

ARTIGO ORIGINAL

Acta Méd Port 2005; 18: 19-26

ACTIVIDADE GRIPAL EM PORTUGAL NO INVERNO DE 2000/2001

Análise Antigénica e Genética das Estirpes de Vírus *Influenza*

PEDRO PECHIRRA, HELENA REBELO-DE-ANDRADE, RAQUEL GUIOMAR, CARLOS RIBEIRO,
ANABELA COELHO, SÓNIA PEDRO, FRANCISCO GEORGE
Unidade de Vírus Respiratórios e Enterovírus. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.Lisboa

RESUMO

As infecções por vírus *influenza* são uma importante causa de morbilidade em todos os grupos etários e estão associados a uma elevada mortalidade nos idosos e nos indivíduos pertencentes a grupos de risco.

No presente estudo analisaram-se os dados da vigilância epidemiológica da gripe durante o Inverno de 2000/2001. Os dados clínicos, epidemiológicos e virológicos referentes aos casos de síndrome gripal foram recolhidos através do Programa Nacional de Vigilância da Gripe que se desenvolve em colaboração com a Direcção Geral da Saúde e integra a informação obtida a partir das redes Médicos-Sentinela e Serviços de Urgência. A análise dos dados recolhidos mostram que, durante a época de Inverno de 2000/2001, a actividade gripal foi baixa, sendo o período epidémico curto e de pequena intensidade e duração. As taxas de incidência do síndrome gripal subiram acima da linha de base durante três semanas e não ultrapassaram os 74 casos por 100 000 habitantes. Os vírus *influenza* do tipo B foram predominantes, verificando-se a presença simultânea de vírus *influenza* tipo AH1 e AH3. A caracterização antigénica e genética das estirpes isoladas permitiu confirmar a semelhança entre estas estirpes virais e as estirpes vacinais e detectar a extensão dos drifts antigénicos. Saliente-se que apesar da maioria das estirpes de vírus *influenza* B serem idênticas antigenicamente à estirpe vacinal, a caracterização genética mostrou uma evolução dirigida para a estirpe B/Sichuan/379/99 que viria a integrar a vacina antigripal em 2001/2002. Consequentemente, observou-se a co-circulação de duas linhagens diferentes evidenciada pela análise filogenética das estirpes B isoladas no nosso país.

Palavras-chave: Gripe, *influenza*, vigilância epidemiológica, epidemias, RT-PCR, sequenciação

SUMMARY**INFLUENZA ACTIVITY 2000/2001**

Influenza viral infections are an important cause of morbidity in all age groups and are associated with a high mortality rate amongst the elderly and in risk groups.

The current study analyses data from the epidemiological surveillance of influenza during the 2000/2001-winter season. Clinical, epidemiological and virological data relative to cases of influenza syndrome were collected via the National Influenza Surveillance Scheme, in collaboration with the General Directory of Health and integrates the

information obtained by the Network of Sentinel Medical Practitioners and Emergency Units. The data analysis hereby obtained shows a low influenza activity during the 2000/2001-winter season, with an epidemiological period characterized by small duration and intensity.

The incidence rate of influenza-like illnesses increased above the base line during three weeks and didn't surpass 74 cases per 1000 000 inhabitants. Influenza B viruses were predominant with the simultaneous presence of influenza A (H₁ and H₃). The antigenic and genetic characterisation of the isolates allowed the confirmation of the similarity between these viral strains and the vaccine strains as well as the extent of the antigenic drift.

Despite the antigenic similarity between the majority of influenza B isolates and the vaccine strains it's noticeable that the genetic characteristics showed an evolution directed towards the B/Sichuan/379/99 strain, which would later be incorporated in the 2001/2002 influenza vaccine.

The co-circulation of two different lineages was consequently observed by the phylogenetic analysis of the B strains isolated in our country.

Keywords: Influenza, Influenza – like illnesses, epidemiological surveillance, Epidemic, RT-PCR, Sequence Analysis

INTRODUÇÃO

As infecções por vírus *influenza* são uma importante causa de morbidade em todos os grupos etários e estão associadas a uma elevada mortalidade nos idosos e nos indivíduos pertencentes a grupos de risco.

Os vírus *influenza* estão incluídos na Família *Orthomyxoviridae*; as suas partículas virais contêm duas glicoproteínas de superfície: a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) e o genoma segmentado é constituído por RNA de cadeia simples de polaridade negativa. Os vírus *influenza* do tipo A e B estão associados a epidemias no homem. A pressão imunitária do organismo hospedeiro sobre a acumulação de mutações pontuais conduz a uma alteração antigénica gradual das glicoproteínas de superfície (*drift antigénico* ou *variações minor*)¹. Por sua vez, a recombinação génica entre vírus *influenza* provenientes de hospedeiros de espécies diferentes pode dar lugar a um novo sub-tipo, conferindo ao recombinante uma grande alteração antigénica (*shift antigénico* ou *variações major*). Este facto, observa-se sobretudo no vírus *influenza* do tipo A, para o qual existem 15 subtipos HA e 9 NA diferentes e que infectam várias espécies animais².

A molécula da hemaglutinina, após a sua tradução, é dividida por proteases celulares em duas sub-unidades, HA1 e HA2³. As regiões antigénicas variáveis da sub-unidade HA1 são potenciais alvos dos anticorpos.

A vigilância da actividade gripal e a prevenção da

doença requerem uma contínua monitorização dos produtos génicos da subunidade HA1 da hemaglutinina, de modo a otimizar a eficiência da vacina antigripal⁴ e a obter informações adicionais sobre as relações evolutivas das estirpes de vírus *influenza* circulantes⁵⁻⁷.

No presente estudo analisaram-se os dados da vigilância epidemiológica da gripe referentes ao Inverno de 2000/2001. Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais referentes aos casos da síndrome gripal foram recolhidos através do Programa Nacional de Vigilância da Gripe, que integra colaboração das redes *Médicos Sentinela* e *Serviços de Urgência*.

MATERIAL E MÉTODOS

Dados clínicos e epidemiológicos

Os dados e informação de base clínica e virológica sobre os casos de síndrome gripal foram recolhidos por (uma média de) 220 clínicos gerais, distribuídos por todos os distritos do território do continente e Regiões Autónomas, e que fazem parte da rede nacional de Médicos Sentinela. A lista de utentes de cada médico é actualizada anualmente e caracterizada no que se refere à dimensão e dados demográficos, estando anualmente em observação uma média de 170 000 indivíduos que representam 1,8% da população portuguesa. Cada médico notifica semanalmente para o Observatório Nacional da Saúde (ONSA), todos os casos de síndrome gripal que ocorrem nos utentes

das suas listas, permitindo calcular taxas de incidência da doença (novos episódios por 100 000 habitantes). A definição de caso de síndrome gripal e de gripe baseiam-se na Classificação Internacional de Problemas de Saúde em Cuidados Primários.

Aproximadamente 25% dos médicos participantes na rede colhem exsudados da nasofaringe aos doentes com síndrome gripal que se apresentam nos quatro primeiros dias de evolução da sintomatologia. Estes produtos biológicos são enviados para o Centro Nacional da Gripe (CNG) para análise virológica segundo as metodologias que a seguir se descrevem.

Linha de base de incidência da doença. A linha de base de incidência da síndrome gripal foi definida pela curva do intervalo superior de confiança, calculada em função do desvio padrão das médias semanais das incidências inferiores a 50 casos por 100 000 habitantes, recolhidas ao longo de 10 anos.

Tratamento de produtos biológicos. Os exsudados da nasofaringe foram colhidos a doentes com síndrome gripal, durante os primeiros 4 dias após o aparecimento dos sintomas. Os exsudados foram tratados com 2,5 ml de triptose suplementada com 0,5% de gelatina e uma mistura de antibióticos (penicilina 1 UI, neomicina 50 mg/ml e estreptomina 1 UI). A suspensão obtida foi utilizada de imediato nos procedimentos abaixo descritos e o restante distribuído e armazenado a -70°C.

Isolamento de vírus. Os produtos biológicos tratados foram inoculados em células MDCK e/ou em ovos embrionados de galinha e os sobrenadantes avaliados para a presença de vírus influenza por Reacção de Inibição de Hemaglutinação⁸.

Análise antigénica. Os líquidos resultantes da inoculação de culturas celulares ou de ovos embrionados de galinha considerados positivos para a presença de vírus influenza, foram analisados por inibição de hemaglutinação (IHA) para tipificação das estirpes virais isoladas. A análise foi efectuada utilizando um painel de anti-soros preparados em furão (fornecidos pela OMS) contra os vírus influenza A(H1N1), A(H3N2) e influenza B e segundo os protótipos em circulação em cada Inverno. Os soros foram tratados por adição de caulino, para remoção dos inibidores inespecíficos e das aglutininas naturais para os eritrócitos. Todos os testes de IHA foram realizados utilizando oito unidades hemaglutinantes do vírus e 0,5% (v/v) de eritrócitos de peru ou galinha.

Detecção de RNA viral. Todos os produtos biológicos foram analisados por RT-PCR em multiplex para tipagem e sub-tipagem do vírus influenza⁹. O RNA viral foi extraído a partir de 150 µl de amostra com isotiocianato de guanidina

e posterior adsorção do ácido nucleico em sílica¹⁰. O cDNA foi amplificado conforme descrito na literatura⁹.

Sequenciação da subunidade HA1 da hemaglutinina. Foi determinada a sequência codificante da subunidade HA1 da hemaglutinina viral para algumas das estirpes isoladas. O DNA molde a sequenciar foi obtido por nested RT-PCR, em tudo semelhante ao acima descrito para a detecção de RNA viral excepto nos primers utilizados e no facto de este não ser em multiplex (as sequências dos primers estão disponíveis mediante solicitação aos autores). Os produtos de amplificação foram purificados em gel de agarose a 1,0% e recuperados com o kit QIAEX II de extracção de DNA da agarose (QIAGEN). Este produto de PCR purificado foi submetido a uma sequenciação cíclica utilizando o kit *BigDye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems)* e segundo instruções do fabricante. Foram utilizados um conjunto de primers de sequenciação cujos produtos de extensão se sobrepõem e cobrem todo o segmento nucleotídico codificante da sub-unidade HA1 da hemaglutinina (Quadro I). Os terminadores não incorporados foram removidos por precipitação com etanol/acetato de sódio e o *pellet* seco foi armazenado a -20°C até à separação electroforética no sequenciador ABI Prism 377 DNA Sequencer.

Análise filogenética. Para cada vírus isolado, as sequências nucleotídicas estendidas por cada um dos primers foram analisadas e alinhadas pelo programa *Sequence Navigator (Applied Biosystems)*. De cada sequência nucleotídica HA1 completa foi deduzida a sequência peptídica com a utilização do referido programa. Com o programa *MegAlign* do pacote *DNASTAR (Lasergene)* foi feito o alinhamento múltiplo das sequências HA1 de todas as estirpes pelo método Clustal e construídas as árvores filogenéticas. As sequências deste estudo foram alinhadas às sequências homólogas das respectivas estirpes vacinais, obtidas, à semelhança de outras estirpes de referência, no site da Internet *Influenza Sequence Database* (<http://www.flu.lanl.gov>).

RESULTADOS

Actividade gripal

Os dados da vigilância integrada clínica e virológica da gripe, relativos à época de Inverno de 2000/2001, mostram que o aumento mais acentuado da incidência da síndrome gripal foi registado entre as semanas 2 e 3 de 2001, atingindo o valor máximo de 74,5 casos/100000 habitantes na semana 5 (Figura 1). O período epidémico (semanas durante as quais a taxa de incidência se manteve acima da linha de base) foi curto, prolongando-se da semana 3/2001 à semana 5/2001, e de pequena intensidade.

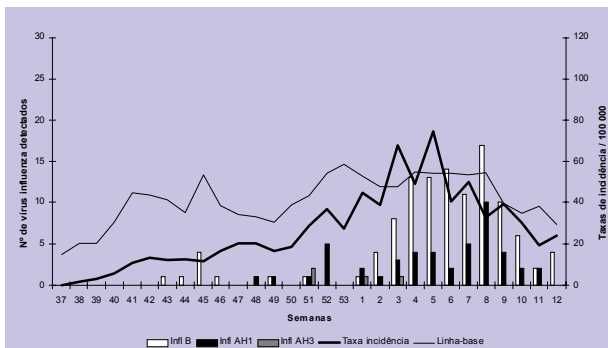


Fig. 1 - Vigilância clínica e virológica da gripe no Inverno de 2000/2001. A taxa de incidência semanal, da síndrome gripal, por 100 000 habitantes é representada conjuntamente com a linha de base de incidência da doença e o nº de vírus influenza detectados por semana.

Dos casos de síndrome gripal notificados durante o Inverno, foram colhidos e analisados 329 exsudados da nasofaringe, dos quais 68 (20,7%) casos provieram da região Norte, 138 (41,9%) da região Centro, 105 (31,9%) da região Sul e 18 (5,5%) casos das Regiões Autónomas (14 dos Açores e quatro da Madeira).

Dos casos analisados 112 (34%) foram positivos para vírus *influenza B*, 49 (14,8%) para vírus *influenza A* (H1) e quatro (1,2%) para vírus *influenza A* (H3) (Figura 2 e Quadro I).

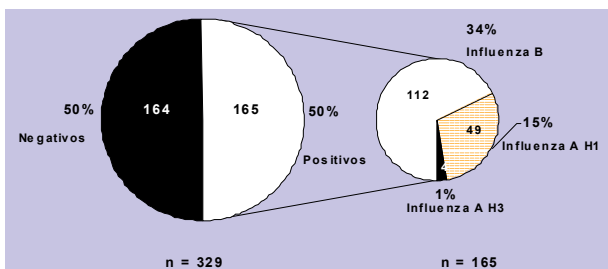


Fig. 2 - Proporção de casos positivos e negativos e tipos e sub-tipos de vírus influenza detectados no estudo.

Quadro I - Distribuição dos casos analisados por género.

Casos	Sexo Masculino	Sexo Feminino	Não refere
Influenza B	40	65	7
Influenza A (H1)	22	22	5
Influenza A (H3)	1	3	0
Negativos	65	93	6
Total	128	183	18

O predomínio de vírus *influenza* do tipo B ao longo do Inverno e o pequeno número de casos positivos associados ao vírus *influenza A* (H1 e H3) justificam o facto de se observar, em cada um dos grupos etários

considerados neste estudo, um maior número de vírus do tipo B (Figura 3). Contudo, ao analisar a percentagem de casos positivos por grupo etário, verificou-se um predomínio de vírus *influenza* do tipo B nas crianças dos 6 aos 15, o que está de acordo com o descrito em estudos anteriores¹¹.

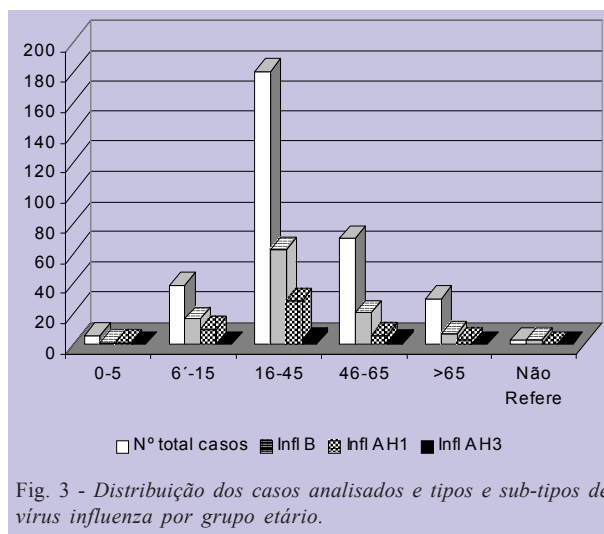


Fig. 3 - Distribuição dos casos analisados e tipos e sub-tipos de vírus influenza por grupo etário.

Análise antigénica e filogenética

As 165 estirpes de vírus *influenza* isoladas foram caracterizadas antigénicamente através da Reacção de Inibição de Hemaglutinação e os resultados analisados por comparação com estirpes de referência. Destas estirpes virais foram seleccionadas 17 estirpes de vírus *influenza*, 11 do tipo B e seis do tipo A (H1) (correspondendo a isolamentos efectuados no início, meio e fim do período epidémico) para se proceder à análise genética das mutações observadas na sub-unidade HA1 da hemaglutinina.

Caracterização antigénica

As estirpes de vírus *influenza* do tipo B isoladas apresentaram uma maior semelhança antigénica com as estirpes de referência B/Yamanashi/166/98, B/Johannesburg/5/99 e B/Sichuan/379/99 (estirpe vacinal de 2001-2002) (Quadro II), que se reflectiu nos títulos elevados com que reagiram contra os antisoros de referência (>320 UH). Reagiram, ainda, com títulos moderados (80 UH) com a estirpe vacinal de 2000/2001, B/Beijing/184/99.

Igualmente, a maioria das estirpes de vírus *influenza* do tipo A(H1) caracterizadas foram idênticas à estirpe vacinal de 2000/2001 e 2001/2002, A/New Caledonia/20/99, e à estirpe de referência A/Madagascar/57794/2000 (Quadro III).

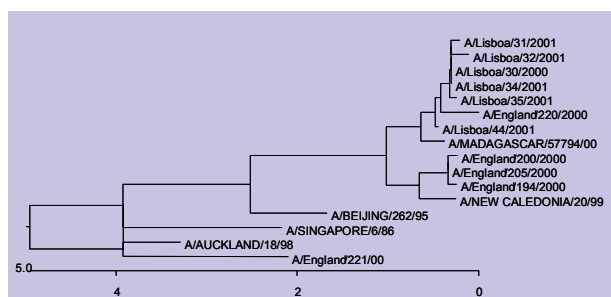


Fig. 5 - Árvore filogenética das sequências de aminoácidos do segmento HA1 da hemaglutinina dos vírus influenza do tipo A(H1).

DISCUSSÃO

A análise dos dados recolhidos através do Programa Nacional de Vigilância da Gripe mostraram que, durante a época de Inverno de 2000/2001, a actividade gripal foi baixa, sendo o período epidémico curto e de pequena intensidade e duração. Como ficou expresso nos resultados, as taxas de incidência semanais da síndrome gripal subiram acima da linha de base apenas durante três semanas e não ultrapassaram os 74 casos por 100 000 habitantes. Durante aquele Inverno os vírus *influenza* do tipo B foram predominantes, verificando-se a presença simultânea de vírus *influenza* do tipo A H1 e AH3.

Da totalidade dos casos de síndrome gripal enviados para diagnóstico virológico observou-se 50% de casos positivos para vírus *influenza*, valor acima do registado na maior parte dos sistemas de vigilância existentes noutros países europeus, onde essa percentagem se situou entre os 20 e os 45%^{12,13}.

A análise da percentagem de casos positivos por grupo etário mostrou um predomínio de vírus *influenza* B nas crianças dos 6 aos 15 anos, o que está de acordo com as características epidemiológicas descritas para este tipo de vírus e suportando a aceção de que as crianças apresentam uma carga viral mais elevada que os adultos^{11,14}.

A caracterização antigénica e genética das estirpes de vírus *influenza* isoladas durante o período em estudo permitiu confirmar a semelhança entre estas estirpes virais e as estirpes que integraram a vacina antigripal e detectar a extensão dos *drifts* antigénicos. Desta forma, enquanto a análise antigénica das estirpes de vírus *influenza* do tipo B, mostrou que a maioria destas estirpes eram idênticas à estirpe vacinal de 2000/2001, a caracterização genética (baseada no número e localização das mutações observadas na subunidade HA1 da hemaglutinina) confirmou essa semelhança mas revelou a presença de uma evolução dirigida para a estirpe B/Sichuan/379/99 que viria a integrar a estirpe vacinal de 2001/2002. Observação funda-

mentada na presença de, apenas, 2 mutações em aminoácidos entre as estirpes isoladas no estudo e B/Sichuan/379/99.

Da análise da filogenia das estirpes de vírus *influenza* B é, também, de assinalar a sua distribuição por dois grupos situados em dois ramos próximos, mas distintos, na árvore filogenética. Este resultado aponta para uma co-circulação de linhagens, característica descrita para os vírus *influenza* do tipo B¹⁵. No nosso estudo, este agrupamento das estirpes está relacionado com a proximidade geográfica dos casos a partir dos quais se isolou as estirpes virais.

Quanto aos vírus *influenza* do tipo AH1 isolados durante o Inverno, a análise antigénica e genética confirmou a sua semelhança com a estirpe vacinal A/Nova Caledónia/20/99 e com a estirpe de referência A/Madagáscar/57794/2000. As mutações detectadas ocorreram fora dos locais antigénicos da hemaglutinina, com excepção da substituição ocorrida no resíduo 120 (E-G) que corresponde ao local antigénico A.

Tanto nos vírus *influenza* do tipo A como B não se verificaram mutações relacionadas com a perda ou ganho de aminoácidos glicosilados.

Como resultado do estudo apresentado salienta-se a importância da vigilância epidemiológica da gripe como um processo continuado cujo sistema preconiza uma análise e avaliação periódica dos resultados. Espera-se, desta forma, contribuir para o conhecimento da evolução da doença e do agente etiológico, no nosso país, e contribuir para aferir a importância das diferentes estirpes de vírus *influenza* no desenvolvimento das epidemias anuais e para a decisão sobre a composição da vacina antigripal.

AGRADECIMENTOS

A todos os médicos que integram a Rede Médicos Sentinela, a todos os profissionais de saúde dos Serviços de Urgência Hospitalar e Serviços de Atendimento Permanente dos Centros de Saúde participantes no Programa Nacional de Vigilância da Gripe, ao Observatório Nacional de Saúde, e todos os colegas da Unidade de Vírus Respiratórios e Enterovírus do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

BIBLIOGRAFIA

1. WILEY D, WILSON I, SKEHEL J: Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 1981;289: 373-378
2. ROHM C, ZHOU N, SUSS J, MACKENZIE J, WEBSTER RG: Characterization of a novel influenza haemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology*

- 1996;217:508-516
3. STEINHAEUER DA: Role of the haemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 1999;258:1-20
 4. COX NJ, SUBARRAO K: Influenza. *Lancet* 1999;354:1277-1282
 5. ELLIS JS, CHAKRAVERTY P, CLEWLEY JP: Genetic and antigenic variation in the haemagglutinin of recently circulating human A (H3N2) viruses in the United Kingdom. *Arch Virol* 1995;140:1889-1904
 6. FITCH WM, BUSH RM, BENDER CA, COX NJ: Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7712-7718
 7. MEYER WJ, WOOD JM, MAJOR D, ROBERTSON JS, WEBSTER RG, KATZ JM: Influence of host cell-mediated variation on the international surveillance of influenza A (H3N2) viruses. *Virology* 1993;196:130-137
 8. GRIST NR, ROSS CA, BELL EJ: Diagnostic methods in clinical virology. 1st ed. Oxford: Blackwell Scientific Publishers 1966
 9. ELLIS JS, FLEMING DM, ZAMBON MC: Multiple reverse transcription PCR for surveillance of influenza A and B virus in England & Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol* 1997;35:2076-82
 10. BOOM R, SOL CJA, SALIMANS MMM, JANSEN CL, WERTHEIM VAN DILLEN PME, NOORDAR J: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28:495-503
 11. CLASS E, JONG J, BARTELDIS A: Influenza types and patient population. *Lancet* 1995;346:180
 12. ZAMBON M: Sentinel surveillance of influenza in Europe 1997/1998. *Eurosurveillance* 1998;3:29-31
 13. ZAMBON M, VAN DER WOLF S, REBELO-DE-ANDRADE H: Sentinel Surveillance in Europe 1996-1998. *Progress in Clinical Virology IV. European Society for Clinical Virology* 1998
 14. REBELO-DE-ANDRADE H: Aspectos epidemiológicos e virológicos da gripe em Portugal. Desenvolvimento de um sistema de vigilância. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor 2001
 15. COX N, BENDER C: The molecular epidemiology of influenza virus. *Virology* 1995;6:359-370

