

Deteção e caracterização do vírus influenza A (H1N1) pandêmico no Rio Grande do Sul nos anos de 2009 e 2011

Silvia de Carli¹, Camila Marx¹, Tatiana Schäffer Gregianini², Fernanda Kieling Moreira Lehmann¹, Vagner Ricardo Lunge¹, Bibiana Paula Dambrós², Gabriela Luchiar Tumiotto² e Nilo Ikuta¹

1- Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Luterana do Brasil 2 - Laboratório de Biologia Molecular e Vírus Respiratórios, IPB-LACEN/RS



Introdução

Um novo vírus de influenza surgiu em março de 2009 causando a mais recente pandemia global de gripe. A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou que 93% dos casos de gripe que ocorreram no mundo em 2009, estavam relacionadas com o novo vírus pandêmico, classificado como tipo A pH1N1. Foram confirmados no Brasil mais de 30.000 casos e no Rio Grande do Sul (RS), foram notificados neste mesmo ano, aproximadamente 7.500 casos. Não houve nenhuma detecção em 2010, apesar da circulação em outros estados brasileiros. Em 2011, foram confirmados 108 casos no RS com 13 óbitos. Os inibidores de neuraminidase (NAIs) são as drogas recomendadas para o tratamento de infecções por vírus de influenza (oseltamivir e zanamivir). No entanto, a ocorrência de resistência a este grupo de medicamentos já tem sido relatada desde junho de 2009 para o vírus pandêmico, e até junho de 2011 foram descritos 509 casos no mundo.

Objetivos

Verificar a ocorrência de casos de influenza A (H1N1) resistentes NAIs caracterizar sua disseminação no RS e analisar a similaridade entre as cepas dos anos de 2009 e 2011.

Material e Métodos

Foram analisadas 261 amostras das quais 156 eram de 2009 e 105 de 2011. Para a comparação de seqüências, as mesmas foram classificadas previamente através de seqüências do GenBank em 14 padrões (alelos) da região polimórfica do gene da neuraminidase (NA) (tabela 1). A metodologia utilizada para a implementação da técnica de detecção e análise dos resultados está ilustrada na figura 1.

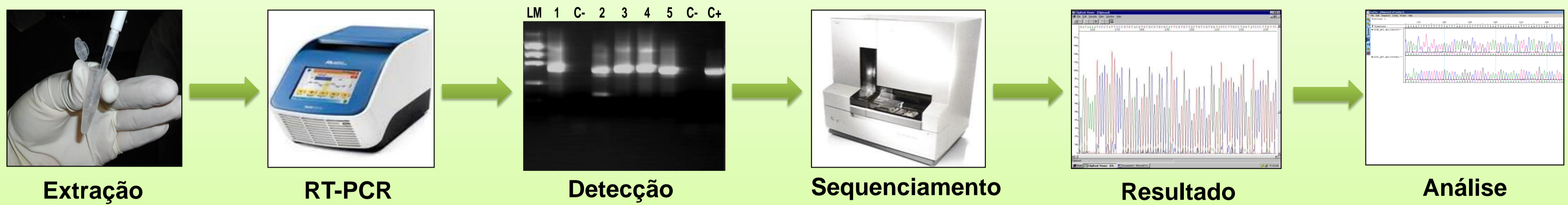


Figura 1: Etapas para implementação da técnica de detecção e caracterização das seqüências obtidas do gene da NA.

Resultados e Discussão

Partindo do preparo de um banco de genes com 161 seqüências disponíveis no GenBank, provenientes de diversos locais do mundo, obtivemos 14 perfis alélicos representantes da região polimórfica do gene da neuraminidase do vírus da influenza A pH1N1, sendo que a maior parte das seqüências agruparam-se nos alelos 1 (49,1%) e 2 (29,8%) (tabela 1). Foram realizadas análises evolutivas através do software MEGA versão 5 (2000 bootstrap) onde observou-se pouca divergência entre as seqüências dos 14 padrões (máximo 0,009%).

Quando analisou-se os resultados das amostras deste estudo, os resultados encontrados foram:

2009 (n=156)

97,4% se mostraram idênticas ao alelo 1

0,6% (1 seqüência) se enquadraram no alelo 14
(amostra com a mutação H275Y)

1,9% (3 seqüências) não corresponderam a nenhum perfil definido

2011 (n=105)

48,6% apresentaram o padrão do alelo 1

1,9% (2 seqüências) das amostras se enquadraram no alelo 9
49,5% não apresentaram o mesmo padrão de mutações

Para comparar as seqüências das amostras de 2009 e 2011 com as seqüências do banco de genes de 2009, foi criada uma árvore filogenética (Figura 2), onde observou-se uma proximidade das amostras de 2009 com o alelo 1. As amostras de 2011 se concentraram mais distantes das de 2009 e dos padrões alélicos. Apesar da formação de grupos diferentes, as amostras se mostraram muito idênticas, com uma taxa de divergência < 0,02 (MEGA versão 5 - 2000 bootstrap). Este estudo identificou duas amostras virais com mutações que conferem resistência ao oseltamivir (H275Y e S247N) no gene da NA (tabela 2). A amostra com a substituição H275Y foi encontrada em agosto de 2009 em um paciente com imunossupressão. Já o vírus detectado com a mutação S247N foi coletado em 2011 e o paciente foi a óbito.

Tabela 1: Posições das mutações no gene da NA onde se verificou alterações de aminoácidos nos 14 alelos, destaca os polimorfismos e mostra o número de seqüências que apresentaram o mesmo padrão alélico.

POSICÃO NA NEURAMINIDASE		80	83	86	95	106	116	126	189	248	274	275	Banco 2009 (n)	2009/RS (n)	2011/RS (n)
1	New York-GQ117081	V	V	A	S	I	V	P	N	D	Y	H	79	152	50
2	California-FJ966084	V	V	A	S	V	V	P	N	N	Y	H	48		
3	Washington-GQ493337	V	V	A	S	V	V	P	N	N	Y	Y	2		
4	California-FJ966956	V	V	A	G	V	V	P	N	N	Y	H	9		
5	Philippines-GQ243754	M	V	A	S	V	V	P	N	N	Y	H	1		
6	Vladivostok-GQ496143	M	V	A	S	V	I	P	N	N	Y	H	1		
7	Mexico-CY053647	V	V	A	S	V	V	H	N	N	Y	H	1		
8	Mexico-GQ402231	V	V	V	S	V	V	P	N	N	Y	H	1		
9	Argentina-CY053940	V	V	A	S	I	V	P	N	N	Y	H	6		2
10	Canada-GQ465696	V	V	A	S	I	V	P	S	D	Y	H	1		
11	Mexico City-CY050248	V	V	V	S	I	V	P	N	D	Y	H	1		
12	Mexico City-CY050045	V	A	A	S	I	V	P	N	D	Y	H	3		
13	Mexico City-CY062499	V	V	A	S	I	V	P	N	D	H	H	3		
14	Hunan-GQ463202	V	V	A	S	I	V	P	N	D	Y	Y	5	1	
Outras seqüências													0	3	53
Total													161	156	105

Tabela 2: Mutações no gene da NA que conferem resistência ao oseltamivir^a e/ou zanamivir^b ou outras mutações nos vírus sazonais e nas amostras de 2009 e 2011.

NEURAMINIDASE		79 ^a	116 ^a	117 ^a	119 ^{a,b}	126 ^{a,b}	136 ^a	151 ^{a,b}	199 ^{a,b}	222 ^a	223 ^a	234 ^a	247 ^a	249 ^b	274 ^a	275 ^a
Sazonal Selvagem		D	V	I	E	H	Q	D	D	R	I	V	S	G	H	H
Sazonal Mutante		G	A	V/M	V/G/A/D	N	K	G/A/N/V	G/E	Q	M/V/R	M	G/N	R	N	Y
Selvagem	pH1N1 2009 (n=155)	S	V	I	E	P	Q	D	D	N	I	V	S	G	Y	H
	pH1N1 2011 (n=102)	S	V	I	E	P	Q	D	D	N	I	V	S	G	Y	H
Mutante	pH1N1 2009 (n=1)	S	V	I	E	P	Q	D	D	N	I	V	S	G	Y	Y
	pH1N1 2011 (n=1)	S	V	I	E	P	Q	D	D	N	I	V	N	G	Y	H
	pH1N1 2011 (n=1)	S	V	I	E	P	Q	D	D	N	I	I	S	G	Y	H
	pH1N1 2011 (n=1)	S	V	I	E	P	Q	D	D	K	I	V	S	G	Y	H

^aOsetamivir^a ^bZanamivir^b

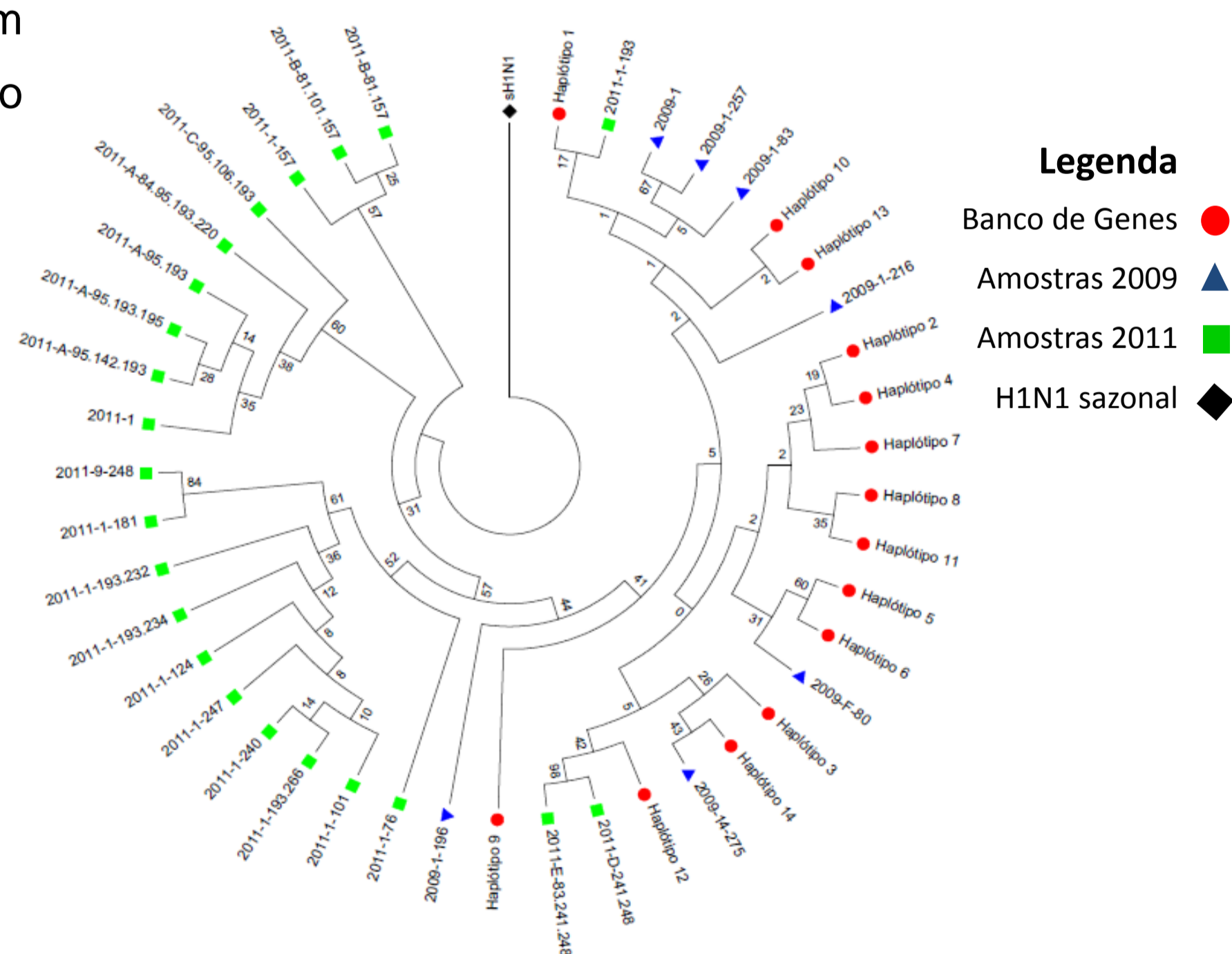


Figura 2: Relação filogenética entre as seqüências do banco de genes de 2009, das amostras de 2009 e 2011

Conclusões

Observou-se baixa divergência quando comparadas as seqüências do vírus pandêmico circulante de 2009 e 2011. Este estudo indica que em nosso país já houve circulação do H1N1 resistente a oseltamivir durante a pandemia, porém em baixa incidência. Foi demonstrado também que não houve disseminação do vírus resistente em 2011, indicando que o tratamento com NAIs continua sendo efetivo no controle desta enfermidade.