

## **Análise antigénica e genética dos vírus da gripe: inverno 2015/2016**

### *Antigenic and genetic analysis of influenza virus: 2015/2016 winter*

Pedro Pechirra, Inês Costa, Patrícia Conde, Paula Cristóvão, Raquel Guiomar

raquel.guiomar@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

#### **Resumo**

A análise antigénica e genética dos vírus da gripe é um dos principais objetivos da vigilância da gripe. Na época de 2015/2016, foram caracterizadas antigénica e geneticamente, 210 e 139 estirpes virais, respetivamente, a partir de amostras biológicas recebidas através do Programa Nacional de Vigilância da Gripe e da Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe. Os vírus do subtipo A(H1)pdm09, predominantes em circulação nesta época foram antigénicamente semelhantes à estirpe incluída na vacina antigripal 2015/2016. A sua caracterização genética revelou que a maioria pertence ao novo subgrupo genético 6B.1 com 4 importantes alterações na sequência peptídica da hemaglutinina em relação à estirpe vacinal. Os vírus B/Victoria, detetados no fim da epidemia de gripe, apesar de pertencerem ao grupo 1A apresentam já alguma divergência antigénica e genética em relação à estirpe B/Brisbane/60/2008 que será incluída na vacina antigripal para 2016/2017. Os vírus do subtipo A(H3), detetados em numero reduzido ao longo da época distribuíram-se pelos grupos genéticos 3C.2a e 3C.3a, com 7 e 2 substituições de aminoácidos importantes em relação à estirpe vacinal 2015/2016, respetivamente. Os vírus A(H3) caracterizados foram semelhantes antigénicamente à futura estirpe vacinal 2016/2017.

#### **Abstract**

*Antigenic and genetic analysis of influenza viruses is one of the main objectives of influenza surveillance. During 2015/2016 season were antigenically and genetically characterized 210 and 139 viral strains, respectively, from biological products received in the scope of the National Program for Influenza Surveillance and from the Portuguese Laboratories Network for the Diagnosis of Influenza. Viruses from A(H1)pdm09 subtype, predominant in circulation this season, were antigenically similar to the strain included in the 2015/2016 influenza vaccine. Their genetic characterization revealed that most of them belong to the new genetic subgroup 6B.1 with 4 important changes in hemagglutinin peptide sequence when comparing to the vaccine strain. B/Victoria viruses, detected at the end of influenza epidemics, despite belonging to the group 1A, present some antigenic and genetic diversity in relation to B/Brisbane/60/2008 which will be included in the 2016/2017 influenza vaccine. Subtype A(H3) viruses, detected in reduced numbers throughout the season, have clustered in 3C.2a and 3C.3a genetic groups, with 7 and 2 important amino acid substitutions in relation to the vaccine strain 2015/2016. Characterised A(H3) viruses were antigenically similar to the future 2016/2017 vaccine strain.*

#### **Introdução e objetivo**

A vigilância laboratorial da gripe em Portugal tem como objetivo principal, não só a deteção dos vírus da gripe em circulação, mas também a sua caracterização antigénica e genética. Utilizando os métodos virológicos convencionais e a biologia molecular, o Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios (LNRVG) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge analisa os vírus da gripe detetados em ambas as vertentes: antigénica e genética. Esta monitorização é essencial para que o LNRVG possa responder à sua função de Laboratório Nacional de Referência, atribuída pela Organização Mundial de Saúde, e assumir a sua responsabilidade como laboratório coordenador da Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe (RPLDG). O presente estudo descreve as características antigénicas e genéticas dos vírus da gripe identificados em Portugal no inverno de 2015/2016.

#### **Material e métodos**

Durante a época de vigilância da gripe de 2015/2016, o LNRVG pesquisou a presença do vírus da gripe em 1107 exsudados nasofaríngeos, com origem nas redes que suportam a vigilância laboratorial da gripe: Rede Médicos-Sentinela, Rede de Serviços de Urgência, Rede de Serviços de Obstetrícia e Projecto EuroEVA (Efetividade da vacina antrigripal na Europa). O diagnóstico laboratorial foi efetuado por RT-PCR multiplex em tempo real, permitindo a deteção e identificação dos tipos e subtipos do vírus da gripe [A(H1)pdm09, A(H3), B/Yamagata e B/Victoria]. Os laboratórios da RPLDG efetuaram a pesquisa do vírus da gripe igualmente por metodologias de biologia molecular. Para a caracterização antigénica procedeu-se ao isolamento viral em linha celular MDCK-Siat1 e à inibição da

hemaglutinação por antissoros monoclonais para as estirpes vacinais e de referência. A caracterização genética foi baseada na sequenciação pelo método de Sanger da região codificante da subunidade HA1 da hemaglutinina. A análise filogenética foi efetuada utilizando o programa MEGA6 (1).

## Resultados

A presença do vírus da gripe foi detetado em 41% (449/1107) destes casos de síndrome gripal. A Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe (RPLDG) efetuou a pesquisa laboratorial do vírus da gripe em 7443 amostras respiratórias, tendo detetado em 1458 (1458/7443; 20%) amostras o vírus da gripe (2).

Os vírus da gripe caracterizados na época 2015/2016 refletem a circulação dos tipos e subtipos dos vírus da gripe detetados no início, período epidémico e final da época gripal. Uma seleção de 146 amostras respiratórias de casos de infeção respiratória grave e positivas para o vírus da gripe provenientes da RPLDG foi recebida no LNRVG para caracterização antigénica e genética dos vírus da gripe.

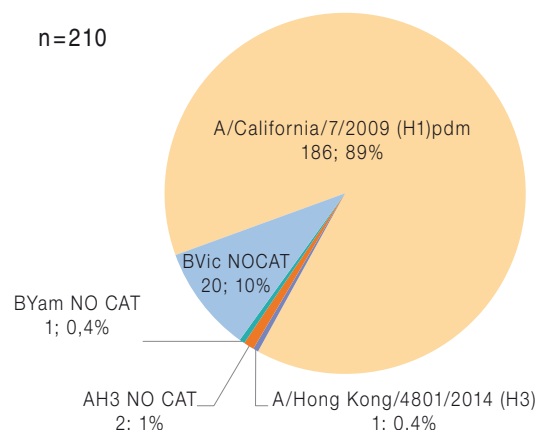
O vírus A(H1)pdm09 constituiu a maioria (90,4%) dos vírus da gripe detetados, tendo cocirculado na fase final da epidemia de gripe com o vírus do tipo B (linhagem Victoria). Os vírus A(H3) e B (linhagem Yamagata) foram detetados ao longo da época em número reduzido.

### Caraterização antigénica

Ao longo da época de gripe 2015/2016, foram isolados e caracterizados antigenicamente 210 estirpes virais. A maioria (186/210; 89%) das estirpes virais foram do subtipo A(H1)pdm09 e semelhantes antigenicamente à estirpe vacinal de 2015/2016, A/California/7/2009 (Figura 1). Os vírus do tipo B (linhagem Victoria), detetados essencialmente no final da época de gripe, foram distintos da estirpe vacinal de 2015/2016, B/Phuket/3073/2013 (da linhagem Yamagata). Os vírus B/Victoria caracterizados (20/210; 10%) apresentaram também alguma divergência antigénica quando comparados com a futura estirpe vacinal 2016/2017 para o hemisfério norte, B/Brisbane/60/2008 (gráfico 1). Foram ainda caracterizadas antigenicamente 3 estirpes virais do subtipo A(H3) e uma do vírus B da linhagem Yamagata, todas distintas antigenicamente das estirpes incluídas na vacina antigripal

2015/2016 (gráfico 1). Das 3 estirpes virais A(H3), uma foi semelhante à futura estirpe vacinal 2016/2017, A/Hong Kong/4801/2014, enquanto que para os outros 2 vírus A(H3) não foi encontrada qualquer semelhança com as estirpes vacinais e de referência estudadas.

Gráfico 1: Caraterização antigénica dos vírus da gripe, inverno 2015/2016.



AH3 NO CAT - Vírus da gripe A(H3) diferentes antigenicamente de A/Hong Kong/4801/2014 e de A/Switzerland/9715293/2013. BYam NO CAT - Vírus da gripe B (linhagem Yamagata) diferentes antigenicamente de B/Phuket/3073/2013. B/Vic NO CAT - Vírus da gripe B (linhagem Victoria) diferentes antigenicamente de B/Brisbane/60/2008.

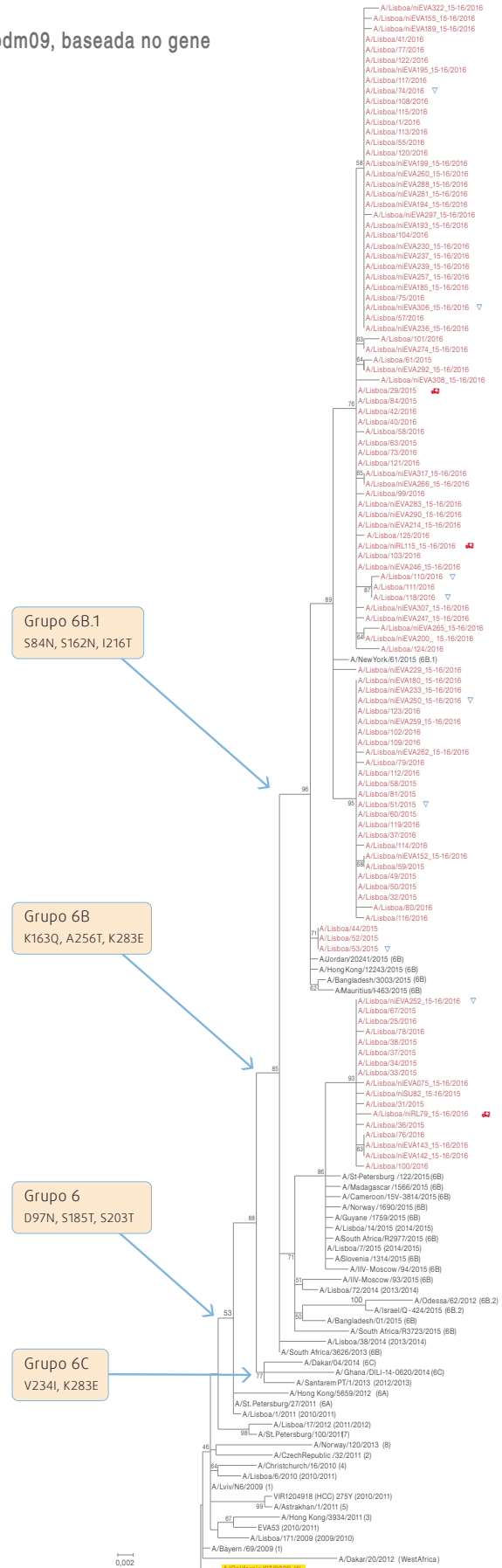
### Caraterização genética

Durante a epidemia de gripe de 2015/2016, entre as semanas 47/2015 (novembro 2015) e 14/2016 (abril 2016) foram caracterizados geneticamente 139 vírus da gripe: 108 do subtipo H1pdm09, 17 B/Victoria, 10 A(H3) e 4 B/Yamagata.

Todos os vírus A(H1) pandémicos caracterizados geneticamente (figura 1) pertencem ao grupo genético 6B (representados pela estirpe de referência A/South Africa/3626/2013), sendo que a maioria (88/108; 81,4%) agrupou no novo subgrupo genético 6B.1 (representado pela estirpe A/New York/61/2015). Os vírus do novo subgrupo 6B.1 começaram a ser detetados a partir da semana 51/2015 (dezembro 2015) e no gene da hemaglutinina (subunidade HA1) foram observadas 11 substituições de aminoácidos quando comparado com a estirpe A/California/7/2009 (estirpe vacinal), sendo que 4 dos aminoácidos se encontram em locais antigénicos da glicoproteína viral (S162N, K163Q, S185T, S203T).

Figura 1: ↓ Árvore filogenética dos vírus da gripe A(H1)pdm09, baseada no gene da hemaglutinina (subunidade HA1).

Árvore filogenética obtida pelo método da Máxima Verossimilhança segundo o modelo Hasegawa-Kishino-Yano de distâncias evolutivas com 500 réplicas de bootstrap. Os vírus caracterizados estão representados a vermelho. As estirpes de referência estão representadas a preto. A estirpe vacinal 2015/2016 está sublinhada a amarelo. São mostrados os valores de bootstrap superiores a 50. ▽ - casos considerados imunizados; 🏠 - casos graves ou internados. Algumas estirpes de referência têm indicado o seu grupo filogenético entre parêntesis (baseado na filogenia do gene da hemaglutinina).



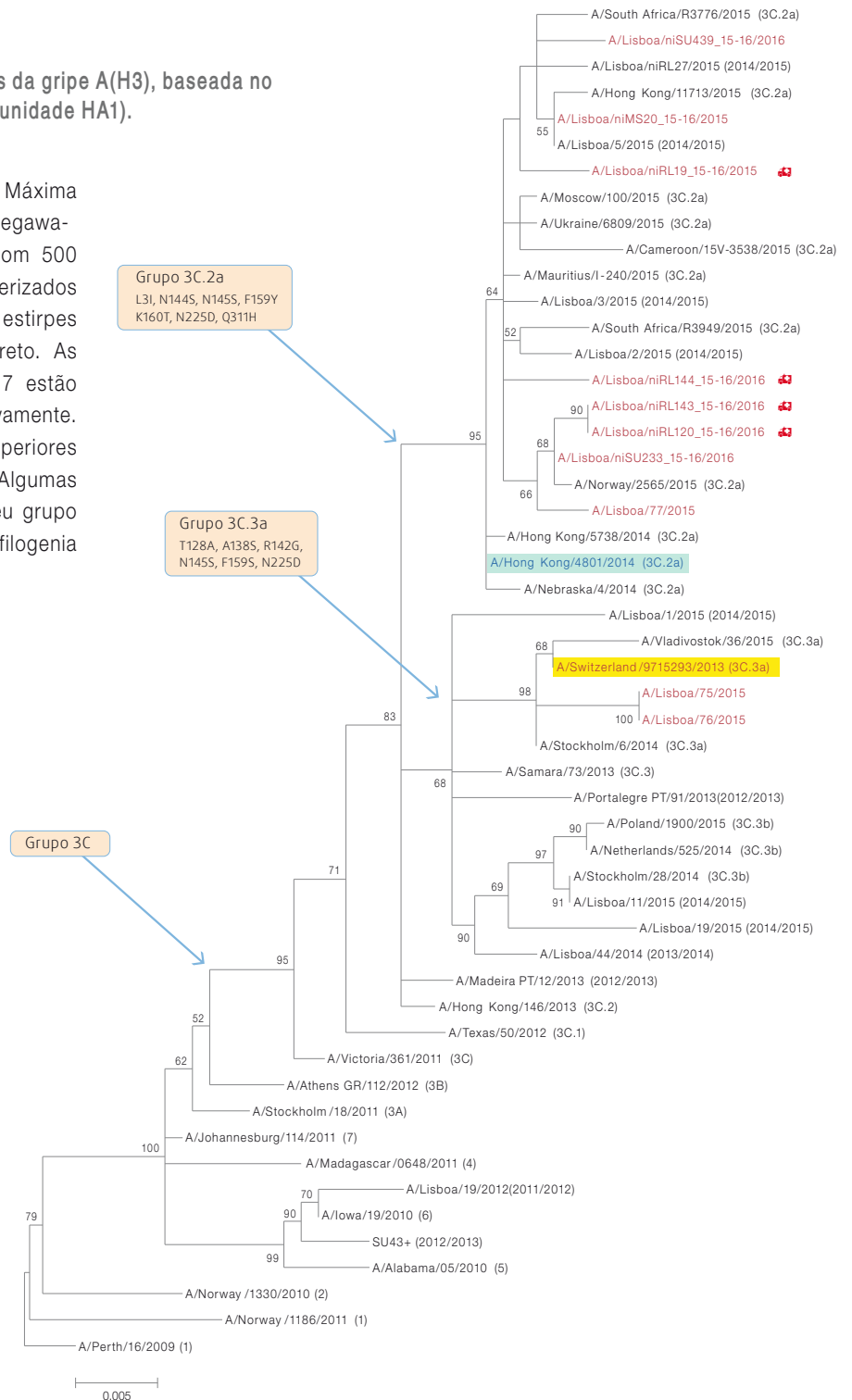


As 10 estipes virais do subtipo A(H3) agruparam-se em 2 diferentes grupos genéticos (figura 3): no grupo 3C.3a (representado pela estirpe vacinal 2015/2016, A/Switzerland/9715293/2013) e no grupo 3C.2a (representado pela estirpe vacinal 2016/2017, A/Hong Kong/4801/2014). Os vírus do grupo 3C.3a revelaram 3 substituições de aminoácidos relativamente a

A/Switzerland/9715293/2013, das quais 2 em locais antigénicos (E50K e Y94E). Por sua vez, os vírus 3C.2a revelaram 10 substituições de aminoácidos em relação à estirpe vacinal 2015/2016, das quais 7 em locais antigénicos (A128T, S138A, G142K/R, S159Y, K160T, Q197R/K, Q311H).

Figura 3: 📌 Árvore filogenética dos vírus da gripe A(H3), baseada no gene da hemaglutinina (subunidade HA1).

Árvore filogenética obtida pelo método da Máxima Verosimilhança segundo o modelo Hasegawa-Kishino-Yano de distâncias evolutivas com 500 réplicas de bootstrap. Os vírus caracterizados estão representados a vermelho. As estirpes de referência estão representadas a preto. As estirpes vacinais 2015/2016 e 2016/2017 estão sublinhadas a amarelo e a verde, respetivamente. São mostrados os valores de bootstrap superiores a 50. 🏠 - casos graves ou internados. Algumas estirpes de referência têm indicado o seu grupo filogenético entre parêntesis (baseado na filogenia do gene da hemaglutinina).



Por último, as 4 estirpes do vírus B/Yamagata caracterizadas geneticamente pertenciam ao grupo genético 3 (representado pela estirpe vacinal 2015/2016, B/Phuket/3073/2013) e todas apresentaram a substituição L172Q, sendo que a estirpe B/Lisboa/151/2015 apresentou 2 substituições adicionais (M71T e G238R, esta última em local antigénico).

### **Discussão e conclusão**

No inverno 2015/2016, o vírus da gripe predominante (406/449; 90,4%) em circulação foi o A(H1)pdm09, que se mostrou semelhante à estirpe vacinal A/California/7/20093. A maioria dos vírus pandémicos (88/108; 81,5%) agrupou no novo subgrupo genético 6B.1. Este novo subgrupo foi também o mais frequentemente detetado na maioria dos países europeus, quando comparado com os vírus do grupo 6B.2, também emergente na época 2015/2016 na Europa e hemisfério norte (2,4).

Os vírus do tipo B foram na sua maioria da linhagem Victoria, antigenicamente distinta da estirpe vacinal B/Phuket/3073/2013, situação observável também na Europa e América do norte (4-6). Acrescente-se que, estes vírus apresentam já alguma divergência antigénica relativa à estirpe vacinal para 2016/2017 – B/Brisbane/60/2008 (7).

Por sua vez, os vírus A(H3) em estudo foram antigenicamente distintos da estirpe vacinal 2015/20163 – A/Switzerland/9715293/2013 mas semelhantes à estirpe vacinal para 2016/2017 – A/Hong Kong/4801/2014 (7). Este subtipo viral foi detetado com baixa frequência na Europa (à exceção da Eslovénia onde foi o predominante) (8,9). Não foram observadas diferenças nas sequências nucleotídica da região HA1 entre os casos provenientes de cuidados de saúde primários e casos mais graves da doença, resultantes dos internamentos hospitalares. Situação semelhante observou-se nos casos de gripe entre a população vacinada e não vacinada.

### **Agradecimentos:**

A todos os médicos da Rede Médicos-Sentinela, Projeto EuroEva/IMOVE, Rede de Serviços de Urgência e Obstetrícia, Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe que participaram no Programa Nacional de Vigilância da Gripe em 2015/2016; Aos Colegas do Departamento de Epidemiologia (Ana Paula Rodrigues, Ausenda Machado, Baltazar Nunes, Verónica Gomez, Inês Batista, Rita Roquette, Irina Kislaya); Aos Colegas do Laboratório de cultura de tecidos do Departamento Doenças Infecciosas (Carla Roque e Carlos Ribeiro); Aos Colegas da Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética (Daniel Ataíde Sampaio, Dina Carpinteiro, Joana Mendonça, Sílvia Duarte e Luís Vieira); À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-9. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840312/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840312/)
- (2) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge; Direção-Geral da Saúde (colab). Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2015/2016. Lisboa: INSA, 2016. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4044>
- (3) World Health Organization. Influenza: recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season, 25 February 2015 [Em linha]. (consult. 26/10/2016). [www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015\\_16\\_north/en/](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015_16_north/en/)
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza virus characterisation: summary Europe. Stockholm: ECDC, 2016. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/influenza-virus-characterisation-july-2016.pdf>
- (5) Centre for Disease Prevention and Control. Flu activity and surveillance [Em linha]. (consult. 26/10/2016). <http://cdc.gov/flu/weekly/fluactivitysurv.htm>
- (6) Government of Canada. Weekly reports 2015-2016 season [Em linha]. (consult. 26/10/2016). <http://healthycanadians.gc.ca/diseases-conditions-maladies-affections/disease-maladie/grippe-surveillance/reports-season-2015-2016-saison-rapports-eng.php>
- (7) World Health Organization. Influenza: recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season, 25 February 2016 [Em linha]. (consult. 26/10/2016). [www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016\\_17\\_north/en/](http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2016_17_north/en/)
- (8) FluNewsEurope: Joint ECDC/WHO Weekly influenza update (week 20/2016). [Em linha]. (consult. 26/10/2016). <https://flunewseurope.org/Archives>
- (9) European Centre for Disease Prevention and Control. Seasonal influenza 2015-2016 in the EU/EEA countries. Stockholm: ECDC, 2016. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/seasonal-influenza-risk-assessment-2015-2016.pdf>