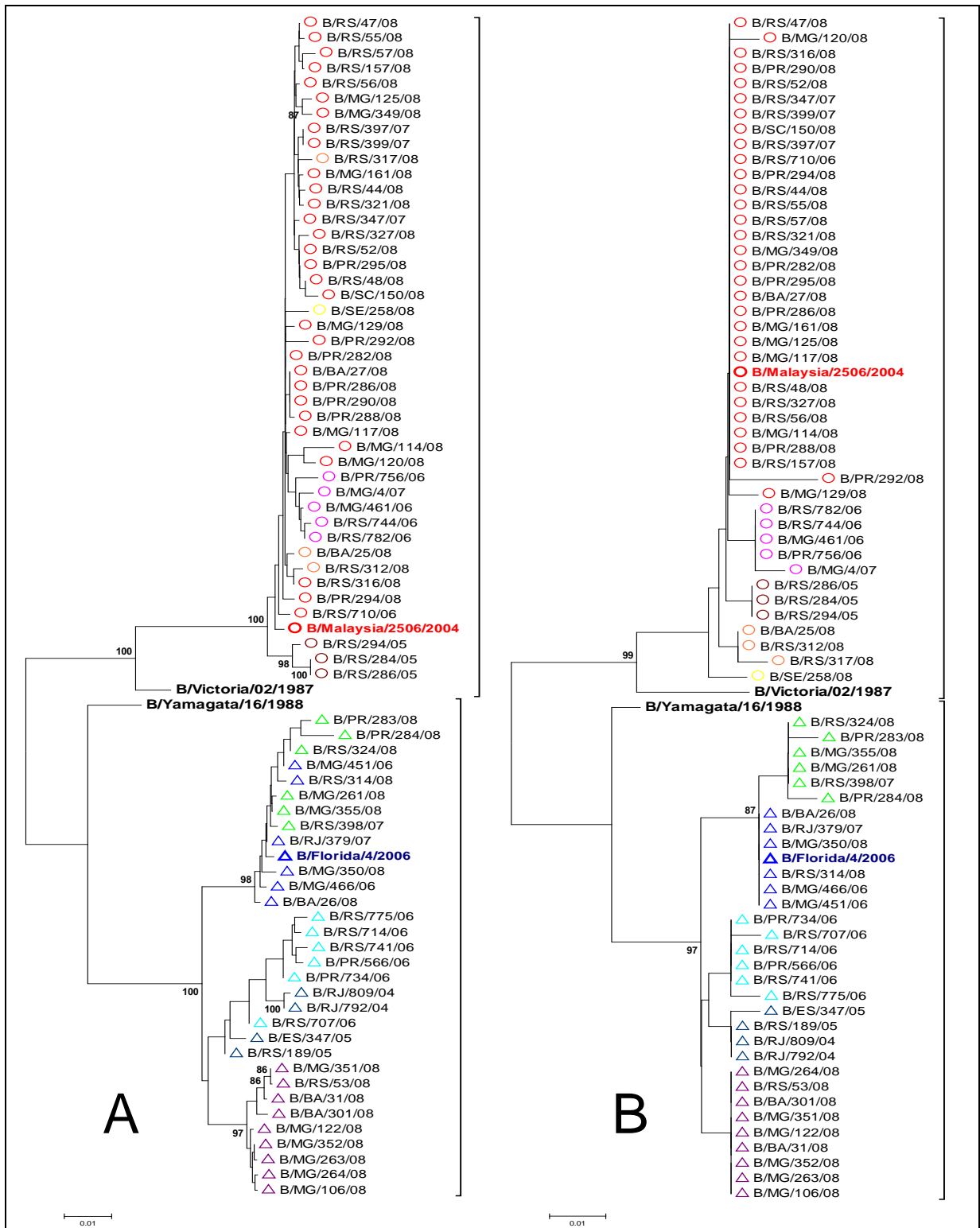
Tabela 5.12 – Sequências e características dos iniciadores utilizados para a amplificação dos produtos da *nested* PCR da DGGE.

Iniciadores		Sequência	GC	T _m	Tamanho
Nome	Posição	(5´-3´)	(%)	(°C)	(pb)
HÁ					
BHA DGGE (D)	778-794	<u>CGCCCGCCGCGCGCGGCGG</u> <u>GCGGGGCGGGGGCACGGGG</u> <u>GGCAAACAGAAGACGGAGG</u>	55.2*	52.9*	17*
BHA CII (R)	949-968	GGTGAAGCAGATTGCCTCA	52.6	62.8	19

D = Direto; R = Reverso. Grampo GC (Guanina e Citosina) está sublinhado.

*Cálculos realizados apenas para a região específica de hibridização. O iniciador com o grampo GC apresentou 57pb, tendo uma T_m de 85,7°C e 84,2% de conteúdo GC.

A região selecionada (191 nucleotídeos) representa cerca de 17,4% do domínio HA1 da molécula de HA e demonstrou ser potencialmente adequada para fins de diferenciação entre as linhagens Yam88 e Vic87, com base no perfil de desnaturação. Com o objetivo de investigar se este fragmento também teria capacidade discriminatória entre as linhagens, sob a abordagem filogenética, foram comparadas árvores filogenéticas reconstruídas com as sequências completas da domínio HA1 e com as sequências do fragmento selecionado para a realização do DGGE (Figura 5.8). Os achados obtidos sugerem que, embora com menor poder de diferenciação filogenética quando comparada à árvore da sequência HA1 completa – resultado esperado -, todas as sequências correspondentes ao fragmento de 191nt puderam ser eficiente e devidamente agrupadas segundo a linhagem.



Os valores de bootstrap acima de 85% encontram-se indicados próximo aos ramos. A distância evolucionária foi calculada pela distância p (Felsenstein, 1985). As sequências das cepas vacinais utilizadas encontram-se a seguir: B/Malaysia/2506/2004 (HA EU124274) da linhagem Vic87 (em vermelho), B/Florida/4/2006 (HA - CY033876) da linhagem Yam88 (em azul) e as sequências padrões, B/Victoria/02/1987 (M58428) e B/Yamagata/16/1988 (M36105).

Figura 5.8 - Relação filogenética entre as 74 sequências de Influenza B circulantes no Brasil entre 2004 e 2008 e cepas vacinais, utilizando a sequência completa do domínio HA1 (A) e o fragmento de 191 nucleotídeos selecionado para DGGE (nt 778- 968) (B). As relações foram inferidas pelo método de agrupamento de vizinhos (Saitou e Nei, 1987).

5.6.2. Padronização da *nested* PCR da DGGE

A *nested* PCR para geração do amplicon com grampo GC foi padronizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C/2min, 30 ciclos de 95°C/30s, 60°C/30s e 72°C/1min, com uma extensão final a 72°C/5min. O produto obtido foi checado em gel de agarose a 1,5%. O resultado foram bandas com aproximadamente 231 pb, como pode ser visualizado na Tabela 5.12.

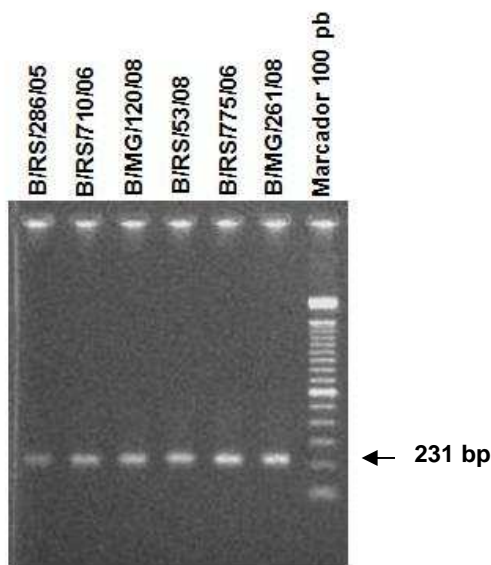


Figura 5.9 - Gel de agarose a 1,5% após eletroforese e coloração por brometo de etídio, apresentando os produtos de 231 pares de bases obtidos na *nested* PCR do protocolo de DGGE.

5.6.3. Padronização da DGGE

A característica de desnaturação dos fragmentos sequenciados versus a temperatura, geradas com o programa Melt95 permitiram a visualização da mobilidade teórica dos fragmentos, bem como as suas respectivas temperaturas de *melting* (T_m).

Os perfis teóricos de mobilidade de amostras representativas das distintas T_m s encontradas neste estudo, podem ser visualizados na Figura 5.10.

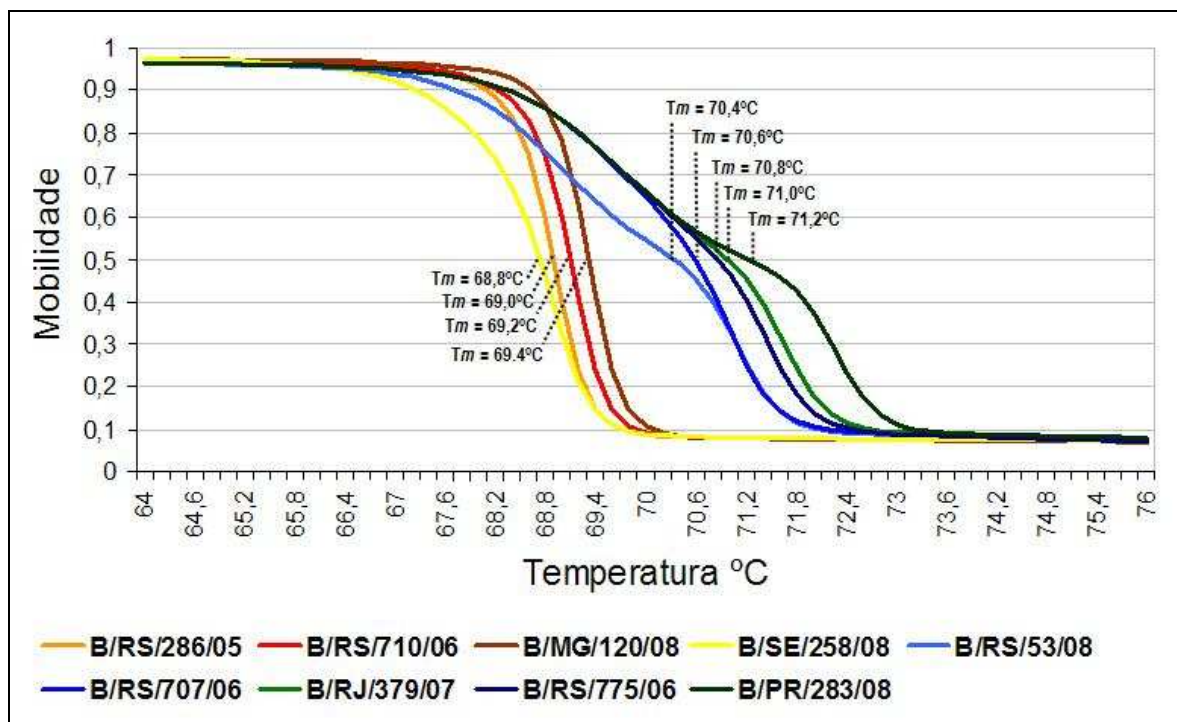


Figura 5.10 – Curvas de desnaturação x mobilidade de variantes de Influenza B com seus respectivos T_ms.

Houve variação de 68,8°C a 71,2°C na T_m entre os amplicons de influenza B. Com base nas T_m pudemos identificar dois grupos de amostras, pertencentes às linhagens Vic87 e Yam88, com faixas de T_m entre 68,8°C - 69,4°C e 70,4°C - 71,2°C, respectivamente.

As moléculas da linhagem Vic87 foram as primeiras a desnaturarem, com uma variação na T_m de aproximadamente 0,6°C (68,8°C a 69,4°C). As T_ms observadas para as amostras da linhagem Vic87 B/SE/258/08, B/RS/286/05, B/RS/710/06 e B/MG/120/08 foram de 68,8°C, 69,0°C, 69,2°C e 69,4°C, respectivamente. Após um intervalo de 1,0°C (69,4°C - 70,4°C), observamos as representantes da linhagem Yam88, B/RS/53/08, B/RS/707/06, B/RS/775/06, B/RJ/379/07 e B/PR/283/08, com variação de T_m da ordem de 1,2°C (70,4°C a 71,2°C).

Aplicando a fórmula de conversão da temperatura de desnaturação (entre 68,8°C e 71,2°C), obtivemos a faixa do gradiente químico de uréia e formamida (URF) correspondente (28% a 35%), a ser utilizado na composição do gel de poliacrilamida. Para o gel de poliacrilamida, determinamos uma faixa de gradiente mais abrangente, variando entre 25% a 45% de UF, facilitando a distinção entre as linhagens.

Na Figura 5.11 podemos observar resultados da padronização do tempo da eletroforese, com aplicações em intervalos de uma hora. Após duas horas de eletroforese pudemos observar uma diferenciação nos perfis das linhagens Vic87 e Yam88, e também variações dentro da linhagem Yam88. Após três horas de eletroforese, a diferença entre as linhagens foi ainda mais evidente. Então, decidimos pela corrida de duas horas, pois permite a distinção das linhagens bem como seus perfis num menor tempo.

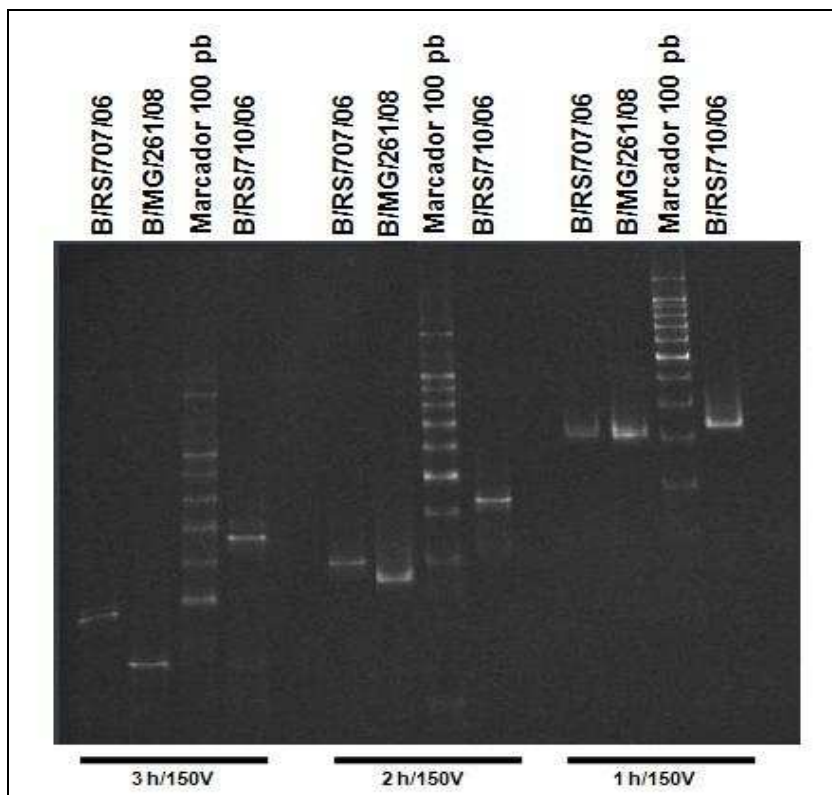


Figura 5.11 – DGGE para escolha do tempo de eletroforese, aplicando 8 μ L das amostras da linhagem Yam88 (B/RS/707/06 e B/MG262/08) e Vic87 (B/RS/710/06) de influenza B, com intervalos de 1h. A corrida foi desenvolvida a 150V/60°C/1h, 2h e 3h.

5.7. Aplicação da metodologia de DGGE para a diferenciação entre as linhagens do vírus Influenza B

Os setenta e cinco amplicons gerados pela *Nested* PCR foram aplicados no gel de poliacrilamida com gradiente químico desnaturante e a eletroforese foi realizada a 150V/2h/60°C. Os perfis obtidos na DGGE podem ser observados na Figura 5.12.

Para a verificação da capacidade da DGGE na distinção entre as linhagens, os perfis obtidos foram comparados com os resultados da análise filogenética de 74

amostras deste estudo (Figura 5.8). A amostra B/PR/293/08 foi testada apenas por DGGE, pois não conseguimos amplificá-la para o sequenciamento. Além da correspondência de 100% entre os perfis de DGGE e a análise filogenética, perfis dentro de cada linhagem foram identificados, conforme previsto pelas análises teóricas (Figura 5.10).

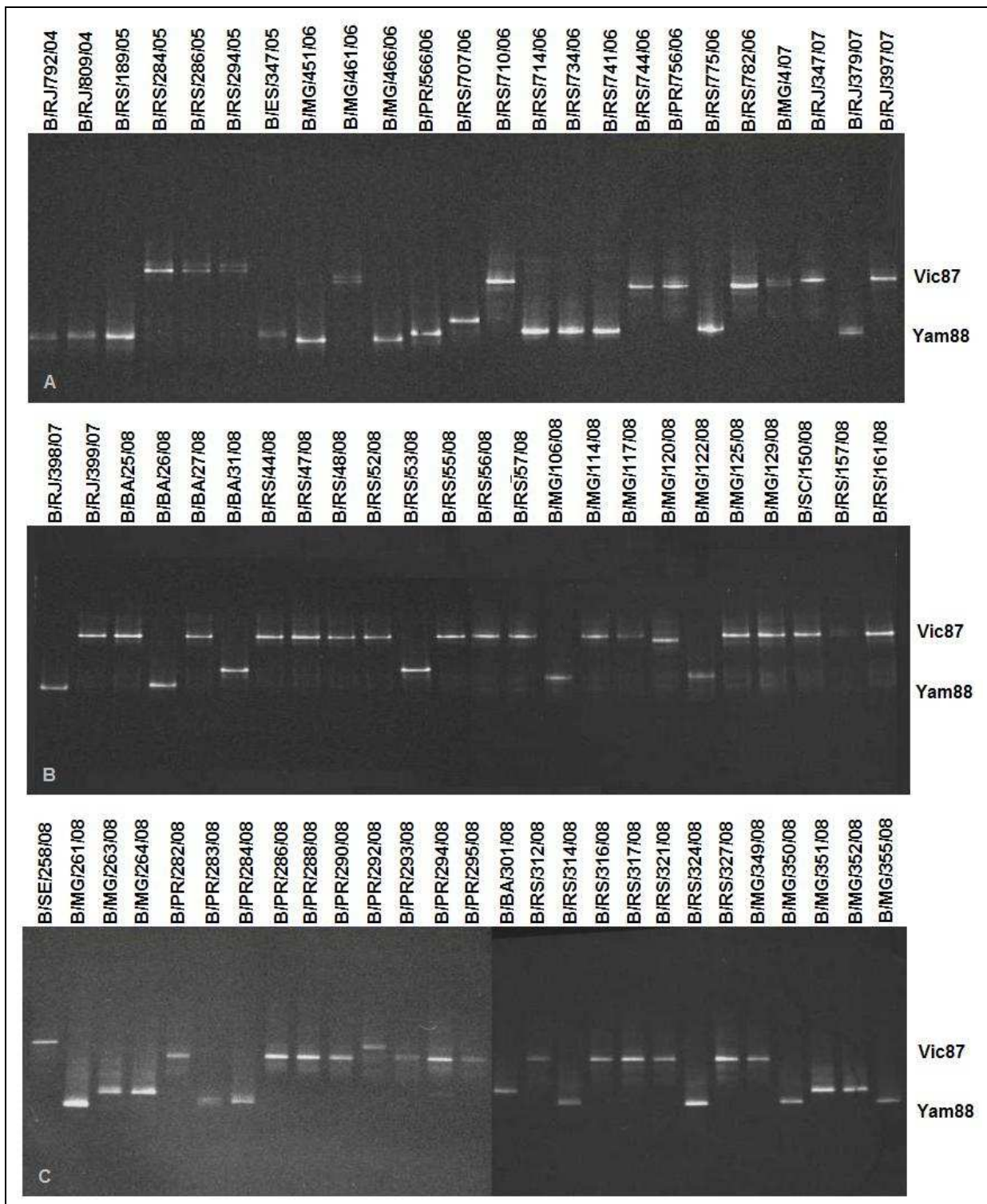


Figura 5.12 – Perfis dos 75 amplicons de Influenza B obtidos por DGGE, com a aplicação de 8µL das amostras em ordem cronológica, adicionado de 4µL de

tampão de solubilização foram aplicados no gel, de amostra. As condições da corrida eletroforética foram 150V/2h/60°C.

Na Figura 5.12, podemos observar que, na DGGE, todos os representantes da linhagem Vic87 desnaturaram anteriormente, quando comparados às amostras da linhagem Yam88.

Para verificar os resíduos responsáveis pelas diferenças de T_m observadas entre as linhagens nesta pequena porção de HA1, fazendo-a capaz de simular os resultados de análise filogenética da molécula inteira, analisamos o alinhamento e a curva de desnaturação das cepas vacinais B/Malaysia/2506/04 e B/Florida/4/06, representantes da linhagem Vic87 e Yam88 respectivamente, como demonstrado na Figura 5.13.

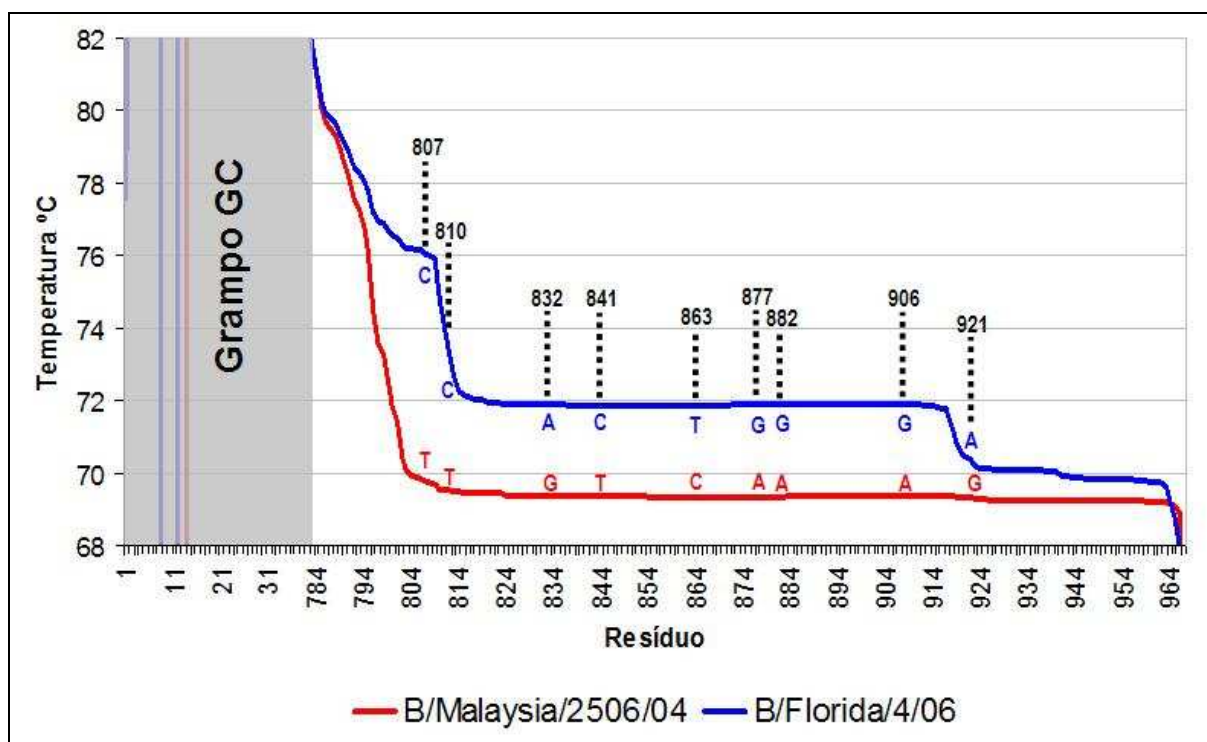


Figura 5.13 – Resíduos de nucleotídeos responsáveis pela divergência entre as linhagens Vic87 (vermelho) e Yam88 (azul) de Influenza B na DGGE, com base no fragmento de 191 pb (nucleotídeo 778 ao 968) do domínio HA1.

Conforme observado na Figura 5.13, encontramos substituições nos resíduos 807, 810, 832, 841, 863, 877, 882, 906 e 921 entre as cepas pertencentes às linhagens Yam88 e Vic87. Tais substituições ocasionam uma diferença no conteúdo GC entre as linhagens resultando nos diferentes perfis de desnaturação encontrados.

6. DISCUSSÃO

Globalmente, os vírus Influenza constituem uma das principais causas de infecções no trato respiratório, resultando em taxas significantivas de morbidade e mortalidade, além da grande sobrecarga financeira sobre os sistemas de saúde (Cox e Subbarao, 1999; Cauchemez e cols., 2008). Portanto, estudos que abordem a epidemiologia deste patógeno são de vital importância para a implementação das políticas e estratégias voltadas ao controle e prevenção da gripe.

Os vírus sazonais, Influenza B e Influenza A (H1N1 e H3N2), co-circulam na população desde 1977 (Hilleman, 2002). Até esta época, apenas uma linhagem do vírus tipo B (linhagem I) era encontrada. No início da década de 80, contudo, observou-se a divergência evolutiva nestes vírus, originando duas linhagens antigenica- e filogeneticamente distintas: Vic87 e Yam88 (Rota e cols., 1990; Rota e cols., 1992). Durante as décadas subsequentes, observou-se uma alternância na circulação destas linhagens na população (Figura 1.10). Este processo tem sido, principalmente, ocasionado por ação de seleção positiva sobre os vírus, um efeito conjunto entre a adoção anual da vacina e a resposta imune da população acometida durante as epidemias anuais (Chen e Holmes, 2008). Durante a epidemia de 2001-2002 ocorrida no Hemisfério Norte, o reaparecimento da linhagem Vic87 foi relatado em países da Europa e América do Norte, passando esta a co-circular com a linhagem Yam88, desde então (Ansaldi e cols., 2003). Na América do Sul, o reaparecimento da linhagem Vic87 também foi evidenciado no sul e sudeste do Brasil, em julho de 2002 (Motta e cols., 2006b). Contudo, após este período, são escassas as informações acerca da circulação destes vírus no país.

O Brasil é um país de grande extensão territorial, apresentando dimensões continentais. Ao longo dos anos, têm-se notado padrões distintos de circulação dos vírus Influenza nas diferentes regiões, destacando-se os eixos Norte-Nordeste, quando comparados ao eixo Sul-Sudeste do país (Motta e cols., 2006b; Moura e cols., 2009; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009). O Laboratório de Referência Nacional para Influenza da Fundação Oswaldo Cruz (Ministério da Saúde, 2008) atende aos estados do Nordeste (AL, BA, SE), Sudeste (MG, ES, RJ) e Sul (PR, SC, RS). Portanto, dispõe de um importante repositório de amostras, seja da perspectiva temporal, seja da perspectiva geográfica. No presente trabalho, analisamos a epidemiologia e evolução molecular (com base nos segmentos gênicos HA e NA)

dos vírus Influenza B circulantes no Brasil, durante as epidemias de 2004 a 2008. Com o objetivo de buscar um melhor entendimento sobre a circulação e evolução das linhagens destes vírus, sequenciamos os genes HA e NA de amostras brasileiras, oriundas dos estados supra-mencionados. Estes segmentos gênicos codificam para os dois principais antígenos de superfície dos vírus Influenza (integrantes da vacina), sendo as cepas anualmente elencadas, com base nos dados sobre a sua circulação nos hemisférios Norte e Sul. Através do sequenciamento e análise filogenética de nossas amostras, foi possível verificar a presença de mutações nestes genes e determinar a co-circulação das linhagens de Influenza B nas regiões e período estudados. Ainda, tornou-se possível investigar a ocorrência de rearranjo gênico entre os segmentos gênicos HA e NA. Finalmente, padronizamos a metodologia de DGGE, para rápida diferenciação entre as linhagens do vírus Influenza B, possibilitando a sua tipagem inicial nos laboratórios de menor porte e que não dispõem de sequenciador automático. Tal recurso permite implementar um melhor controle sobre as cepas virais circulantes no país, com a integração de um maior número de laboratórios envolvidos nesta iniciativa, de interesse para o MS e da OMS.

6.1. Identificação das cepas de Influenza B circulantes no Brasil 2004-2008

Um dos objetivos do presente estudo foi a identificação das linhagens de Influenza B circulantes no Brasil, durante as epidemias de 2004 a 2008. Tal análise nos permitiria também considerar a adequação das cepas anualmente selecionadas para a composição da vacina para Influenza aplicada no Hemisfério Sul, nos respectivos anos. As cepas vacinais são indicadas pela OMS, com base na circulação das variantes virais referidas pelos países, nos diferentes Hemisférios (World Health Organization, 2009c). Contudo, as informações disponíveis no país ainda eram escassas.

No ano de 2004, a cepa vacinal para o Hemisfério Sul foi a B/Hong Kong/330/01, linhagem Vic87. O aumento na circulação da linhagem Yam88 durante o inverno de 2003/2004 no Hemisfério Norte (World Health Organization, 2003b) e em 2004, no Hemisfério Sul (World Health Organization, 2002b), motivou a substituição daquela cepa vacinal pela cepa B/Shanghai/361/2002 (linhagem Yam88). A última foi utilizada nas epidemias de 2004/2005 e 2005/2006 no Hemisfério Norte e, no Hemisfério Sul, somente na epidemia de 2005.

Um dos principais achados deste estudo foi a desarmonia entre as cepas utilizadas para a vacinação frente às aquelas circulantes no país, durante o período do estudo. Os nossos resultados indicam que, durante o ano de 2004, as duas amostras virais testadas eram da linhagem Yam88 e, no ano subsequente, das cinco sequências analisadas, três eram da linhagem Vic87. Ainda, de uma perspectiva complementar, a cepa vacinal B/HongKong/330/2001 encontrou-se filogeneticamente distante das cepas Vic87 circulantes no Brasil, durante a epidemia de 2005. O mesmo foi observado com relação à cepa vacinal B/Shanghai/361/2002, frente aos vírus da linhagem Yam88 circulantes naquele período (Figura 5.1). Estes resultados apoiam os previamente descritos por Lin e cols. (2007), onde também foi observada uma discrepância entre a cepa vacinal B/HongKong/330/2001 e aquelas em circulação no Hemisfério Norte durante o inverno de 2003/2004 (Lin e cols., 2007).

O potencial impacto destas observações pode consistir na falha, ao menos parcial, da cobertura dos grupos de risco para a infecção por Influenza B. Apesar do reduzido quantitativo de amostras brasileiras analisadas para os respectivos períodos (amostra de conveniência), este conjunto de achados sinalizam fortemente a necessidade de melhoria no sistema de vigilância das infecções por Influenza, visando a disponibilidade de dados nacionais que subsidiem uma seleção adequada das cepas vacinais. Corroborando esta observação, encontra-se a discrepância entre o quantitativo de amostras esperadas e recebidas pelos laboratórios que compõem a Rede de Influenza. O Programa de Vigilância Sentinela de Influenza do Ministério da Saúde prevê a coleta de cinco amostras semanais em cada estado (240/ano/estado), cujo destino é a caracterização molecular e antigênica dos vírus circulantes, a serem realizadas naqueles laboratórios (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010). Os principais objetivos consistem no monitoramento das infecções por Influenza dentre os casos de síndrome gripal, na emergência de novos subtipos e na orientação das cepas vacinais a serem utilizadas no próximo período (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009). Entretanto, contabilizando os anos de 2004 e 2005, foi possível sequenciar apenas 7 amostras, de um total de 75 (2004-2008), ainda que considerando os 9 estados brasileiros. Portanto, ajustes no atual Programa são necessários para real atendimento às finalidades propostas.

A cepa B/Malaysia/2506/2004 (linhagem Yam88) foi utilizada nas epidemias de 2006 e 2007 no Hemisfério Sul e em 2006/2007 e 2007/2008, no Hemisfério

Norte. A escolha de B/Malaysia/2506/2004 para compor a vacina ocorreu em conformidade com os padrões epidemiológicos e filogenéticos tanto para o Hemisfério Norte (Lin e cols., 2007), quanto para o Brasil, uma vez que as amostras da linhagem Vic87 circulantes no período de 2005 a 2008 foram muito semelhantes filogeneticamente à cepa vacinal. O mesmo foi verdadeiro para o ano de 2008, cuja cepa vacinal foi a B/Florida/4/2006 (linhagem Yam88).

6.2. Co-circulação das linhagens Yam88 e Vic 87 e rearranjo gênico

Corroborando com achados prévios (Ansaldi e cols., 2003; Puzelli e cols., 2004; Motta e cols., 2006b; Tsai e cols., 2006; Chen e Holmes, 2008; Jian e cols., 2008), verificamos a co-circulação das linhagens virais na amostra investigada. Isto favorece a ocorrência de rearranjo gênico entre os diferentes segmentos do genoma viral. Na última década, estudos baseados no sequenciamento do genoma completo ou de diferentes genes têm evidenciado que este mecanismo desempenha um importante papel na sua evolução e contínua circulação na população (Lindstrom e cols., 1999; McCullers e cols., 1999b; Hiromoto e cols., 2000; Shaw e cols., 2002; Matsuzaki e cols., 2004; Chen e Holmes, 2008). Recentemente, a emergência de uma nova linhagem, produto de rearranjo e composta por HA/Vic87 e NA/Yam88 tem sido descrita em diferentes países (Barr e cols., 2003; Matsuzaki e cols., 2004; Xu e cols., 2004; Daum e cols., 2006; Tsai e cols., 2006).

A vacina para Influenza, aplicada mundialmente, é composta pelos antígenos de superfície (HA e NA) dos vírus Influenza A (H1 e H3) e Influenza B. Contudo, a circulação de variantes virais oriundas de rearranjo impõe novos e futuros desafios para a imunoprevenção desta virose. Neste contexto, uma das perspectivas a curto prazo consiste na adoção da vacina tetravalente, contendo duas cepas representativas das linhagens Vic87 e Yam88, de forma semelhante com o que vem sendo realizado com o vírus influenza A (World Health Organization, 2009c).

Neste estudo, não identificamos rearranjo entre os genes HA e NA nas 52 amostras sequenciadas. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de rearranjo envolvendo outros segmentos gênicos não investigados e, muito menos, a sua ocorrência no Brasil.

6.3. Caracterização molecular dos segmento gênicos HA e NA

6.3.1. Hemaglutinina

A dinâmica evolutiva dos vírus Influenza B tem como característica uma taxa de substituição de nucleotídeos menor do que a apresentada pelos vírus Influenza A. Contudo, entre os segmentos gênicos que compõem o genoma dos vírus Influenza, a HA é o gene que apresenta a maior taxa de mutação (Chen e Holmes, 2008), especialmente, na porção HA1, que corresponde à estrutura mais antigênica do vírus (Wiley e Skehel, 1987).

Neste estudo, sequenciamos 75 amostras positivas para Influenza B, detectadas durante as epidemias de 2004 a 2008. As 31 amostras agrupadas filogeneticamente na linhagem Yam88 apresentaram uma deleção no resíduo 163. A ocorrência de inserções dos aminoácidos Asparagina (N), Ácido Aspártico (D) e N nos resíduos 163, 164 e 165 tem sido observada entre os vírus Influenza B desde a sua descoberta (Nerome e cols., 1998). A partir do início da década de 90, a deleção no resíduo 163 da HA vem sendo sendo descrita nos virus da linhagem Yam88. Em contrapartida, a presença de uma N nesta posição tem sido relatada nos virus da linhagem Vic87 (Nerome e cols., 1998). Os nossos achados corroboram estas observações, exceto pela amostra B/SE/258/2008, que apresentou uma Lisina (K) nesta posição. Esta alteração (N→K) pode ocasionar a perda de um potencial sítio de glicosilação na hemaglutinina.

O acúmulo de glicosilações na superfície da hemaglutinina pode diminuir a sua capacidade de interação com os anticorpos (Settembre e cols., 2010). Os aminoácidos 197, 198 e 199 estão localizados numa região de interação com os receptores celulares e, mutações localizadas nestas posições, podem ter impacto importante na antigenicidade da molécula (Shaw e cols., 2002; Chi e cols., 2003). A presença dos aminoácidos Asparagina (N), Ácido Glutâmico (E) e Treonina (T) nas posições 197, 198 e 199, respectivamente, compõem um sítio de glicosilação. Isto pode favorecer a adição de cadeias oligossacarídicas, o que tornaria o epítipo inacessível aos anticorpos (Nakagawa e cols., 2004). Todas as 75 amostras brasileiras sequenciadas apresentaram os resíduos N197 e T199. Na posição 198, as amostras da linhagem Vic87 apresentaram o resíduo E, ao passo que, dentre as da linhagem Yam88, encontramos o resíduo K (Tabela 5.1). Portanto, todas as

nossas amostras da linhagem Vic87 apresentaram a sequência NET (resíduos 197 a 199), em consonância com o que vem sendo relatado em outros países do Hemisfério Norte nos anos de 2001 a 2006, como o Taiwan e a Itália (Ansaldi e cols., 2003; Chi e cols., 2003; Tsai e cols., 2006; Lee e cols., 2009).

Outras substituições encontradas como K48E, E80R e K129N já haviam sido anteriormente encontradas em outros países, durante as epidemias de 2004/2005 (Lin e cols., 2007).

Durante a epidemia de 2004/2005, substituições nos resíduos Y40 e P131 em isolados da linhagem Yam88 foram relatadas em Taiwan (Tsai *et al.*, 2006). O aminoácido P131 também foi observado em todas as amostras, de ambas as linhagens. Em relação ao aminoácido Y40 a única exceção observada foi em uma amostra do PR, que apresentou o aminoácido histidina (H) em lugar da tirosina (Y). Entre as sequências da linhagem Yam88, o aminoácido H40 (presente na cepa vacinal B/Shanghai/361/2002), foi detectado pouco frequentemente nas nossas amostras. Contudo, este resíduo (H40) encontra-se presente em todas as amostras da linhagem Vic87.

Todas as sequências apresentaram uma treonina (T) no resíduo 121. O trabalho que mostra o reaparecimento da linhagem Vic87 nas regiões sul e sudeste do Brasil evidencia que amostras de 2002 também apresentavam este aminoácido nesta posição (Motta *et al.*, 2006b). Contudo, tanto a cepa vacinal B/Hong Kong/330/2001, como amostras isoladas em Taiwan no período de 2002/2003 apresentam uma Asparagina (N) nesta posição (Tsai *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009). Isso sugere a ausência deste potencial sítio de glicosilação em amostras de vírus circulantes em algumas regiões no Brasil.

Estudos anteriores conduzidos no Brasil de 1999 e 2001, demonstraram a presença do resíduo H179 em amostras da linhagem Yam88 (Motta *et al.*, 2006b). Contudo, a maioria de nossas amostras (linhagem Vic87 e Yam88) apresentaram uma Tirosina (Y) neste resíduo, conforme as sequências das cepas vacinais utilizadas no período de 2004 a 2008. O aminoácido Y179 também foi observado em amostras de 2002 da Europa e de 2002 a 2005 da Ásia (Ansaldi *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2006).

6.3.2. Neuraminidase

Em consonância com os achados de Rota e cols. (1990) e McCullers e cols. (1999b) e com base na sequência deduzida de aminoácidos codificados pelo gene NA, observamos que dois grupos de resíduos permitiriam a diferenciação entre as linhagens Vic87 e Yam88, supostamente situados na haste e na parte superior da molécula, respectivamente. O primeiro grupo seria composto por resíduos nas posições 42 (R ou Q, Yam88 e P, Vic87), 49 (I, Yam88 e T, Vic87) e 61 (Q, Yam88 e H, Vic87) e o segundo, pelos resíduos 235 (D, Yam88 e N, Vic87), 244 (P, Yam88 e S, Vic87), 248 (I, Yam88 e V, Vic87), 320 (E, Yam88 e D, Vic87), 373 (K, Yam88 e E, Vic87), 396 (L, Yam88 e F, Vic87) e 404 (E, Yam88 e K, Vic87) (Rota e cols., 1990; McCullers e cols., 1999b).

Marcadores de resistência aos iNA (oseltamivir e/ou zanamivir) têm sido identificados a partir de mutações específicas, encontradas na sequência do segmento gênico NA e/ou com base no perfil fenotípico de resistência, mensurados pela quantificação da atividade enzimática (Gubareva e cols., 1998; Ison e cols., 2006; Sheu e cols., 2008; Sheu e cols., 2010). Nas nossas amostras, não identificamos nenhum destes marcadores de resistência, previamente definidos na literatura mencionada. Todas apresentaram resíduos idênticos àqueles encontrados nas cepas vacinais, utilizadas durante as epidemias de 2004 a 2008 (E117, R150, D197, I221, H273 e R374). Os dados de vigilância de Influenza do Japão, coletados durante o período de 1996 a 2007, sugerem a maior susceptibilidade do vírus B ao oseltamivir, quando comparado ao vírus A (Tashiro e cols., 2009). Não podemos excluir a possibilidade de circulação de linhagens resistentes na nossa população. Tratando-se de um evento raro (Tashiro e cols., 2009), o reduzido número de amostras constitui um fator absolutamente crítico e limitante.

Considerando que as infecções por Influenza B costumam ser clinicamente mais brandas (Wright e cols., 2007), é esperado que uma menor parcela dos indivíduos acometidos faça uso de iNA. Por conseguinte, a pressão seletiva exercida pelos antivirais sobre o gene NA dos dois vírus tende a ser diferente. O uso indiscriminado e/ou prolongado desta classe de drogas tem sido associado à emergência de variantes resistentes, destacando-se os indivíduos imunocomprometidos e/ou com outras doenças de base (Leophonte, 2005).

A contínua vigilância é crucial para monitorar a emergência de cepas resistentes aos antivirais, visando prontamente implementar as ações cabíveis de intervenção, controle e manejo clínico, bem como orientar o MS nas decisões quanto à adequada aquisição das diferentes classes de drogas.

O conjunto das substituições observadas nas sequências de HA e NA analisadas neste trabalho demonstram a importância do mecanismo de *drift* antigênico para variabilidade genética dos vírus Influenza. Esse processo em associação com a possível pressão seletiva imposta pela vacinação, favorecem a contínua emergência de novas variantes. Estes eventos são responsáveis pelo padrão epidemiológico viral e pela necessidade de seleção anual das cepas vacinais (Lindstrom e cols., 1999; McCullers e cols., 2004; Holmes, 2009).

6.4. Aplicação do método de DGGE para a rápida tipagem das linhagens de Influenza B

A metodologia considerada padrão-ouro para a identificação de linhagens e/ou variantes virais consiste no sequenciamento direto de nucleotídeos. Contudo, ainda são poucos os laboratórios capazes de executá-lo, dada a necessidade do sequenciador automático - ainda oneroso para a realidade brasileira. Diversas alternativas têm sido exploradas para fins de tipagem rápida dos vírus Influenza, dentre as quais o a DGGE (Motta e cols., 2002) e, mais recentemente, o Alta Resolução de Desnaturação (HRM) (Biere e cols., 2010). O protocolo de DGGE separa os fragmentos de DNA, de acordo com o seu comportamento de desnaturação (Fischer e Lerman, 1983; Motta e cols., 2002). Motta e cols. (2006a) utilizaram este método para a rápida tipagem de variantes dos vírus Influenza A/H3N2, com base na porção variável HA1 (Motta e cols., 2006a). Obedecendo à mesma lógica, um dos objetivos deste estudo consistia na padronização de um protocolo para a rápida diferenciação das linhagens do vírus Influenza B por DGGE.

As principais vantagens da utilização desta metodologia consistem na maior rapidez de obtenção de resultados, à um menor custo. O protocolo desenvolvido e apresentado no escopo deste trabalho permite a distinção entre as linhagens Vic87 e Yam88 em apenas três etapas: RT-PCR inicial, *nested* PCR e a DGGE. Desta forma, esta metodologia poderia ser aplicada em uma gama maior de laboratórios, por dispensar o uso de equipamentos sofisticados.

No contexto da Rede de Vigilância Epidemiológica de Influenza, a DGGE poderia ser implantada nos Laboratórios de Saúde Pública, que já realizam diagnóstico molecular nos diferentes estados brasileiros. Isto permitiria a tipagem de um maior número de amostras, enquanto uma etapa prévia ao sequenciamento, ora realizado apenas pelos Centros Nacionais de Influenza da Rede da OMS (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009). Além da clara melhoria em termos de vigilância desta virose, poderíamos melhor conhecer o padrão epidemiológico das diferentes linhagens no país.

Cabe destacar que, como outras técnicas que dependem de leitura visual, a interpretação dos resultados é subjetiva. Ainda, outra limitação importante a ser mencionada consiste na inviabilidade de discriminação entre sequências com perfis idênticos de conteúdo GC (a despeito da similaridade entre as suas sequências) e, conseqüentemente com o mesmo perfil de desnaturação.

6.5. Considerações finais

A literatura brasileira sobre as infecções por Influenza B, especialmente, quando envolvem as características moleculares deste patógeno ainda é escassa. Os resultados apresentados contribuíram para uma melhor compreensão sobre a variabilidade deste vírus, os mecanismos envolvidos na sua evolução molecular, o padrão de circulação das linhagens virais e sua correspondência com as vacinas para Influenza, anualmente administradas no Hemisfério Sul. Todas estas informações são de grande relevância para a contínua implementação e melhoria das políticas e estratégias relacionadas ao controle e prevenção destas infecções na nossa população. Desta forma, tentamos conciliar a pesquisa acadêmica e as demandas de interesse em Saúde Pública, através da geração de um produto diretamente aplicável ao Programa de Vigilância Epidemiológica de Influenza do Ministério da Saúde.

Finalmente, padronizamos o protocolo de DGGE para a tipagem rápida das linhagens de Influenza B, que pode ser implantado nas unidades da Rede de Laboratórios de Saúde Pública da Secretaria de Vigilância em Saúde, que já realizem ensaios moleculares.

7. CONCLUSÕES

- 1) As linhagens Vic87 e Yam88 co-circularam nos estados do Brasil investigados durante o período de 2004 a 2008, em consonância com o padrão epidemiológico observado globalmente.
- 2) No período 2006-2008, observamos a adequada concordância entre as cepas circulantes no período e as cepas vacinais preconizadas para uso no Hemisfério Sul. Entretanto, o mesmo não foi verdadeiro para o período 2004-2005.
- 3) Não foram identificadas cepas de Influenza B resistentes aos iNA.
- 4) Nas amostras investigadas, não foram encontradas evidências de rearranjo gênico entre as linhagens Vic87 e Yam88. O *drift* antigênico, associado à pressão seletiva sobre o gene HA (exercida pelas vacinas), parece haver sido um importante mecanismo de evolução viral. Entretanto, a co-circulação das linhagens favorece a ocorrência de rearranjo entre os segmentos virais, com a potencial emergência de novas sublinhagens.
- 5) O método de DGGE é adequado para a diferenciação entre as linhagens Yam88 e Vic87 do vírus Influenza B.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- 1) Continuar o estudo de evolução molecular dos vírus Influenza B em amostras de diferentes estados brasileiros;
- 2) Pouco se sabe sobre os genótipos dos vírus Influenza B circulantes. Portanto, como perspectiva futura, buscaremos sequenciar outros segmentos gênicos (PA, PB1, PB2, NS, M e NP) dos vírus analisados neste trabalho; e
- 3) Durante a pandemia de Influenza A/H1N1 pdm, cerca da metade das amostras de pacientes com síndrome respiratória aguda grave foram negativas para aquele patógeno (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010). Futuras linhas de trabalho consistem em desenvolver estudos abordando os aspectos epidemiológicos e moleculares da infecção por Influenza B nesta casuística, bem como a co-infecção Influenza A/H1N1 pdm e Influenza B.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1 . Alonso, WJ, Viboud, C, Simonsen, L, Hirano, EW, Daufenbach, LZ and Miller, MA. **Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics.** Am J Epidemiol. 2007; 165, 1434-42.
- 2 . Andersson, B, Ying, JH, Lewis, DE and Gibbs, RA. **Rapid characterization of HIV-1 sequence diversity using denaturing gradient gel electrophoresis and direct automated DNA sequencing of PCR products.** PCR Methods Appl. 1993; 2, 293-300.
- 3 . Ansaldi, F and D'Agaro, P and De Florentiis, D and Puzelli, S and Lin, YP and Gregory, V, *et al.* **Molecular characterization of influenza B viruses circulating in northern Italy during the 2001-2002 epidemic season.** J Med Virol. 2003; 70, 463-9.
- 4 . ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 40, de 28 de abril de 2000.** Brasil; 2000 [updated 2000. cited 12 de julho de 2010]; Available from: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/40_00rdc.htm.
- 5 . ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 70 de dezembro de 2009.** Diário Oficial da União. 2009; Nº. 245
- 6 . Baine, WB, Luby, JP and Martin, SM. **Severe illness with influenza B.** Am J Med. 1980; 68, 181-9.
- 7 . Barr, IG and Komadina, N and Hurt, A and Shaw, R and Durrant, C and Iannello, P, *et al.* **Reassortants in recent human influenza A and B isolates from South East Asia and Oceania.** Virus Res. 2003; 98, 35-44.
- 8 . Beckett, CG and Kosasih, H and Ma'roef, C and Listiyaningsih, E and Elyazar, IR and Wuryadi, S, *et al.* **Influenza surveillance in Indonesia: 1999-2003.** Clin Infect Dis. 2004; 39, 443-9.
- 9 . Beigel, JH and Farrar, J and Han, AM and Hayden, FG and Hyer, R and de Jong, MD, *et al.* **Avian influenza A (H5N1) infection in humans.** N Engl J Med. 2005; 353, 1374-85.
- 10 . Belshe, RB. **Implications of the emergence of a novel H1 influenza virus.** N Engl J Med. 2009; 360, 2667-8.
- 11 . Bender, C and Hall, H and Huang, J and Klimov, A and Cox, N and Hay, A, *et al.* **Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998.** Virology. 1999; 254, 115-23.
- 12 . Bergmann, M and Muster, T. **Mutations in the nonconserved noncoding sequences of the influenza A virus segments affect viral vRNA formation.** Virus Res. 1996; 44, 23-31.
- 13 . Berton, MT, Naeve, CW and Webster, RG. **Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies.** J Virol. 1984; 52, 919-27.

- 14 . Biere, B, Bauer, B and Schweiger, B. **Distinction of Influenza B virus lineages Yamagata and Victoria by real-time PCR.** J Clin Microbiol. 2010.
- 15 . Brassard, DL, Leser, GP and Lamb, RA. **Influenza B virus NB glycoprotein is a component of the virion.** Virology. 1996; 220, 350-60.
- 16 . Burnet, FM and Ferry, JD. **The differentiation of the viruse of fowl plague e newcastle diseases: experiments using the techniqe of choroallantoic inoculation of the developing egg.** . British Journal of Experimental Pathology. 1934; 15, 56-64.
- 17 . Cauchemez, S, Valleron, AJ, Boelle, PY, Flahault, A and Ferguson, NM. **Estimating the impact of school closure on influenza transmission from Sentinel data.** Nature. 2008; 452, 750-4.
- 18 . Centers for Disease Control and Prevention. **Update: influenza activity--United States and worldwide, 2000-01 season, and composition of the 2001-02 influenza vaccine.** JAMA. 2001; 286, 36-8.
- 19 . Centers for Disease Control and Prevention. **Influenza Symptoms and Laboratory Diagnostic Procedures.** 2009. CDC,, Atlanta, USA.
- 20 . Centers for Disease Control and Prevention. **Key Facts About Seasonal Flu Vaccine.** 2010. <http://www.cdc.gov/flu/protect/keyfacts.htm>.
- 21 . Chen, R and Holmes, EC. **The evolutionary dynamics of human influenza B virus.** J Mol Evol. 2008; 66, 655-63.
- 22 . Chi, XS, Bolar, TV, Zhao, P, Rappaport, R and Cheng, SM. **Cocirculation and evolution of two lineages of influenza B viruses in europe and Israel in the 2001-2002 season.** J Clin Microbiol. 2003; 41, 5770-3.
- 23 . Chi, XS and Hu, A and Bolar, TV and Al-Rimawi, W and Zhao, P and Tam, JS, *et al.* **Detection and characterization of new influenza B virus variants in 2002.** J Clin Microbiol. 2005; 43, 2345-9.
- 24 . Chizhmakov, I, Ogden, D, Betakova, T, Phillips, A and Hay, A. **CI- and H+ permeability formed by expression of NB protein from influenza B virus.** Biophysical Journal. 1998; 74, A319-A319.
- 25 . Chow, A, Ma, S, Ling, AE and Chew, SK. **Influenza-associated deaths in tropical Singapore.** Emerg Infect Dis. 2006; 12, 114-21.
- 26 . Clark, PS, Feltz, ET, List-Young, B, Ritter, DG and Noble, GR. **An influenza B epidemic within a remote Alaska community. Serologic, epidemiologic, and clinical observations.** JAMA. 1970; 214, 507-12.
- 27 . Cox, NJ and Subbarao, K. **Influenza.** Lancet. 1999; 354, 1277-82.
- 28 . Crosby, A. **America's Forgotten Pandemic: The Influenza of 1918.** edn. (1989), Cambridge, UK.

- 29 . Daum, LT and Canas, LC and Klimov, AI and Shaw, MW and Gibbons, RV and Shrestha, SK, *et al.* **Molecular analysis of isolates from influenza B outbreaks in the U.S. and Nepal, 2005.** Arch Virol. 2006; 151, 1863-74.
- 30 . Dawood, FS and Jain, S and Finelli, L and Shaw, MW and Lindstrom, S and Garten, RJ, *et al.* **Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans.** N Engl J Med. 2009; 360, 2605-15.
- 31 . de Mello, WA and de Paiva, TM and Ishida, MA and Benega, MA and Dos Santos, MC and Viboud, C, *et al.* **The dilemma of influenza vaccine recommendations when applied to the tropics: the Brazilian case examined under alternative scenarios.** PLoS One. 2009; 4, e5095.
- 32 . Deyde, VM and Okomo-Adhiambo, M and Sheu, TG and Wallis, TR and Fry, A and Dharan, N, *et al.* **Pyrosequencing as a tool to detect molecular markers of resistance to neuraminidase inhibitors in seasonal influenza A viruses.** Antiviral Res. 2009; 81, 16-24.
- 33 . Deyde, VM and Sheu, TG and Trujillo, AA and Okomo-Adhiambo, M and Garten, R and Klimov, AI, *et al.* **Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing.** Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54, 1102-10.
- 34 . Dhar, SK, Tadakuma, K and Mori, K. **Distinct variation pattern in the env of macrophage-tropic simian immunodeficiency virus in vivo demonstrated by denaturing gradient gel electrophoresis.** J Virol Methods. 2000; 89, 49-60.
- 35 . Dietzman, DE, Schaller, JG, Ray, CG and Reed, ME. **Acute myositis associated with influenza B infection.** Pediatrics. 1976; 57, 255-8.
- 36 . Donatelli, I and Campitelli, L and Puzelli, S and Affinito, C and De Marco, MA and Delogu, M, *et al.* **Influenza viruses: structure and interspecies transmission mechanisms.** Vet Res Commun. 2003; 27 Suppl 1, 115-22.
- 37 . Doraisingham, S, Goh, KT, Ling, AE and Yu, M. **Influenza surveillance in Singapore: 1972-86.** Bull World Health Organ. 1988; 66, 57-63.
- 38 . Dosseh, A, Ndiaye, K, Spiegel, A, Sagna, M and Mathiot, C. **Epidemiological and virological influenza survey in Dakar, Senegal: 1996-1998.** Am J Trop Med Hyg. 2000; 62, 639-43.
- 39 . Eccles, R. **Understanding the symptoms of the common cold and influenza.** Lancet Infect Dis. 2005; 5, 718-25.
- 40 . Fauquet, CM and Fargette, D. **International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species.** Virol J. 2005; 2, 64.
- 41 . Felsenstein, J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** . Evolution 39:783-791. 1985; 39:783-791., 783-791.
- 42 . FIOCRUZ. LVRS. Motta, FC. **POP-LVRS-TC-003 - Quantificação de DNA por eletroforese no gel de agarose.** 2010a. pag. 6, Rio de Janeiro.

- 43 . FIOCRUZ. LVRS. Motta, FC. **POP-LVRS-TC-004 - Purificação de produto de PCR extraído do gel de agarose com o Kit "QIAQuick Gel Extraction"**. 2010b. pag. 9, Rio de Janeiro.
- 44 . FIOCRUZ. LVRS. Motta, FC. **POP-LVRS-TC-006 - Extração de RNA Kit "QIAmp viral RNA mini kit"**. 2010c. pag. 10, Rio de Janeiro.
- 45 . FIOCRUZ. LVRS. Motta, FC. **POP-LVRS-TC-007 - Preparação das amostras para sequenciamento automático de nucleotídeos - Kit Big Dye Terminator cycle sequencing standard "Versão 3.1"**. 2010d. pag. 11, Rio de Janeiro.
- 46 . FIOCRUZ. LVRS. Motta, FC. **POP-LVRS-TVR-012 - Reação de transcrição reversa para vírus influenza e sincicial respiratório**. 2010e. pag. 7, Rio de Janeiro.
- 47 . Fischer, SG and Lerman, LS. **DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; 80, 1579-83.
- 48 . Fleming, DM. **Managing influenza: amantadine, rimantadine and beyond**. Int J Clin Pract. 2001; 55, 189-95.
- 49 . Francis, T, Jr. **A New Type of Virus from Epidemic Influenza**. Science. 1940; 92, 405-408.
- 50 . Gronesova, P, Kabat, P, Trnka, A and Betakova, T. **Using nested RT-PCR analyses to determine the prevalence of avian influenza viruses in passerines in western Slovakia, during summer 2007**. Scand J Infect Dis. 2008; 40, 954-7.
- 51 . Gubareva, LV, Matrosovich, MN, Brenner, MK, Bethell, RC and Webster, RG. **Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus**. J Infect Dis. 1998; 178, 1257-62.
- 52 . Hagmaier, K, Jennings, S, Buse, J, Weber, F and Kochs, G. **Novel gene product of Thogoto virus segment 6 codes for an interferon antagonist**. J Virol. 2003; 77, 2747-52.
- 53 . Harris, KA and Teo, CG. **Diversity of hepatitis C virus quasispecies evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis**. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8, 62-73.
- 54 . Hay, AJ. **Functional Properties of the Virus Ion Channels**. Textbook of Influenza (ed. by B Science), (1998) pag. 74-81. Blackwell Science, London.
- 55 . Hilleman, MR. **Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control**. Vaccine. 2002; 20, 3068-87.
- 56 . Hiromoto, Y and Saito, T and Lindstrom, SE and Li, Y and Nerome, R and Sugita, S, *et al.* **Phylogenetic analysis of the three polymerase genes (PB1, PB2 and PA) of influenza B virus**. J Gen Virol. 2000; 81, 929-37.

- 57 . Hirst, GK. **The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus.** Science. 1941; 94, 22-23.
- 58 . Hofling, K, Klenk, HD and Herrler, G. **Inactivation of inhibitors by the receptor-destroying enzyme of influenza C virus.** J Gen Virol. 1997; 78 (Pt 3), 567-70.
- 59 . Holmes, EC. **RNA virus genomics: a world of possibilities.** J Clin Invest. 2009; 119, 2488-95.
- 60 . Hurwitz, ES, Nelson, DB, Davis, C, Morens, D and Schonberger, LB. **National surveillance for Reye syndrome: a five-year review.** Pediatrics. 1982; 70, 895-900.
- 61 . ICTVdB Management. **Influenzavirus B.** ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4 (ed. by C Büchen-Osmond), 2006. Columbia University, , New York, USA.
- 62 . Imai, M, Kawasaki, K and Odagiri, T. **Cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles in production of infectious virus.** J Virol. 2008; 82, 728-39.
- 63 . Ison, MG, Gubareva, LV, Atmar, RL, Treanor, J and Hayden, FG. **Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series.** J Infect Dis. 2006; 193, 760-4.
- 64 . Jackson, D, Barclay, W and Zurcher, T. **Characterization of recombinant influenza B viruses with key neuraminidase inhibitor resistance mutations.** J Antimicrob Chemother. 2005; 55, 162-9.
- 65 . Jian, JW and Lai, CT and Kuo, CY and Kuo, SH and Hsu, LC and Chen, PJ, *et al.* **Genetic analysis and evaluation of the reassortment of influenza B viruses isolated in Taiwan during the 2004-2005 and 2006-2007 epidemics.** Virus Res. 2008; 131, 243-9.
- 66 . Kanegae, Y and Sugita, S and Endo, A and Ishida, M and Senya, S and Osako, K, *et al.* **Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season.** J Virol. 1990; 64, 2860-5.
- 67 . Kawai, N and Ikematsu, H and Iwaki, N and Kawashima, T and Maeda, T and Mitsuoka, S, *et al.* **Longer virus shedding in influenza B than in influenza A among outpatients treated with oseltamivir.** J Infect. 2007; 55, 267-72.
- 68 . Koenig, M, Kosha, S, Hickman, M, Heath, D, Riddell, S and Aldous, W. **Detection of influenza virus from throat and pharyngeal swabs with a nested duplex light cycler RT-PCR.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 46, 35-7.
- 69 . Kollerova, E and Betakova, T. **Influenza viruses and their ion channels.** Acta Virol. 2006; 50, 7-16.
- 70 . Koopmans, M and Wilbrink, B and Conyn, M and Natrop, G and van der Nat, H and Vennema, H, *et al.* **Transmission of H7N7 avian influenza A virus to**

human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet. 2004; 363, 587-93.

- 71 . Kramarz, P, Monnet, D, Nicoll, A, Yilmaz, C and Ciancio, B. **Use of oseltamivir in 12 European countries between 2002 and 2007--lack of association with the appearance of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses.** Euro Surveill. 2009; 14.
- 72 . Lackenby, A, Democratis, J, Siqueira, MM and Zambon, MC. **Rapid quantitation of neuraminidase inhibitor drug resistance in influenza virus quasispecies.** Antivir Ther. 2008; 13, 809-20.
- 73 . Lee, YM and Wang, SF and Lee, CM and Chen, KH and Chan, YJ and Liu, WT, *et al.* **Virological investigation of four outbreaks of influenza B reassortants in the northern region of Taiwan from October 2006 to February 2007.** BMC Res Notes. 2009; 2, 86.
- 74 . Leekha, S, Zitterkopf, NL, Espy, MJ, Smith, TF, Thompson, RL and Sampathkumar, P. **Duration of influenza A virus shedding in hospitalized patients and implications for infection control.** Infect Control Hosp Epidemiol. 2007; 28, 1071-6.
- 75 . Leophonte, P. **Antivirals for influenza.** Bull Acad Natl Med. 2005; 189, 341-55; discussion 355-7.
- 76 . Lin, JH and Chiu, SC and Shaw, MW and Lin, YC and Lee, CH and Chen, HY, *et al.* **Characterization of the epidemic influenza B viruses isolated during 2004-2005 season in Taiwan.** Virus Res. 2007; 124, 204-11.
- 77 . Lindstrom, SE, Cox, NJ and Klimov, A. **Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events.** Virology. 2004; 328, 101-19.
- 78 . Lindstrom, SE, Hiromoto, Y, Nishimura, H, Saito, T, Nerome, R and Nerome, K. **Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes.** J Virol. 1999; 73, 4413-26.
- 79 . Liu, S and Hou, G and Zhuang, Q and Shu, Y and Chen, J and Jiang, W, *et al.* **A SYBR Green I real-time RT-PCR assay for detection and differentiation of influenza A(H1N1) virus in swine populations.** J Virol Methods. 2009; 162, 184-7.
- 80 . Matsuzaki, Y and Sugawara, K and Takashita, E and Muraki, Y and Hongo, S and Katsushima, N, *et al.* **Genetic diversity of influenza B virus: the frequent reassortment and cocirculation of the genetically distinct reassortant viruses in a community.** J Med Virol. 2004; 74, 132-40.
- 81 . McCullers, JA, Facchini, S, Chesney, PJ and Webster, RG. **Influenza B virus encephalitis.** Clin Infect Dis. 1999a; 28, 898-900.
- 82 . McCullers, JA, Saito, T and Iverson, AR. **Multiple genotypes of influenza B virus circulated between 1979 and 2003.** J Virol. 2004; 78, 12817-28.

- 83 . McCullers, JA, Wang, GC, He, S and Webster, RG. **Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature.** J Virol. 1999b; 73, 7343-8.
- 84 . McHardy, AC and Adams, B. **The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus.** PLoS Pathog. 2009; 5, e1000566.
- 85 . McKimm-Breschkin, J and Trivedi, T and Hampson, A and Hay, A and Klimov, A and Tashiro, M, *et al.* **Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir.** Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47, 2264-72.
- 86 . Meibalane, R, Sedmak, GV, Sasidharan, P, Garg, P and Grausz, JP. **Outbreak of influenza in a neonatal intensive care unit.** J Pediatr. 1977; 91, 974-6.
- 87 . Ministério da Saúde. **Plano Brasileiro de Preparação para Enfrentamento de uma Pandemia de Infuenza.** 2010. ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/outros/bepa23_suple4.pdf, Brasília, Brasil.
- 88 . Ministério da Saúde. **Habilita 17 (dezessete) Laboratórios de Referência Nacional, para as Redes Nacionais e Regionais de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica e Ambiental em Saúde.** Portaria SVS n. 97 de 5 de outubro de 2008, 2008. Brasília, Brasil.
- 89 . Minnich, LL and Ray, CG. **Early testing of cell cultures for detection of hemadsorbing viruses.** J Clin Microbiol. 1987; 25, 421-2.
- 90 . Monto, AS and McKimm-Breschkin, JL and Macken, C and Hampson, AW and Hay, A and Klimov, A, *et al.* **Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use.** Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50, 2395-402.
- 91 . Motta, FC, Rosado, AS and Couceiro, JN. **Standardization of denaturing gradient gel electrophoresis for mutant screening of influenza A (H3N2) virus samples.** J Virol Methods. 2002; 101, 105-15.
- 92 . Motta, FC, Rosado, AS and Siqueira, MM. **Comparison between denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic analysis for characterization of A/H3N2 influenza samples detected during the 1999-2004 epidemics in Brazil.** J Virol Methods. 2006a; 135, 76-82.
- 93 . Motta, FC, Siqueira, MM, Lugon, AK, Stralio, SM, Fernandes, SB and Krawczuk, MM. **The reappearance of Victoria lineage influenza B virus in Brazil, antigenic and molecular analysis.** J Clin Virol. 2006b; 36, 208-14.
- 94 . Moura, FE, Perdigao, AC and Siqueira, MM. **Seasonality of influenza in the tropics: a distinct pattern in northeastern Brazil.** Am J Trop Med Hyg. 2009; 81, 180-3.
- 95 . Moya, A, Holmes, EC and Gonzalez-Candelas, F. **The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses.** Nat Rev Microbiol. 2004; 2, 279-88.

- 96 . Mullis, K, Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G and Erlich, H. **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986; 51 Pt 1, 263-73.
- 97 . Murphy, BR, Kasel, JA and Chanock, RM. **Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man.** N Engl J Med. 1972; 286, 1329-32.
- 98 . Murti, KG and Webster, RG. **Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza virions as revealed by immunoelectron microscopy.** Virology. 1986; 149, 36-43.
- 99 . Myers, RM, Fischer, SG, Lerman, LS and Maniatis, T. **Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis.** Nucleic Acids Res. 1985; 13, 3131-45.
- 100 . Nakagawa, N, Higashi, N and Nakagawa, T. **Cocirculation of antigenic variants and the vaccine-type virus during the 2004-2005 influenza B virus epidemics in Japan.** J Clin Microbiol. 2009; 47, 352-7.
- 101 . Nakagawa, N, Kubota, R, Maeda, A and Okuno, Y. **Influenza B virus victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season.** J Clin Microbiol. 2004; 42, 3295-7.
- 102 . Nava, P. **Chão de Ferro: memórias 3.** . edn. (1989) Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- 103 . Nayak, DP, Hui, EK and Barman, S. **Assembly and budding of influenza virus.** Virus Res. 2004; 106, 147-65.
- 104 . Nerome, R and Hiromoto, Y and Sugita, S and Tanabe, N and Ishida, M and Matsumoto, M, *et al.* **Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism.** Arch Virol. 1998; 143, 1569-83.
- 105 . Nguyen, HL and Saito, R and Ngiem, HK and Nishikawa, M and Shobugawa, Y and Nguyen, DC, *et al.* **Epidemiology of influenza in Hanoi, Vietnam, from 2001 to 2003.** J Infect. 2007; 55, 58-63.
- 106 . Nicholson, KG. **Human influenza.** Textbook of Influenza. (ed. by KG Nicholson and RG Webster and AJ Hay), (1998) pag. 219-264. Blackwell Science, London.
- 107 . Nicholson, KG, Wood, JM and Zambon, M. **Influenza.** Lancet. 2003; 362, 1733-45.
- 108 . O'Neill, RE, Talon, J and Palese, P. **The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins.** EMBO J. 1998; 17, 288-96.
- 109 . Okazaki, K and Takada, A and Ito, T and Imai, M and Takakuwa, H and Hatta, M, *et al.* **Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia.** Arch Virol. 2000; 145, 885-93.

- 110 . Osterhaus, AD, Rimmelzwaan, GF, Martina, BE, Bestebroer, TM and Fouchier, RA. **Influenza B virus in seals.** Science. 2000; 288, 1051-3.
- 111 . Palese, P and Shaw, M. **Orthomyxoviridae: The viruses and their replication.** Fields Virology (ed. by DM Knipe and PM Howley), (2007) pag. 1647–1690. Lippincott Williams & Wilkins., Philadelphia.
- 112 . Price, DA, Postlethwaite, RJ and Longson, M. **Influenzavirus A2 infections presenting with febrile convulsions and gastrointestinal symptoms in young children.** Clin Pediatr (Phila). 1976; 15, 361-7.
- 113 . Puzelli, S and Frezza, F and Fabiani, C and Ansaldi, F and Campitelli, L and Lin, YP, *et al.* **Changes in the hemagglutinins and neuraminidases of human influenza B viruses isolated in Italy during the 2001-02, 2002-03, and 2003-04 seasons.** J Med Virol. 2004; 74, 629-40.
- 114 . Rao, BL and Banerjee, K. **Influenza surveillance in Pune, India, 1978-90.** Bull World Health Organ. 1993; 71, 177-81.
- 115 . Rota, PA, Hemphill, ML, Whistler, T, Regnery, HL and Kendal, AP. **Antigenic and genetic characterization of the haemagglutinins of recent cocirculating strains of influenza B virus.** J Gen Virol. 1992; 73 (Pt 10), 2737-42.
- 116 . Rota, PA, Wallis, TR, Harmon, MW, Rota, JS, Kendal, AP and Nerome, K. **Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983.** Virology. 1990; 175, 59-68.
- 117 . Ruigrok, RWH. **Structure of Influenza A, B and C viruses.** Textbook of Influenza. (ed. by KG Nicholson and RG Webster and AJ Hay), (1998) pag. 29-42. Blackwell Science, London.
- 118 . Saito, R, Li, D and Suzuki, H. **Amantadine-resistant influenza A (H3N2) virus in Japan, 2005-2006.** N Engl J Med. 2007; 356, 312-3.
- 119 . Saito, R and Suzuki, Y and Li, D and Zaraket, H and Sato, I and Masaki, H, *et al.* **Increased incidence of adamantane-resistant influenza A(H1N1) and A(H3N2) viruses during the 2006-2007 influenza season in Japan.** J Infect Dis. 2008; 197, 630-2; author reply 632-3.
- 120 . Saitou, N and Nei, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** Mol Biol Evol. 1987; 4, 406-25.
- 121 . Sanger, F, Donelson, JE, Coulson, AR, Kossel, H and Fischer, D. **Determination of a nucleotide sequence in bacteriophage f1 DNA by primed synthesis with DNA polymerase.** J Mol Biol. 1974; 90, 315-33.
- 122 . Scholtissek, C, Rohde, W, Von Hoyningen, V and Rott, R. **On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2.** Virology. 1978; 87, 13-20.
- 123 . Secretaria de Vigilância em Saúde, MS. **Influenza.** Guia de Vigilância Epidemiológica, 2005. pag. 434 - 443.

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf,
Brasília, Brasil.

- 124 . Secretaria de Vigilância em Saúde, MS. **Influenza**. Guia de Vigilância Epidemiológica. 2009; Caderno 1, 1 - 24.
- 125 . Secretaria de Vigilância em Saúde, MS. **Influenza Pandêmica (H1N1) 2009 – Análise da situação epidemiológica e da resposta no ano de 2009**. Boletim epidemiológico eletrônico, 2010. pag. 1 - 21, Brasília.
- 126 . Settembre, EC, Dormitzer, PR and Rappuoli, R. **H1N1: can a pandemic cycle be broken?** Sci Transl Med. 2010; 2, 24ps14.
- 127 . Shaw, MW, Lamb, RA, Erickson, BW, Briedis, DJ and Choppin, PW. **Complete nucleotide sequence of the neuraminidase gene of influenza B virus**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982; 79, 6817-21.
- 128 . Shaw, MW and Xu, X and Li, Y and Normand, S and Ueki, RT and Kunimoto, GY, *et al.* **Reappearance and global spread of variants of influenza B/Victoria/2/87 lineage viruses in the 2000-2001 and 2001-2002 seasons**. Virology. 2002; 303, 1-8.
- 129 . Sheffield, VC, Cox, DR, Lerman, LS and Myers, RM. **Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86, 232-6.
- 130 . Shek, LP and Lee, BW. **Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics**. Paediatr Respir Rev. 2003; 4, 105-11.
- 131 . Sheu, TG, Deyde, VM, Garten, RJ, Klimov, AI and Gubareva, LV. **Detection of antiviral resistance and genetic lineage markers in influenza B virus neuraminidase using pyrosequencing**. Antiviral Res. 2010; 85, 354-60.
- 132 . Sheu, TG and Deyde, VM and Okomo-Adhiambo, M and Garten, RJ and Xu, X and Bright, RA, *et al.* **Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008**. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52, 3284-92.
- 133 . Shinde, V and Bridges, CB and Uyeki, TM and Shu, B and Balish, A and Xu, X, *et al.* **Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009**. N Engl J Med. 2009; 360, 2616-25.
- 134 . Sleight, MJ, Both, GW, Underwood, PA and Bender, VJ. **Antigenic drift in the hemagglutinin of the Hong Kong influenza subtype: correlation of amino acid changes with alterations in viral antigenicity**. J Virol. 1981; 37, 845-53.
- 135 . Smith, FI, Parvin, JD and Palese, P. **Detection of single base substitutions in influenza virus RNA molecules by denaturing gradient gel electrophoresis of RNA-RNA or DNA-RNA heteroduplexes**. Virology. 1986; 150, 55-64.

- 136 . Stannard, LM. **Influenza virus.** 1995.
<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/fluivirus.html>.
- 137 . Stockton, J, Ellis, JS, Saville, M, Clewley, JP and Zambon, MC. **Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses.** J Clin Microbiol. 1998; 36, 2990-5.
- 138 . Suzuki, Y. **Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses.** Biol Pharm Bull. 2005; 28, 399-408.
- 139 . Suzuki, Y and Nei, M. **Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes.** Mol Biol Evol. 2002; 19, 501-9.
- 140 . Tamura, K, Dudley, J, Nei, M and Kumar, S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** Mol Biol Evol. 2007; 24, 1596-9.
- 141 . Tashiro, M and McKimm-Breschkin, JL and Saito, T and Klimov, A and Macken, C and Zambon, M, *et al.* **Surveillance for neuraminidase-inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007.** Antivir Ther. 2009; 14, 751-61.
- 142 . Taylor, RM. **A further note on 1233 influenza C virus.** Arch Gesamte Virusforsch. 1951; 4, 485-500.
- 143 . Teixeira, LA. **Medo e morte: Sobre a epidemia de gripe espanhola de 1918.** . Série Estudos em Saúde Coletiva, 1993. pag. 32. Universidade do Estado do Rio de Janeiro/Instituto de Medicina Social, Rio de Janeiro.
- 144 . Tsai, HP and Wang, HC and Kiang, D and Huang, SW and Kuo, PH and Liu, CC, *et al.* **Increasing appearance of reassortant influenza B virus in Taiwan from 2002 to 2005.** J Clin Microbiol. 2006; 44, 2705-13.
- 145 . Ujike, M and Shimabukuro, K and Mochizuki, K and Obuchi, M and Kageyama, T and Shirakura, M, *et al.* **Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) during 2007-2009 influenza seasons, Japan.** Emerg Infect Dis. 2010; 16, 926-35.
- 146 . Vabret, A and Sapin, G and Lezin, B and Mosnier, A and Cohen, J and Burnouf, L, *et al.* **Comparison of three non-nested RT-PCR for the detection of influenza A viruses.** J Clin Virol. 2000; 17, 167-75.
- 147 . Viboud, C, Alonso, WJ and Simonsen, L. **Influenza in tropical regions.** PLoS Med. 2006; 3, e89.
- 148 . von Itzstein, M. **The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors.** Nat Rev Drug Discov. 2007; 6, 967-74.
- 149 . Webster, RG. **Influenza: an emerging disease.** Emerg Infect Dis. 1998; 4, 436-41.
- 150 . WHO. **Global Influenza Preparedness and Response.** World Health Organization. 2009.

- 151 . Wiley, DC and Skehel, JJ. **The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus.** Annu Rev Biochem. 1987; 56, 365-94.
- 152 . Woodward, TM, Carlson, J, McClelland, C and DeMartini, JC. **Analysis of lentiviral genomic variation by denaturing gradient gel electrophoresis.** Biotechniques. 1994; 17, 366-71.
- 153 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2001 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2000; 75, 330-3.
- 154 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2001-2002 season.** Wkly Epidemiol Rec. 2001a; 76, 58-61.
- 155 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2002 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2001b; 76, 311-4.
- 156 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2002-2003 season.** Wkly Epidemiol Rec. 2002a; 77, 62-6.
- 157 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2004 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2003a; 78, 375-9.
- 158 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2004-2005 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2004a; 79, 88-92.
- 159 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2005 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2004b; 79, 369-73.
- 160 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2005-2006 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2005a; 80, 71-5.
- 161 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2006 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2005b; 80, 342-7.
- 162 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2006-2007 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2006a; 81, 82-6.
- 163 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2007 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2006b; 81, 390-5.

- 164 . World Health Organization. **Monitoring of neuraminidase inhibitor resistance among clinical influenza virus isolates in Japan during the 2003-2006 influenza seasons.** Wkly Epidemiol Rec. 2007a; 82, 149-50.
- 165 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2007-2008 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2007b; 82, 69-74.
- 166 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2008 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2007c; 82, 351-6.
- 167 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2008-2009 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2008a; 83, 81-7.
- 168 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2009 southern hemisphere influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2008b; 83, 366-72.
- 169 . World Health Organization. **CDC protocol of realtime RTPCR for swine influenza A (H1N1).** (ed. by CDC), 2009a. Atlanta, USA.
- 170 . World Health Organization. **FluNet.** 2009b [updated 2009b. cited 2010 15/04/2010]; Available from: <http://gamapserver.who.int/GlobalAtlas/home.asp>.
- 171 . World Health Organization. **Influenza (Seasonal).** 2009c. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>.
- 172 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2009-2010 influenza season (northern hemisphere winter).** Wkly Epidemiol Rec. 2009d; 84, 65-72.
- 173 . World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2010 influenza season (southern hemisphere winter).** Wkly Epidemiol Rec. 2009e; 84, 421-31.
- 174 . World Health Organization. **Current WHO phase of pandemic alert.** 2010a [updated 2010a. cited]; Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/phase/en/index.html.
- 175 . World Health Organization. **Percentage of respiratory specimens that tested positive for influenza.,** 2010b. http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_influenzapositive_FluTransmissionZones_week29.png.
- 176 . World Health Organization, W. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2003 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2002b; 77, 344-8.
- 177 . World Health Organization, W. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2003-2004 influenza season.** Wkly Epidemiol Rec. 2003b; 78, 58-62.

- 178 . Wright, PF, Neumann, G and Kawaoka, Y. **Orthomyxoviruses**. Fields Virology (ed. by DM Knipe and PM Howley), (2007) pag. 1691-1730. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 179 . Wu, W and Kang, X and Bai, Z and Liu, L and Li, J and Wu, X, *et al.* **Detection of pandemic influenza A/H1N1/2009 virus by real-time reverse transcription polymerase chain reaction**. J Virol Methods. 2010; 165, 294-6.
- 180 . Xu, X and Lindstrom, SE and Shaw, MW and Smith, CB and Hall, HE and Mungall, BA, *et al.* **Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses**. Virus Res. 2004; 103, 55-60.
- 181 . Yassine, HM, Lee, CW, Gourapura, R and Saif, YM. **Interspecies and intraspecies transmission of influenza A viruses: viral, host and environmental factors**. Anim Health Res Rev. 2010; 11, 53-72.
- 182 . Yewdell, JW, Caton, AJ and Gerhard, W. **Selection of influenza A virus adsorptive mutants by growth in the presence of a mixture of monoclonal antihemagglutinin antibodies**. J Virol. 1986; 57, 623-8.
- 183 . Zambon, M. **Laboratory diagnosis of influenza**. Textbook of Influenza (ed. by B Science), (1998) pag. 300-305. Blackwell Science, London.

ANEXO

Anexo 1. – Tabela com de aminoácidos com as siglas e seus códons codificantes.

Sigla	Aminoácidos	Códons
A	Alanina	GCA GCC GCG GCU
C	Cisteína	UGC UGU
D	Ácido aspártico	GAC GAU
E	Ácido glutâmico	GAA GAG
F	Fenilalanina	UUC UUU
G	Glicina	GGA GGC GGG GGU
H	Histidina	CAC CAU
I	Isoleucina	AUA AUC AUU
K	Lisina	AAA AAG
L	Leucina	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
M	Metionina	AUG
N	Asparagina	AAC AAU
P	Prolina	CCA CCC CCG CCU
Q	Glutamina	CAA CAG
R	Arginina	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
S	Serina	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
T	Treonina	ACA ACC ACG ACU
V	Valina	GUA GUC GUG GUU
W	Triptofano	UGG
Y	Tirosina	UAC UAU

A=Adenina; T=Timina; C=Citosina; e G=Guanina

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)