

Sequenciação de nova geração e efectividade da vacina antigripal: um estudo sobre o vírus da gripe A(H3), em doentes com síndrome gripal, épocas 2016/2017 e 2017/2018

New generation sequencing and effectiveness of the influenza vaccine: a study on influenza A (H3) virus in patients with influenza, 2016/2017 and 2017/2018

Pedro Pechirra¹, Vítor Borges², Paula Cristóvão¹, Inês Costa¹, Patrícia Conde¹, Ausenda Machado³, Ana Paula Rodrigues³, Verónica Gomez³, Irina Kislaya³, Joana Mendonça⁴, Baltazar Nunes³, João Paulo Gomes², Raquel Guiomar¹

pedro.pechirra@insa.min-saude.pt

(1) 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.

(2) Núcleo de Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(4) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

_Resumo

A tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) permite uma análise genética do vírus da gripe muito mais profunda, quando comparada com a sequenciação pelo método de Sanger, pois permite a análise do genoma viral completo (e não apenas do gene da hemaglutinina). O presente estudo teve como objectivo realizar a análise filogenética e mutacional do vírus da gripe A(H3) de forma a pesquisar possíveis marcadores genéticos e padrões de recombinação que estejam relacionados com a efectividade vacinal. Foram obtidas sequências do genoma completo para 179 vírus A(H3), detectados em casos de síndrome gripal no âmbito do projecto EuroEVA/I-MOVE+ durante duas épocas de gripe: 2016/2017 e 2017/2018. Dos vírus sequenciados, 28 pertenciam a vírus de casos vacinados (15,6%). Destes, apenas 16 apresentaram mutações não encontradas em casos não vacinados, no entanto, todas elas emergiram de forma esporádica. Foi revelada a existência de recombinação genómica intrasubtípica, e identificados 4 perfis distintos de recombinação. O grupo em que todos os segmentos genómicos são semelhantes a A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 foi o que registou uma maior percentagem de falhas da vacina (20,3%).

_Abstract

Next-generation sequencing technology allow a much deeper genetic analysis of influenza virus comparing to Sanger sequencing, since allows a whole genome analysis instead of a HA-based one. The present study aimed to perform phylogenetic and mutational analysis of influenza A(H3) viruses in order to search for putative genetic markers, as well as reassortment patterns related with vaccine effectiveness. Were obtained whole genome sequences for 179 influenza A(H3) viruses, detected in ILI cases in the scope of EuroEVA/I-MOVE+ project during 2 winter seasons: 2016/2017 and 2017/2018. From sequenced viruses, 28 were from vaccinated cases (15.6%). From these, 16 presented mutations, not found in viruses from non-vaccinated cases, however, these mutations have emerged sporadically. Were identified four different patterns of intrasubtype reassortment. The group with an A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016-like profile included a higher percentage of vaccine failures (20.3%).

_Introdução

As técnicas de sequenciação de nova geração (NGS, na sigla em inglês) são usadas ainda de uma forma incipiente na vigilância epidemiológica da gripe. Quebrando barreiras de ordem técnica e económica inerentes à sequenciação pelo método de Sanger, a NGS facilita a sequenciação do genoma viral completo. Além da caracterização genética, esta abordagem permite também a detecção de eventos de recombinação genómica, de marcadores de resistência, de virulência, variantes minoritárias, variabilidade intra-hospedeiro, entre outros.

Vários fatores (relacionados, por exemplo, com o vírus influenza e/ou com o hospedeiro, ou com a toma da vacina antigripal e a sua constituição) podem contribuir para baixas/moderadas estimativas da efectividade da vacina antigripal em épocas onde o vírus A(H3) é predominante (1). No que respeita às características do vírus da gripe, uma das questões que normalmente se coloca é se existe(m) e qual(quais) a(s) causa(s) genética(s) e/ou antigénica(s) que justifique(m) a falha da vacina antigripal.

_Objetivo

Este estudo tem como objetivo a análise do genoma completo do vírus da gripe de forma a pesquisar a associação entre características genéticas do vírus (mutações pontuais, padrões de recombinação) e as falhas da vacina antigripal, ou seja, indivíduos vacinados e que foram infetados pelo vírus da gripe A(H3).

Material e métodos

Exsudados da nasofaringe foram colhidos em casos de síndrome gripal aquando de consulta em cuidados de saúde primários no âmbito do projecto EuroEVA/I-MOVE+, durante duas épocas de gripe: 2016/2017 e 2017/2018. Além dos dados clínicos e epidemiológicos, foi recolhida a informação sobre a toma da vacina. Após extracção de RNA e amplificação do genoma viral por PCR (2), foi sequenciado por NGS o genoma completo de 179 vírus da gripe do subtipo A(H3): 163 da época 2016/2017 e 16 de 2017/2018. A sequenciação por NGS foi realizada na plataforma MiSeq (Illumina) e a análise bioinformática das leituras obtidas na plataforma online INSA-FLU (3) (<https://insaflu.insa.pt/>) com uma cobertura média de 1075x. As sequências *consensus* foram adicionalmente analisadas com o programa MEGA 7 (4). Para testar a associação entre os perfis de recombinação e a falha vacinal foi usado o teste exato de Fisher (o nível de significância foi estabelecido em 5%).

Resultados

Caracterização genética do vírus da gripe pré-NGS

Antes de o Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge ter implementado a NGS na vigilância laboratorial da gripe, a caracterização dos vírus da gripe era realizada essencialmente através da sequenciação da subunidade HA1 do

gene da hemaglutinina (este procedimento ainda hoje é utilizado quando é necessária uma caracterização genética urgente de poucas amostras virais).

Os vírus da gripe A(H3) estudados agruparam-se em 5 diferentes subgrupos genéticos, segundo classificação baseada no gene da hemaglutinina (5) (tabela 1 e figura 1).

A maioria (44,1%) pertenceu ao subgrupo genético 3C.2a1, que circulou em 2016/2017 e que é representado pela estirpe vacinal 2018/2019 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (6), e apresentou as substituições N171K, situada em local antígeno (Ia), I406V e G484E. A maior parte dos vírus 3C.2a1 apresentou também a substituição R142G (Ia). No subgrupo 3C.2a1 registaram-se 15,2% de casos de falha da vacina antigripal.

Dentro do subgrupo 3C.2a1 insere-se o subgrupo 3C.2a1b (representado por A/England/74560298/2017) que inclui 23,5% (42/179) dos vírus A(H3) analisados. Além das substituições atrás mencionadas para os vírus 3C.2a1, estes vírus incorporaram as substituições K92R, N121K e H311Q (todas em locais antigénicos). As falhas da vacina constituíram 19% (8/42) dos vírus neste subgrupo (tabela 1).

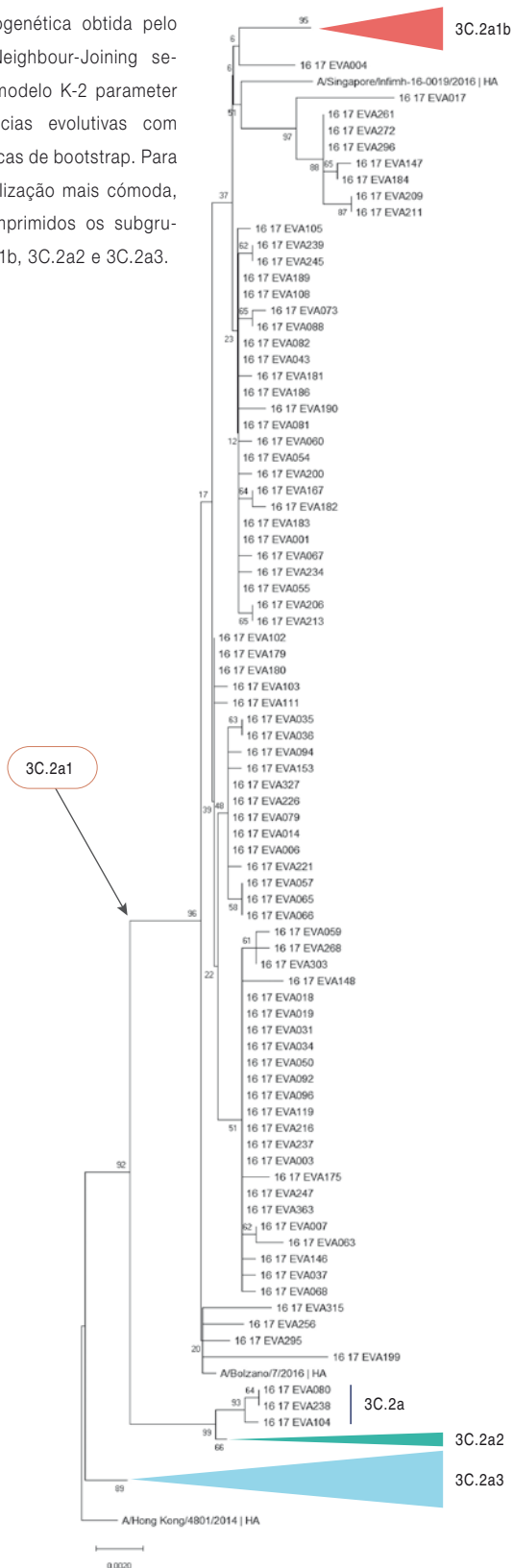
Um subgrupo que também atingiu uma grande expressão foi o 3C.2a3, ao qual pertenciam 25,7% (46/179) dos vírus A(H3). Os vírus deste subgrupo detetado em 2016/2017 e representado pela estirpe A/Norway/4849/2016, apresentaram as substituições N121K (Ia) e S144K (Ia). Neste subgrupo os

Tabela 1: Subgrupos genéticos do vírus A(H3) em 179 doentes com síndrome gripal, 2016/2017 e 2017/2018.

Subgrupos genéticos	2016/2017	2017/2018	Total 2 épocas	%	Vacinados	%
3C.2a	3	–	3	1,7	1	33,3
3C.2a1	79	–	79	44,1	12	15,2
3C.2a1b	34	8	42	23,5	8	19,0
3C.2a2	1	8	9	5,0	0	0,0
3C.2a3	46	–	46	25,7	7	15,2
Total A(H3)	163	16	179	100,0	28	15,6

Figura 1: Filogenia dos vírus da gripe A(H3) em estudo (n=179), baseada no gene da hemaglutinina.

Árvore filogenética obtida pelo método Neighbour-Joining segundo o modelo K-2 parameter de distâncias evolutivas com 1000 réplicas de bootstrap. Para uma visualização mais cómoda, foram comprimidos os subgrupos 3C.2a1b, 3C.2a2 e 3C.2a3.



casos vacinados totalizaram 15,2% (12/79). Foram ainda caracterizados 3 vírus (1,7%; 3/179) como pertencentes ao subgrupo 3C.2a, representado pela estirpe vacinal 2017/2018 A/Hong Kong/4801/2014 (7). Estes vírus apresentavam as substituições T131K (1a) e R142K (1a). Uma vez que um dos vírus era proveniente de um caso vacinado, a proporção de falhas da vacina neste subgrupo foi de 33,3% (1/3).

Além das 2 substituições anteriores, os vírus do subgrupo 3C.2a2 apresentaram adicionalmente a substituição R261Q (1a). No conjunto das 2 épocas, os vírus 3C.2a2 constituíram apenas 5% (9/179) dos vírus analisados, no entanto, estes foram os predominantes em circulação na época 2017/2018. Não foram registadas falhas da vacina no grupo dos vírus 3C.2a2 sequenciados.

Na totalidade dos vírus A(H3) sequenciados, 15,6% (28/179) correspondiam a casos vacinados. Ao analisar a hemaglutinina destes vírus verificámos a existência de 8 substituições em 7 vírus que não foram encontradas em vírus dos casos não vacinados: G5R, S46F, S124I, N126D, F193S, I230L, D408N e L531S. No entanto qualquer uma destas substituições foi esporádica, ou seja, foram observadas apenas num vírus.

Caracterização genética do vírus da gripe pós-NGS

A implementação da NGS na vigilância da gripe veio alargar e aprofundar a caracterização genética do vírus da gripe pois permite a sequenciação do genoma viral completo, para um maior número de vírus e de uma forma mais rápida e económica.

Os genomas completos dos 179 vírus A(H3) em análise foram monitorizados quanto à existência de possíveis marcadores moleculares associados aos casos de falha vacinal. A tabela 2 mostra-nos as substituições encontradas em todos os segmentos genómicos de vírus detetados em casos vacinados. Podemos verificar que as substituições não são comuns aos vírus estudados. Além disso, no nosso estudo, 12 dos vírus detetados em casos vacinados foram geneticamente idênticos, à escala do genoma, a outros vírus detetados em casos não vacinados.

Tabela 2: ▾ Substituições de aminoácidos em relação à estirpe vacinal 2017/2018 (A/Hong Kong/4801/2014), presentes em vírus detetados nos 28 casos vacinados.

Casos vacinados	Época de gripe	PB2	PB1	PB1-F2	N40	PA	PA-X	HA	NP	NA	M1	M2	NS1	NS2	Total substituições / vírus
EVA079	2016/2017	R251G								V116A					2
EVA080								G5R		V240I					2
EVA088															0
EVA089								L531S							1
EVA091													P212H	L55I	2
EVA094						L469M		S124I					T49A		3
EVA102															0
EVA107								I230L		I307L					2
EVA119													Q63K		1
EVA124															0
EVA126															0
EVA133															0
EVA157															0
EVA162								F193S	M163L						2
EVA163															0
EVA164										V165I					1
EVA169						N350K		S46F, N126D		E344K	V15I				5
EVA182						N359T			K452R						2
EVA186											N236K				1
EVA200															0
EVA209															0
EVA221						I407M				S332P					2
EVA239		V731M													1
EVA250															0
EVA263															0
EVA268							V192G			I20T					2
EVA311								D408N			V138I				2
EVA089	2017/2018														0
Total substituições / segmento		2	0	0	0	4	1	8	2	7	3	0	3	1	31

A plataforma INSaFLU permite aferir da maior semelhança genética entre segmentos genómicos dos vírus analisados e de estirpes de referência de diferentes subgrupos disponíveis. Comparando cada segmento viral com o genoma de estirpes representativas de dois grandes subgrupos genéticos (o subgrupo 3C.2a, representado pela estirpe vacinal 2017/2018

A/Hong Kong/4801/2014, e o subgrupo 3C.2a1, representado pela estirpe vacinal 2018/2019 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016), foi possível revelar quatro diferentes perfis de recombinação intrasubtípica existente nos vírus A(H3) em estudo (tabela 3).

Tabela 3: ▾ Perfis de recombinação intrasubtípica encontrados nos vírus A(H3) em 2016/2017 e 2017/2018.

Perfis de recombinação									n	%	Vacinados	%
PB2	PB1	PA	PA	HA	NP	NA	M	NS	69	38,5	14	20,3
PB2	PB1	PA	PA	HA	NP	NA	M	NS	8	4,5	0	0,0
PB2	PB1	PA	PA	HA	NP	NA	M	NS	52	29,1	6	11,5
PB2	PB1	PA	PA	HA	NP	NA	M	NS	50	27,9	8	16,0
Total									179	100,0	28	15,6

3C.2a (A/Hong Kong/4801/2014)

3C.2a1 (A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016)

O perfil de recombinação mais frequente (69/179; 38,5%) foi aquele em que todos os segmentos genómicos mostraram ser mais próximos geneticamente do subgrupo 3C.2a1. Este foi também o perfil que incluiu mais casos de falhas da vacina (14/69; 20,3%).

O segundo perfil, onde a proteína da matriz é “3C.2a-like” e os restantes genes são “3C.2a1-like” atinge a representatividade de 29,1% (52/179). Neste grupo, 11,5% (6/52) dos vírus foi detetado em casos vacinados.

Um terceiro perfil constituiu 27,9% (50/179) dos vírus A(H3) analisados. Os vírus deste grupo contêm uma hemaglutinina e uma proteína da matriz 3C.2a-like com os restantes genes revelando ser “3C.2a1-like”. Os vírus provenientes de casos vacinados constituíram 16% (8/50) dos vírus com este perfil de recombinação.

Um quarto perfil, com uma hemaglutinina “3C.2a-like” e restantes genes “3C.2a1-like”, representou apenas 4,5% (8/179) dos vírus analisados. Nenhum dos vírus com este perfil foi detetado em casos vacinados.

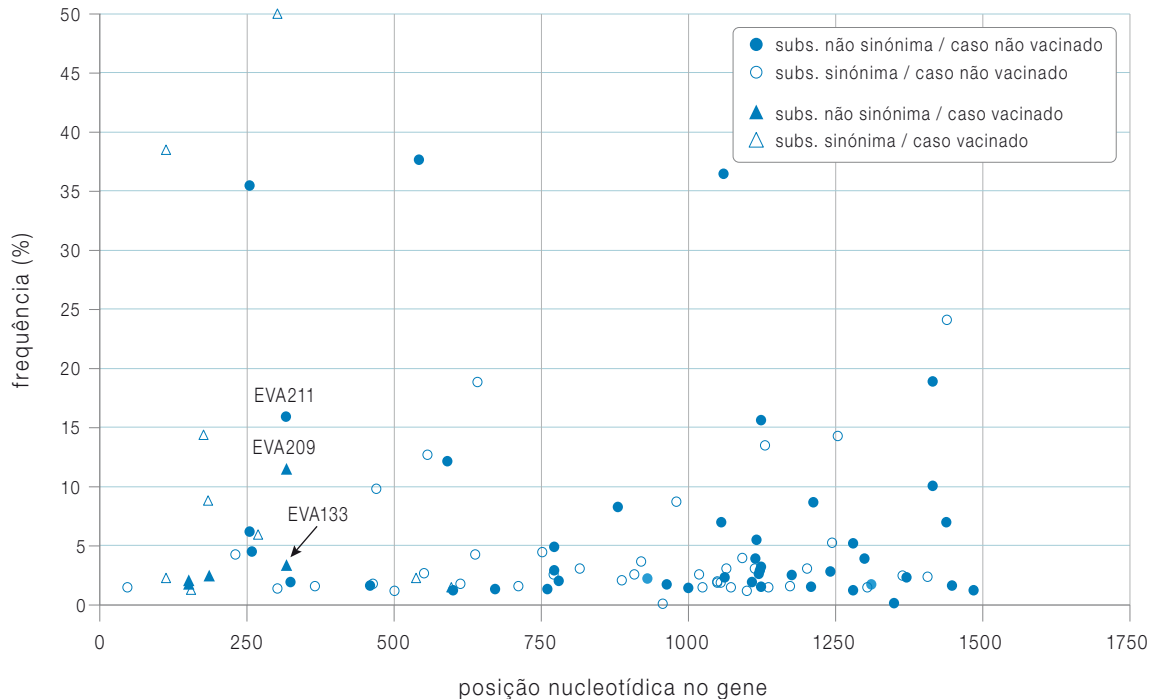
Apesar das diferenças observadas quanto à proporção de casos de falha da vacina, não se verificou associação estatisticamente significativa entre as falhas da vacina e determinado perfil de recombinação ($p=0,424$).

A análise de variantes minoritárias intra-hospedeiro (iSNVs - *intra-host single nucleotide variants*) é outra mais-valia para a vigilância laboratorial da gripe, possibilitada pela NGS.

Nos vírus A(H3) detetados nos 28 casos vacinados, das iSNVs identificadas, apenas uma era redundante: a variante G315T (M105I) do gene da nucleoproteína nos casos EVA133 (2016/17) e EVA209 (2016/17), com frequências de 3,21% e 11,33%, respectivamente. No entanto, esta mesma iSNV foi encontrada num caso não vacinado: EVA211 (2016/17) com uma frequência de 15,74% (figura 2). De referir que estes 3 casos, apesar de a data de início da doença se ter registado num intervalo de 2 semanas, não tinham proximidade geográfica, e também pertenciam a diferentes subgrupos genéticos.

Todas as outras iSNVs identificadas em casos vacinados surgiram apenas isoladamente num único vírus.

Figura 2: ↓ Frequência e distribuição das variantes minoritárias intra-hospedeiro ($\leq 50\%$) ao longo do gene da nucleoproteína para todos os vírus da gripe A(H3) em estudo (n=179).



Discussão e conclusões

Os 179 vírus A(H3) analisados neste estudo agruparam-se em 5 subgrupos genéticos: 3C.2a, 3C.2a1, 3C.2a1b, 3C.2a2 e 3C.2a3, sendo o subgrupo 3C.2a1 o mais representado durante as 2 épocas de gripe. Os vírus detectados em falhas da vacina constituíram 15,6% dos casos.

O conhecimento do genoma viral completo permite também analisar uma importante característica dos vírus da gripe – a recombinação entre segmentos genómicos que pode ocorrer quando uma célula é infectada por dois ou mais vírus da gripe. Foram identificados 4 perfis de recombinação intra-subtípica, cada um deles com uma proporção diversa de casos vacinados. No entanto, as diferenças encontradas entre os diferentes perfis não têm significância estatística.

Habitualmente, a população viral inerente a uma infecção pelo vírus da gripe é representada por uma sequência *consensus* que representa o nucleótido mais frequente para cada posição do genoma. Mas o que ocorre na realidade é que cada infe-

ção gera uma população geneticamente diversa de variantes virais, quer através de novas mutações pontuais, quer através da transmissão destas variantes minoritárias de hospedeiro para hospedeiro (8). A análise das iSNVs pode contribuir para a nossa compreensão da evolução e epidemiologia do vírus da gripe, como a transmissão entre hospedeiros, a selecção antigénica ou a terapêutica antiviral. Nos casos de falha da vacina apenas foi encontrada uma iSNV redundante no segmento que codifica a nucleoproteína, a mutação pontual G315T que implica a substituição de aminoácido M105I. Esta substituição ocorrida na nucleoproteína dos vírus A(H3) não foi anteriormente descrita por outros autores ou previamente associada a características virais.

É possível que a baixa efetividade da vacina (EV=18,9%) (9) registada em 2016/2017, onde os vírus A(H3) constituíram a maioria dos vírus detetados, esteja de alguma forma relacionada com a grande diversificação genética destes vírus registada ao nível filogenético e da recombinação genómica. A efetividade da vacina registada em 2017/2018 foi mais

elevada (EV=63,7%) (10), mas nesta última época o vírus predominante em circulação pertencia ao tipo B (linhagem Yamagata), sendo que a efectividade vacinal específica do subtipo A(H3) não foi possível estimar devido ao reduzido número de vírus deste subtipo detetados.

Em conclusão, neste estudo, não foi encontrada uma associação entre um grupo genético, sequência nucleotídica específica, variante minoritária ou perfil de recombinação e os casos de falhas vacinais. Para além do estudo de fatores (genéticos ou imunológicos) relacionados com o hospedeiro, será ainda essencial enriquecer o conhecimento atual sobre o impacto da imunidade induzida pela vacina na diversidade da população viral intra- e inter-hospedeiro, nomeadamente através de estudos específicos sobre dinâmica populacional do vírus da gripe durante o processo infeccioso.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito I-MOVE/I-MOVE+ financiado pelo programa Horizonte 2020 e pelo *European Centre for Disease Prevention and Control*. Agradece-se a todos os médicos participantes no projeto EuroEVA/I-MOVE durante as épocas 2016/2017 e 2017/2018; e à Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Belongia EA, Simpson MD, King JP, et al. Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(8):942-51.
- (2) Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, et al. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses. *J Virol*. 2009;83(19):10309-13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748056/>
- (3) Borges V, Pinheiro M, Pechirra P, et al. INSAFLU: an automated open web-based bioinformatics suite "from-reads" for influenza whole-genome-sequencing-based surveillance. *Genome Med*. 2018;10(1):46. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0555-0>
- (4) Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-4.
- (5) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza virus characterisation, summary Europe, May 2018. Stockholm: ECDC, 2018. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/ECDC-Flu-Characterisation-Report-May-2018.pdf>
- (6) World Health Organisation. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018-2019 northern hemisphere influenza season, February 2018. http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201802_recommendation.pdf?ua=1
- (7) World Health Organisation. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017-2018 northern hemisphere influenza season, March 2017. http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201703_recommendation.pdf?ua=1
- (8) Xue KS, Moncla LH, Bedford T, et al. Within-Host Evolution of Human Influenza Virus. *Trends Microbiol*. 2018;26(9):781-93.
- (9) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Influenza Vaccine Effectiveness in Portugal. Season 2016/17 Report. Lisboa, 2017.
- (10) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Influenza Vaccine Effectiveness in Portugal. Season 2017/18 Report. Lisboa, 2018.