

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

**Análise genotípica das cepas produtoras da vacina Influenza utilizadas no Instituto
Butantan**

Marjhory Aparecida de Pádua Meira

São Paulo
2019

Marjhory Aparecida de Pádua Meira

**Análise genotípica das cepas produtoras da vacina Influenza utilizadas no Instituto
Butantan**

Monografia de Conclusão do Curso de Especialização
Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos do Instituto
Butantan, sob orientação de Dra. Viviane Fongaro Botosso.

São Paulo

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Meira, Marjhory Aparecida de Pádua

Análise genotípica das cepas produtoras da vacina Influenza utilizadas no Instituto Butantan / Marjhory Aparecida de Pádua Meira; orientadora Viviane Fongaro Botosso – São Paulo, 2019.

34 p.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos.

1. Assunto. I. Botosso, Viviane Fongaro. II. Instituto Butantan. II. Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Secretaria de Saúde do Governo do Estado de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Marjhory Aparecida de Pádua Meira, aluno(a) do curso **Biotechnology para Saúde – Vacinas e Biofármacos**, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- (x) Imediato
- () 06 meses
- () 12 meses
- () Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 22 de fevereiro de 2019

.....*Marjhory Aparecida de Pádua Meira*.....
Aluno(a)

De acordo:.....
Orientador(a):

V. Botusso
VIVIANE F. BOTOSSO
Diretora
Laboratório de Virologia

RESUMO

Os vírus Influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae*. As espécies causadoras da gripe em humanos *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C* pertencem aos gêneros *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus* e *Gammainfluenzavirus*. Os vírus Influenza possuem RNA segmentado, de fita simples e senso negativo com aproximadamente 13,6 quilobases de comprimento. Vírus Influenza A são classificados em subtipos com base nas propriedades antigênicas das glicoproteínas HA e NA. Atualmente existem 18 tipos de HA e 11 de NA, entretanto apenas H1-3 e N1-2 estão adaptados para infectar humanos. Esse estudo teve por objetivo a análise da estabilidade genética dos genes da hemaglutinina e neuraminidase dos bancos trabalho das cepas produtoras da vacina Influenza utilizadas no Instituto Butantan. Para tanto, foram amplificados, por PCR, os genes de seis bancos de vírus trabalho e uma amostra de banco semente sendo posteriormente submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas foram alinhadas com as sequências das cepas referências. Nenhuma das amostras apresentou mutação/inserção/alteração que alterasse a conformação dos sítios antigênicos das glicoproteínas em estudo, ou seja, os genes mantiveram-se estáveis.

Palavras chave: Influenza, sequenciamento, hemaglutinina, neuraminidase, vacina.

ABSTRACT

Influenza viruses belong to the *Orthomyxoviridae* family. The influenza-causing species in human *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* and *Influenzavirus C* belong to the genera *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus* and *Gammainfluenzavirus*. The influenza viruses have segmented RNA, single-stranded and negative-sense with approximately 13.6 kilobases of length. Influenza A viruses are classified into subtypes based on the antigenic properties of the HA and NA glycoproteins. Currently there are 18 types of HA and 11 of NA, however only H1-3 and N1-2 are adapted to infect humans. This study aimed to analyze the genetic stability of hemagglutinin and neuraminidase of the Influenza vaccine-producing strains used in the Butantan Institute. To this end, the genes of six samples of the working bank were amplified and one sample of master seed bank were amplified by PCR and submitted to sequencing of nucleotides. The sequences of nucleotides and amino acids were aligned with the sequences of the reference strains. None of the samples presented mutation/insertion/alteration that altered the conformation of the antigen sites of the glycoproteins under study, that is, the genes remained stable.

Key words: Influenza, sequencing, hemagglutinin, neuraminidase, vaccine.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 7 |
| 1.1 Classificação e Estrutura dos Vírus..... | 7 |
| 1.2 Epidemiologia..... | 8 |
| 1.3 Vacina..... | 11 |
| 2 OBJETIVO..... | 13 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODO..... | 13 |
| 3.1 Cepas vacinais avaliadas..... | 13 |
| 3.2 Amplificação dos genes da hemaglutinina e neuraminidase..... | 14 |
| 3.2.1 Extração do RNA total e síntese de cDNA..... | 14 |
| 3.2.2 Amplificação dos genes de HA e NA por PCR..... | 15 |
| 3.2.3 Purificação dos <i>amplicons</i> | 16 |
| 3.2.4 Reação de Sequenciamento..... | 16 |
| 3.2.5 Purificação da Reação de Sequenciamento e análise..... | 16 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 18 |
| 4.1 Amplificação dos genes de HA e NA por PCR..... | 18 |
| 4.2 Sequenciamento do gene da hemaglutinina..... | 20 |
| 4.3 Sequenciamento do gene da neuraminidase..... | 22 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 23 |
| REFERÊNCIAS..... | 24 |
| ANEXOS..... | 29 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Classificação e Estrutura dos Vírus

Os vírus Influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae*, atualmente dividida em sete gêneros: *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Quaranjavirus* e *Thogotovirus*. As espécies causadoras da gripe em humanos *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C* pertencem aos gêneros *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus* e *Gammainfluenzavirus* respectivamente (ICTV, 2018), sendo que os dois primeiros apresentam importância epidemiológica. A nomenclatura atual para vírus influenza possui descrição do sorotipo/hospedeiro de origem (não utilizada quando é humano)/lugar de origem/número da cepa/ano de isolamento e subtipos de HA e NA); por exemplo: A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2), (ICTV, 2011; HORIMOTO, 2001).

Morfologicamente as partículas virais de Influenza A (FLUAV) e B (FLUBV) são indistinguíveis, com aproximadamente 100 nm de diâmetro e que podem possuir formato regular esférico, quando cultivados em ovo ou cultura de células, ou pleomórfico e filamentosos, quando isolados de humanos ou animais ou propagados por uma única passagem em cultura (LAMB e KRUG, 2001; JAWETZ et al., 2013).

Os vírus Influenza possuem RNA segmentado, de fita simples e senso negativo com aproximadamente 13,6 quilobases de comprimento. Influenza A, B e C podem ser diferenciados com base nas diferenças antigênicas de duas proteínas: nucleocapsídeo (NP) e a matriz (M) (JAWETZ et al., 2013; LAMB e KRUG, 2001).

Influenza A e B possuem oito segmentos que codificam 11 proteínas, enquanto os vírus Influenza C possuem sete segmentos que codificam nove proteínas. Os primeiros 12-13 nucleotídeos de cada extremidade de cada segmento são conservados e são importantes para a transcrição viral (JAWETZ, et al., 2013).

As partículas virais possuem nove proteínas estruturais. A associação da nucleoproteína (NP) com o RNA viral forma a ribonucleoproteína (RNP) com simetria helicoidal. PB1 (polimerase básica 1), PB2 (polimerase básica 2) e PA (polimerase ácida) são três proteínas associadas à RNP e responsáveis pela transcrição e replicação do RNA. Na parte interna do envelope lipídico, englobando a RNP,

encontra-se a proteína matriz (M1), uma proteína importante para a morfogênese da partícula viral. O envelope lipídico, derivado da membrana da célula hospedeira, possui duas glicoproteínas expressas na sua superfície: hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) e o canal iônico M2 (JAWETZ, et al., 2013).

Vírus Influenza A são classificados em subtipos com base nas propriedades antigênicas das glicoproteínas HA e NA. Atualmente existem 18 tipos de HA e 11 de NA, entretanto apenas H1-3 e N1-2 estão adaptados para infectar humanos (WHO, 2018; Tong et al., 2013).

A hemaglutinina é codificada pelo segmento 4 do RNA que possui de 1742 a 1778 nucleotídeos. É sintetizada no retículo endoplasmático das células infectadas como um polipeptídeo HA₀ com PM de \cong 76.000 e com 562 a 566 resíduos de aminoácidos.(LAMB e KRUG, 2001). Após a tradução a proteína é modificada por glicosilação, adição de ácidos graxos e clivagem proteolítica, essenciais para a função da molécula. A clivagem desse precursor resulta em duas subunidades, HA1 (PM \cong 47.000) e HA2 (PM \cong 29.00) que permanecem unidas por ligações dissulfeto. HA é responsável pela ligação das partículas virais ao receptor da célula hospedeira e pela fusão entre o envelope viral e a célula hospedeira. Também é o principal antígeno neutralizado pelos anticorpos (LAMB e KRUG, 2001; JAWETZ et al., 2013; WEBSTER et al, 1992).

A neuraminidase é codificada pelo segmento 6 e é responsável pela clivagem dos ácidos siálicos, o que permite a liberação das partículas virais da célula hospedeira e disseminação da infecção (JAWETZ et al., 2013; WEBSTER et al, 1992).

1.2 Epidemiologia

A gripe sazonal no Brasil tem início em março/abril no norte brasileiro e, em um efeito cascata, se espalha para regiões mais ao sul do país, sendo em junho o primeiro pico do vírus no sudeste do país. Entretanto, na região norte, os vírus podem ser encontrados o ano todo, principalmente na região norte (CAINI, 2012; Alonso et al., 2007).

Segundo dados do Informe Epidemiológico do Ministério da Saúde, até a semana epidemiológica 45 de 2019, a maioria dos casos confirmados de infecção por vírus influenza era A(H1N1)pdm09, seguido por Influenza A(H3N2), Influenza A não

subtipado e, por último, Influenza B. Mundialmente ainda há predomínio do vírus Influenza A(H1N1)pdm09 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

Diferente dos vírus Influenza B que são vírus que infectam humanos, os vírus Influenza A são capazes de infectar, além dos homens, diversos animais como porcos, cavalos e pássaros. Os pássaros aquáticos são considerados como principal reservatório do vírus, nos quais já foram detectados os 16 tipos de hemaglutinina, e os 9 de neuraminidase, sendo portanto, considerados como fonte de transmissão do vírus (WEBSTER, 1992). Dois novos subtipos foram identificados recentemente em morcegos (H17 e H18, N10 e N11) (TONG et al., 2013).

Pequenas variações antigênicas, chamadas de *drift* antigênico, são decorrentes da replicação do vírus e podem produzir vírus geneticamente semelhantes que possuem propriedades antigênicas semelhantes para as quais o sistema imune humano é capaz de reconhecer e gerar resposta imune (chamada proteção cruzada), ou seja, o vírus ainda pertence ao mesmo subtipo viral. Entretanto essas pequenas mudanças podem ser acumuladas com o tempo e resultar em vírus que tem propriedades antigênicas diferentes. Nesse caso, o sistema imune é incapaz de reconhecer e gerar resposta imunológica a esses vírus, tornando o indivíduo susceptível a infecção pelo “novo vírus”. Por essa razão a composição da vacina contra gripe é revista todos os anos e modificada conforme necessário para acompanhar a evolução dos vírus. Outro tipo de mutação, denominada *shift* antigênico (ou rearranjo genômico ou mudança antigênica) ocorre principalmente nos vírus Influenza A e gera novos vírus contendo novas proteínas de hemaglutinina e/ou neuraminidase, tendo como consequência um novo subtipo de Influenza A ou um vírus com hemaglutinina ou uma combinação de hemaglutinina e neuraminidase diferentes dos subtipos que infectam os humanos (CDC, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b), encontrando população de susceptíveis, propiciando rápida disseminação, podendo ocasionar pandemias.

Três pandemias de gripe ocorreram no século XX e uma neste século, todas causadas por Influenza A (WEBSTER, 2014). Para uma pandemia ocorrer é necessário que um novo tipo de vírus, que possui um tipo de HA e/ou NA contra o qual há pouca resposta ou nenhuma resposta imunológica na população, apareça e seja capaz de infectar e causar uma doença, severa ou não, e ser transmitido de humano para humano, disseminando-se em grandes populações (GARTEN, 2009; WHO, 2009). Um importante mecanismo para o surgimento de um novo vírus é o shift

antigênico, no qual ocorre o rearranjo gênico entre diferentes vírus que infectam a mesma célula.

A primeira pandemia, denominada Gripe Espanhola, teve início em 1918 e foi causada pelo subtipo H1N1 que possuía genes de origem aviária. Não se sabe ao certo aonde a epidemia começou, mas entre os anos de 1918 e 1920, em quatro ondas epidêmicas, ela se espalhou ao redor do mundo. Considerada a mais severa das pandemias de gripe. Estima-se que 500 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus, cerca de um terço da população mundial na época, e 50 milhões delas não sobreviveram (CARNEIRO, 2010; CDC, 2018; WHO, 2012). Entre 1915 e 1916 ocorreu um aumento considerável no número de mortes causadas por gripe e pneumonia nos Estados Unidos, em 1917 o número caiu levemente, até que, na metade do ano de 1918, houve o primeiro surto da pandemia, seguido por um segundo e terceiro surtos ainda mais fatais no fim de 1918 e início de 1919, respectivamente (TAUBENBERGER, 2006). O risco de morte associada à infecção era maior entre pessoas com menos de 65 anos do que entre aqueles com idade igual ou superior a 65 anos (SIMONSEN et al., 1997).

Em 1958, na Ásia, surgiu uma nova pandemia com um novo subtipo de Influenza A, H2N2, originado a partir de um rearranjo do subtipo circulante entre os humanos, H1N1, e o subtipo H2N2 aviário gerando um vírus com três genes aviários (PB1, HA – H2, e NA – N2) e o restante dos genes do subtipo humano (KAWAOKA et al., 1989). A população tinha pouca ou nenhuma proteção contra as novas proteínas de superfície, pois a homologia entre H1 e H2 era apenas 66% e entre N1 e N2 era 37% (PALESE, 2004).

A última pandemia do século XX teve início em 1968, quando uma doença respiratória aguda foi relatada em Hong Kong, sendo isolada a cepa A/Hong Kong/68 (A/H3N2). Logo depois casos semelhantes à infecção por influenza começaram a aumentar ligeiramente em Hong Kong. O novo vírus possuía um rearranjo entre os genes de PB1 e HA (H3) aviários e seis outros genes do vírus H2N2 humano (KAWAOKA et al., 1989). Menos severa do que as pandemias anteriores, apesar do vírus ter se espalhado ao redor do globo, muitos países não foram amplamente afetados pela presença do vírus e o número de mortes não foi muito maior do que em epidemias sazonais, com exceção dos Estados Unidos que teve um aumento da mortalidade, principalmente em menores de 65 anos (COCKBURN, 1969).

Neste século, em março de 2009, ocorreram os primeiros casos de gripe notificados no México. Em abril, nos Estados Unidos, mais casos foram reportados e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças identificou uma nova cepa do vírus H1N1 (CARNEIRO et al., 2010). Denominado influenza A (H1N1)09pandêmico, o vírus possuía uma combinação de segmentos, até aquele momento, nunca reportada em vírus humanos ou suínos, sendo resultado de pelo menos 3 diferentes eventos de rearranjo (GARTEN et al., 2006; WHO, 2018). O novo vírus, resultado de um rearranjo múltiplo, possuía genes de origem aviária, genes de dois vírus suínos, da eurásia e da América e genes de vírus humano (SMITH et al., 2009). A OMS decretou pandemia, ou seja, o vírus com transmissão estabelecida e disseminado por diversos países, em junho de 2009. Pandemias anteriores levaram ao menos seis meses para se espelhar ao redor mundo, em 2009 foram necessárias apenas nove semanas, com quase 95000 casos e 429 mortes reportadas em 135 países (WHO, 2009). Estima-se que, entre 2009 e 2010, 201200 mortes por doenças respiratórias e 83300 mortes por doenças cardiovasculares foram causadas associadas à infecção pelo novo vírus Influenza A(H1N1) (DAWOOD et al., 2012). O fim da pandemia foi decretado em agosto de 2009, após o que o vírus passou a ser denominado (H1N1)pdm09.

1.3 Vacina

A vacinação é a principal via de proteção contra os vírus Influenza. Com o objetivo de criar anticorpos neutralizantes contra as glicoproteínas HA e NA, as vacinas atuais protegem contra os subtipos de Influenza A, H1N1 e H3N2 e Influenza B. Devido ao reconhecimento de antígenos específicos pelos anticorpos neutralizantes, a efetividade da vacina depende da similaridade entre as glicoproteínas HA e NA da vacina e da cepa circulante, (WEBSTER, 2014).

Desde 1973 a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda quais cepas devem compor a vacina contra gripe todos os anos, tanto do hemisfério Norte (HN) como no Hemisfério Sul (HS). O relatório de setembro de 2018, com base na atividade do vírus de fevereiro a setembro de 2018 no HS reportadas para a OMS pelos centros de referência determinou que as cepas que seriam usadas para produção das vacinas trivalentes eram: A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-like vírus, A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)-like vírus e B/Colorado/06/2017-like virus (B/Victoria/2/87 linhagem) (WHO, 2018). As cepas vacinais são produzidas por

organizações como CDC (Center for Disease Control and Prevention, nos Estados Unidos) e NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) através de um rearranjo entre cepa vacinal caracterizada (PR8) e as cepas circulantes, visando obter vírus com alto rendimento na produção e cujas proteínas de superfície sejam similares aos vírus circulantes recomendados. Desta maneira, obtém-se cepas com genes internos do vírus PR8 e os genes da Hemaglutinina e neuraminidase das cepas circulantes. As cepas vacinais são distribuídas aos produtores de vacinas de influenza para serem utilizadas na produção das vacinas. A primeira etapa de produção é a preparação de um banco de trabalho que seja utilizado em todos os lotes de produção de vacinas, garantindo homogeneidade de produção.

Uma das exigências das Agências reguladoras de produção de insumos farmacêuticos é a caracterização genética e antigênica destes bancos e a verificação de sua estabilidade frente à várias passagens a que são submetidos durante o processo de produção, tendo em vista que durante o processo de adaptação das cepas em ovos podem ocorrer mutações específicas, tanto para Influenza B como para Influenza A (ROBERTSON et al., 1985; HARD, et al., 1995; WANG, 2008). Dentre as técnicas utilizadas cita-se o sequenciamento de nucleotídeos, que permite verificar a presença de alterações nos genes e, conseqüentemente, na estrutura primária das proteínas de superfície.

O Instituto Butantan, afiliado a Secretaria da Saúde de São Paulo, é responsável pela produção da vacina sazonal de influenza no país. Através de uma parceria de transferência de tecnologia com Sanofi Pasteur, o Instituto Butantan produz uma vacina trivalente inativada em ovos embrionados, (MIYAKI, 2011). Sendo assim, o presente trabalho objetiva analisar estabilidade genética dos genes da hemaglutinina e neuraminidase dos bancos de trabalho (BVT) das cepas produtoras da vacina Influenza utilizadas no Instituto Butantan no ano de 2018.

2 OBJETIVO

O presente estudo objetivou analisar a estabilidade genotípica das cepas produtoras da vacina Influenza utilizadas no Instituto Butantan para a Campanha Nacional de Vacinação de 2019.

Objetivos específicos:

- Realizar o sequenciamento de nucleotídeos, pelo método de Sanger, dos genes da hemaglutinina e neuraminidase dos bancos de trabalho das cepas vacinas de Influenza.
- Comparar as sequências obtidas com sequências dos referidos genes das cepas vacinais referência obtidas de banco de dados ou com as sequências geradas a partir do banco semente.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Cepas vacinais avaliadas

Foram utilizados dois lotes de cada cepa descrita a seguir: A/Michigan/45/2015 NYMC X-275 (H1N1), A/Switzerland/8060/2017 (H3N2), B/ Maryland/15/2016 - BX - 69A. (B) listadas na tabela 1.

Tabela 1 – lista dos lotes dos bancos de vírus submetidos à caracterização genética pela técnica de sequenciamento pelo método de Sanger.

| Cepa | Lote do BVT* |
|--|--------------|
| Cepa A/H1N1 - A/Michigan/45/2015 (H1N1) | H1/BVT160002 |
| Cepa A/H1N1 - A/Michigan/45/2015 (H1N1) | H1/BVT160001 |
| Cepa B - B/Maryland/15/2016 - BX - 69A. (B) | B/BVT180001 |
| Cepa B - B/Maryland/15/2016 - BX - 69A. (B) | B/BVT180002 |
| Cepa A/H3N2 - A/Switzerland/8060/2017-NIB-112 | H3/BVT180002 |
| Cepa A/H3N2 - A/Switzerland/8060/2017-NIB-112 | H3/BVT180003 |
| Banco Semente A/H3N2 - A/Switzerland/8060/2017-NIB-112 | S/L** |

*BVT – Banco de vírus trabalho

** Sequenciado para utilização como sequência referência. S/L – sem lote.

3.2 Amplificação dos genes da hemaglutinina e neuraminidase

3.2.1 Extração do RNA total e síntese do CDNA

Os microtubos de 1,5 mL contendo 250 µL da suspensão viral e 750 µL de TRIzol® (Invitrogen), em duplicata, enviados pela seção de Produção de Bancos Influenza e recebidos no Laboratório de Virologia, foram mantidos em refrigerador a 4°C até o momento da extração do RNA total.

A extração do RNA total foi realizada em estantes geladas e com reagentes gelados. Ao mesmo microtubo recebido foram adicionados 100 µL de clorofórmio P.A. (Merck) gelado. Após homogeneização em agitador de tubos tipo vórtex por 15 segundos e incubação em estante de gelo por 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 15000 x g por 15 minutos a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, previamente identificado, e a este novo microtubo adicionou-se o mesmo volume do sobrenadante retirado de isopropanol (Merck) gelado. Após homogeneização de 15 segundos em vórtex e banho de gelo em estante por 15 minutos, seguiu-se uma nova centrifugação a 15000 x g por 15 minutos a 4°C. A seguir o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado com 800 µL de etanol 75% gelado (Merck) e centrifugado a 8000 x g por 8 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o microtubo deixado para secar em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Após a secagem, o precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água livre de DNase e RNase (Ambion).

Após a extração do RNA, a síntese de cDNA deve ser iniciada imediatamente para evitar a degradação do RNA. O cDNA foi obtido utilizando o kit *High Capacity Archive* (Applied Biosystems®), que contém: solução de dNTP 25X (100mM), *random primer* 10X, tampão de reação 10X, da enzima *MultiScribe Transcriptase reversa*, seguindo as instruções do fabricante para obtenção de volume final de 100 µL por reação. Resumidamente, para o preparo de 50 µL de reação utilizou-se: 4 µL de solução de dNTP 25X (100mM); 10 µL de *random primer* 10X; 10 µL tampão de reação 10X; 5 µL da enzima *MultiScribe Transcriptase reversa* e 21 µL de água livre de DNase e RNase. Após a preparação do mix da reação, homogeneização e distribuição em microtubos de 0,2 mL, o RNA extraído foi adicionado em igual volume. A extensão foi realizada em termociclador *Veriti* (Applied Biosystems), a 25°C por 10 minutos, 37°C

por 2 horas, 85°C por 5 minutos e mantido a 4°C ao final. O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer a -20°C.

3.2.2 Amplificação dos genes de HA e NA por PCR

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada com quatro conjuntos de *primers* específicos para os genes de hemaglutinina e neuraminidase, desenhados pelo Laboratório de Virologia, disponíveis conforme requisição.

A PCR foi realizada utilizando o kit *Taq Polimerase Platinum (Invitrogen)*, que contém: tampão de reação 10X, mix de dNTP (10 mM), solução de MgCl₂ 50 mM e a enzima *Platinum™ Taq DNA Polimerase* (5 U/μL), seguindo as recomendações do fabricante.

Para as amostras de Influenza A H1N1 e H3N2 o mix de reação conteve, para cada amostra: 2,5 μL de tampão de reação 10X; 1 μL da solução de MgCl₂; 1 μL da solução de dNTP, 0,5 μL da enzima *Taq Platinum* e 15,5 μL de água livre de DNase e RNase, com volume total de reação de 25 μL, com 1 μL de cada *primer, forward* e *reverse*, a 10 pmol/μL e 2,5 μL de cDNA. Para as amostras de Influenza B, utilizou-se para cada amostra: 5 μL de tampão de reação 10X; 2 μL da solução de MgCl₂; 2 μL da solução de dNTP, 0,5 μL da enzima e 31,5 μL de água livre de DNase e RNase, com volume total de reação por amostra de 50 μL, com 2 μL de cada *primer, forward* e *reverse*, a 10 pmol/μL e 5 μL de cDNA.

A extensão foi realizada em termociclador *Veriti (Applied Biosystems®)* com o seguinte ciclo para Influenza A: 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 50°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, 72°C por 7 minutos para extensão final e 4°C até a retirada do equipamento. Para Influenza B o ciclo foi: 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 50°C por 50 segundos e 72°C por 90 segundos, 72°C por 7 minutos para extensão final e 4°C até a retirada do equipamento. As amostras foram armazenadas em refrigerador a 4°C até a próxima etapa.

A visualização dos *amplicons* gerados pela PCR foi feita em gel de agarose (*Invitrogen™*) 1,2% em tampão TBE (45 mM Tris-Borato e 1 mM EDTA [pH 8]) ao qual foi adicionado 5 μL do corante GelRed™ (*Uniscience*) para visualização dos produtos amplificados com luz UV. Cinco microlitros de cada produto da PCR misturados a 2 μL de tampão *Blue Juice™ 10X (Invitrogen)* e 2 μL de padrão de peso molecular de

100 pares de bases (*BioTools*) foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese em cuba horizontal, a 100V por aproximadamente 40 minutos. A visualização do gel foi feita em transiluminador de luz ultravioleta e documentada em fotodocumentador *BioDoc-it* (UVP).

3.2.3 Purificação dos *amplicons*

Comprovada a existência das bandas no tamanho esperado no gel de eletroforese, as amostras provenientes da PCR foram purificadas pelo kit *ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup Reagent*, (*Applied Biosystems®*) para eliminação de excesso de *primers* e dNTPs. Para cada 5 µL do produto da PCR, foram utilizados 3 µL do reagente do kit *ExoSAP-IT™*. A extensão ocorreu em termociclador *Mastercycler® Pro* (*Eppendorf*) a 37°C por 15 minutos, 80°C por 15 minutos e 4°C até a retirada das amostras do equipamento. Posteriormente, foram acrescentados 43 µL de água livre de DNase e RNase a cada microtubo de amostra.

3.2.4 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing*, (*Applied Biosystems®*), segundo instruções do fabricante: para cada 5µL de amostra proveniente da reação de purificação foram utilizados 2µL do tampão de reação 5x - *Save Money* e 2µL do *Big Dye® Terminator v3.1 CycleSequencing*. À mistura de reação foi acrescentado, separadamente, 1 µL de *primer, forward ou reverse*, a 10 pmol/µL. A extensão enzimática iniciou-se a 96°C por 1 minuto, com 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos por 30 ciclos e mantido a 4°C até a retirada dos microtubos do equipamento. O armazenamento, em refrigerador, deu-se com os microtubos protegidos da luz embalados em papel alumínio.

3.2.5 Purificação da reação de sequenciamento e análise

A última etapa de purificação foi feita com kit *BigDye X-Terminator*, (*Applied Biosystems®*), segundo as instruções do fabricante para retirada de impurezas e excesso de dideoxynucleotídeos terminadores não incorporados. Para cada 10µL de

amostra foram utilizados 45 µL do tampão de reação *SAM Solution* e 10 µL do reagente *X-Terminator*[®]. Após adição dos reagentes os microtubos ficaram em agitação a 2500 rpm por 30 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 1000 rpm por 2 minutos e 20 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de sequenciamento MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems[®]), armazenados a 4°C em refrigerador, protegido da luz, até o momento da corrida no analisador genético.

As amostras purificadas foram submetidas à eletroforese em polímero POP--7[™] (Applied Biosystems[®]), utilizando sequenciador automático ABI PRISM modelo 3500xL (Applied Biosystems[®]).

Os arquivos provenientes da corrida eletroforética no analisador genético foram analisados com auxílio do programa *SeqMan Pro*[™], traduzidas para aminoácidos com auxílio do programa *EditSeq 15*[™] e alinhadas entre si pelo programa *MegAlign Pro*[™], contidos no software Expert Analysis Software – DNASTAR versão 15.2.0 (130), Inc., EUA.

As sequências de nucleotídeos obtidas de cada gene de cada lote de banco trabalho foram alinhadas com a sequência das respectivas cepas referências depositadas em banco de dados (GenBank) e alinhadas entre si para verificar a ocorrência de mutações/inserções/deleções na sequência de nucleotídeos. Na ausência de sequência referência no banco de dados a sequência do BVT obtida foi comparada com a sequência obtida a partir do Banco Semente original recebido do Centro Colaborador NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*). O alinhamento foi realizado pelo programa *Blast*, (Zheng Zhang et al. 2000). Como critério de aceitação são consideradas aprovadas as sequências dos bancos que apresentaram 99% de similaridade com a cepa vacinal referência ou com o banco semente.

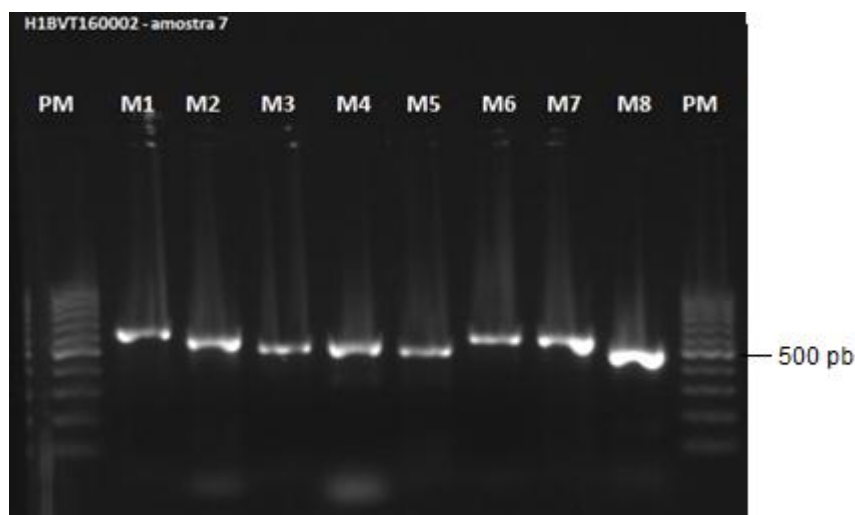
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de seis bancos de vírus trabalho e um banco semente foram submetidos à PCR para amplificação dos genes da hemaglutinina e neuraminidase seguido de reação de sequenciamento e eletroforese capilar, realizada no analisador genético, para análise da estabilidade dos genes de hemaglutinina e neuraminidase após passagens em ovos embrionados de galinha.

4.1 Amplificação dos genes de HA e NA por PCR

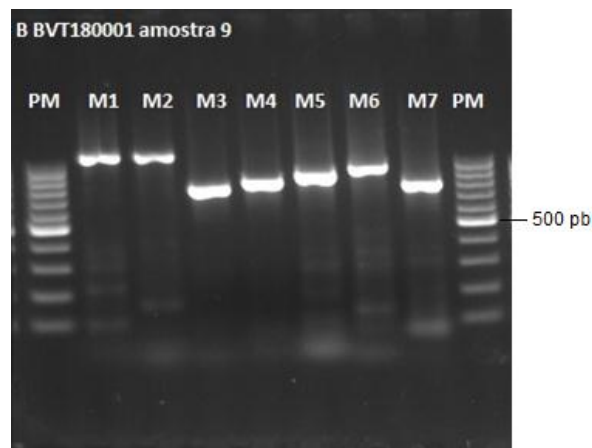
As reações de amplificação do gene da hemaglutinina dos BVT de H1N1 (lotes H1/BVT160002 E H1/BVT160001) utilizando os *primers* específicos geraram 4 produtos (*amplicons*) de 585, 570, 506 e 540 pares de base e os *primers* específicos para o gene da neuraminidase geraram 4 produtos de 461, 559, 567 e 688 pares de bases em ambas as reações realizadas, conforme demonstrado na figura 1.

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed, dos produtos da PCR para Influenza A H1N1, cepa A/Michigan/45/2015 (H1N1), lote H1/BVT160002, utilizando *primers* específicos para amplificação dos genes hemaglutinina e neuraminidase. **Canaleta 1 e 10:** peso molecular de 100 pares de base (*BioTools*). **Canaleta 2 a 5:** amplificação dos fragmentos do gene da hemaglutinina. **Canaleta 6 a 9:** amplificação dos fragmentos do gene da neuraminidase.



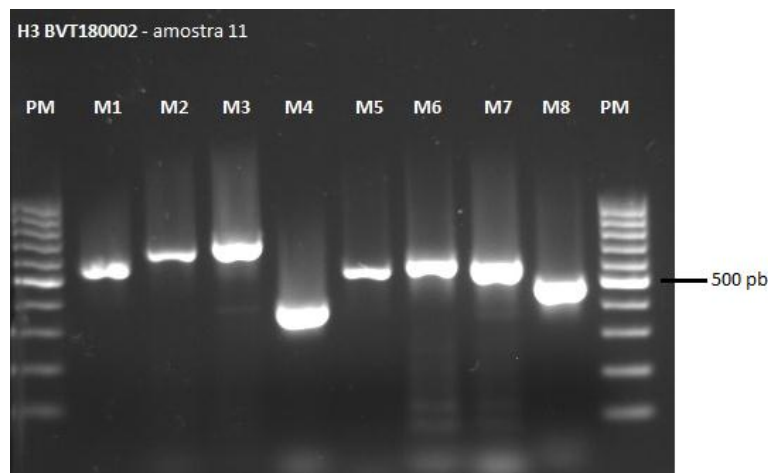
As reações de amplificação do gene da hemaglutinina das amostras de Influenza B, cepa B/Maryland/15/2016 – BX – 69A, LOTES B/BVT1800010 e B/BVT180002, utilizando os *primers* específicos geraram 4 produtos (*amplicons*) de 890, 860, 751 e 538 pares de base e os *primers* específicos para o gene da neuraminidase geraram 4 produtos de 1077, 1045 e 720 pares de bases em ambas as reações realizadas, conforme representado da figura 2.

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed, dos produtos da PCR para Influenza B, cepa B/Maryland/15/2016 - BX - 69A. (B), lote B/BVT180001, utilizando *primers* específicos para amplificação dos genes hemaglutinina e neuraminidase. **Canaleta 1 e 9:** peso molecular de 100 pares de base (*BioTools*). **Canaleta 2 a 5:** amplificação dos fragmentos do gene da hemaglutinina. **Canaleta 6 a 8:** amplificação dos fragmentos do gene da neuraminidase.



As reações de amplificação do gene da hemaglutinina dos BVTs de H3N2, cepa A/H3N2-A/Switzerland/8060/2017-NIC-112, lote H3/BVT180002 e lote H3/180003 e do bando semente original (sem lote) utilizando os *primers* específicos geraram 4 produtos (*amplicons*) de 510, 575, 568 e 458 pares de base com os *primers* específicos para o gene da neuraminidase geraram 4 produtos de 542, 633, 676 e 688 pares de bases em ambas as reações realizadas, conforme demonstrado na figura 3.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed, dos produtos da PCR para Influenza A H3N2, cepa A/H3N2-A/Switzerland/8060/2017-NIB-112, lote H3/BVT180002, utilizando primers específicos para amplificação dos genes hemaglutinina e neuraminidase. **Canaleta 1 e 10:** peso molecular de 100 pares de base (*BioTools*). **Canaleta 2 a 5:** amplificação dos fragmentos do gene da hemaglutinina. **Canaleta 6 a 9:** amplificação dos fragmentos do gene da neuraminidase.



4.2 Sequenciamento do gene da hemaglutinina

Os produtos de PCR dos genes da hemaglutinina de todos os bancos analisados foram purificados conforme item 3.2.3 e, a seguir, submetidos a reação de sequenciamento. Para avaliar a similaridade entre os lotes de banco de vírus trabalho que foram utilizados na Campanha Nacional de Vacinação contra Influenza em 2019, as sequências de nucleotídeos obtidas das amostras de vírus Influenza H1N1 e Influenza B foram alinhadas com a respectiva sequência da cepa vacinal referência recomendada pela OMS para o hemisfério sul, disponível em banco de dados. As sequências obtidas das amostras do vírus Influenza H3N2 foram alinhadas com a sequência obtida do sequenciamento do banco semente original.

Os lotes H1/BVT160002 e H1/BVT160001 do vírus H1N1 submetidos à reação de sequenciamento tiveram 1732 (compreendendo os nucleotídeos 21 a 1752) e 1753 (compreendendo os nucleotídeos 1 a 1752) nucleotídeos sequenciados, respectivamente. Ambas os bancos de H1N1 obtiveram 99% de similaridade com a sequência de nucleotídeos da cepa vacinal depositada no GenBank (número de acesso KU933493.1), apresentado 2 nucleotídeos divergentes nas posições A697W e 1517, sendo no lote H1/BVT180002 alteração G1517R e no lote H1/BVT180001 alteração G1517A. Considera-se W: o nucleotídeo A ou T e R: o nucleotídeo G ou A.

A alteração em 697 resultou na alteração de um aminoácido na posição K226X, sendo X pode ser metionina (códon AAG) ou lisina (códon ATG) (figura A.1 do anexo A). Essa alteração não está localizada em nenhum dos sítios antigênicos: Sa, Sb, Ca2, Ca1, Cb e Pa, descritos para os vírus H1N1pdm (09) e envolvidos na indução de anticorpos neutralizantes (MATSUZAKI et al.,2014).

Das amostras de Influenza B sequenciadas, o lote B/BVT180001 teve 1679 (nucleotídeos 102 a 1780) e o lote B/BVT180002 teve 1629 (nucleotídeos 144 a 1772) nucleotídeos sequenciados. As amostras de Influenza B obtiveram 99% (lote B/BVT180001) e 99% (lote B/BVT180002) de homologia com a sequência da cepa vacinal depositada no GenBank (acesso CY236600.1). Em comparação com a sequência da cepa vacinal, a sequência de nucleotídeos obtida de ambos os lotes de vírus Influenza B apresentaram os mesmos 7 nucleotídeos divergentes, posições: G450A, C637T, M684A, T654C, A1192G, C1429T e T1762C, sendo R o nucleotídeo G ou A, Y sendo T ou C, K sendo G ou T, M sendo A ou C, W sendo A ou T, S sendo G ou C. Já a sequência de aminoácidos apresentou três alterações: G144D, X210N e T212I, sendo G o aminoácido glicina, D: ácido aspártico, N: asparagina, T: treonina e I: isoleucina; o X aparece na sequência de aminoácidos da cepa referência devido a presença da base degenerada M na posição 648 na sequência de nucleotídeos (figura A.2 do anexo A). Os sítios antigênicos mais importantes descritos para Influenza B são *loop* 120, 150 e 160 e na hélice 190 (WEINA et al. 2019). Não foram encontradas alterações dentro destas regiões.

Os lotes H3/BVT180002 e H3/BVT180003 do vírus H3N2 submetidos ao sequenciamento tiveram 1742 (compreendendo os nucleotídeos 4 a 1721) e 1729 (compreendendo os nucleotídeos 7 a 1727) nucleotídeos sequenciados, respectivamente. As amostras do vírus H3N2 obtiveram 99% e 100% de homologia com a sequência de nucleotídeos do banco semente. O lote H3/BVT18003 apresentou divergência em 2 nucleotídeos: A519R e C674T (figura A.3 do anexo A). Nenhuma das modificações na sequência de nucleotídeos alterou a sequência de aminoácidos formada quando comparada à sequência de aminoácidos do banco semente, sendo, portanto, alterações silenciosas e não modificando, portanto, nenhum dos sítios antigênicos descritos para a Hemaglutinina subtipo H3 (A, B, C, D e E) (WILEY et al, 1981).

4.3 Sequenciamento do gene da neuraminidase

Os produtos de PCR do gene da neuraminidase foram purificados conforme item 3.2.3. Para avaliar a similaridade entre os lotes de banco de vírus trabalho que foram utilizados na Campanha Nacional de Vacinação contra Influenza em 2019, as sequências de nucleotídeos obtidas das amostras de vírus Influenza H1N1 e Influenza B foram alinhadas com a respectiva sequência da cepa vacinal referência recomendada pela OMS para o hemisfério sul e, no caso das amostras do vírus H3N2, as sequências foram alinhadas com a sequência obtida do sequenciamento do banco semente.

Os lotes H1/BVT160002 e H1/BVT160001 submetidos à reação de sequenciamento tiveram 1439 (compreendendo os nucleotídeos 1 a 1433) e 1436 compreendendo os nucleotídeos (1 a 1432) nucleotídeos sequenciados, respectivamente. Ambas as amostras de H1N1 obtiveram 100% de similaridade com a sequência da cepa vacinal depositada no GenBank (KY117025.1), portanto, não houve alteração na sequência de aminoácidos (figura A.4 do anexo A).

Das amostras de Influenza B sequenciadas o lote B/BVT180001 teve 1445 (nucleotídeos 52 a 1496) e o lote B/BVT180002 teve 1329 (nucleotídeos 54 a 1445) nucleotídeos sequenciados. As amostras de Influenza B obtiveram 99% de homologia com a sequência da cepa vacinal depositada no GenBank (número de acesso CY236601.1). A sequência obtida do lote B/BVT180001 apresentou 2 nucleotídeos divergentes nas posições: T861A e C1150A, o lote B/BVT180002 apresentou, além desse, 2 nucleotídeos, mais um na posição C1278Y. O gene da neuraminidase do vírus Influenza B codifica duas proteínas: NB1 e neuraminidase. Apenas uma alteração ocorreu na sequência de aminoácidos da neuraminidase gerada das amostras: Q371K, sendo Q uma glutamina e K: lisina e não houve alteração na sequência de aminoácidos de NB1 (figura A.5 do anexo A).

O lote H3/BVT180002 teve 1464 (compreendendo os nucleotídeos 1 a 1002) e o lote H3/BVT18003 teve 1456 (nucleotídeos 1 a 1002) nucleotídeos sequenciados. As amostras de Influenza H3N2 obtiveram 99% e 100% de homologia com a sequência do banco semente. A sequência obtida do lote H3/BVT180002, apresentou 1 nucleotídeo divergente na posição A1035G, esta única modificação não alterou a sequência de aminoácidos do gene, sendo uma alteração silenciosa (figura A.6 do anexo A).

5 CONCLUSÃO

As glicoproteínas HA e NA são imunogênicas sendo que a proteção contra os vírus Influenza está intimamente relacionada com os níveis de anticorpos anti-HA e anti-NA. Os principais sítios antigênicos e imunogênicos destas proteínas já foram mapeados pela seleção de variantes com uso de anticorpos monoclonais, tanto da HA como da NA. Esta última contém quatro regiões antigênicas diferentes, sendo que a região 1, compreende o sítio ativo e apresentava-se conservada entre as cepas de Influenzavirus A e B, enquanto as demais (2, 3 e 4) apresentaram variações antigênicas ao longo dos anos (Webster et al., 1984). Assim, o monitoramento de possíveis alterações que ocorram nestas regiões ocasionadas por passagens em ovos embrionados durante o processo de produção devem ser monitoradas.

Com base nos resultados obtidos foi possível determinar que os Bancos analisados atenderam o critério de aceitação utilizado, sem a ocorrência de nenhuma alteração em sítios importantes, verificado, principalmente, na sequência de aminoácidos resultante da tradução, mantendo-se assim, estáveis.

REFERÊNCIAS

ALONSO, W. J.; VIBOUND, C.; SIMONSEN, L.; HIRANO, E. W.; DAUFENBACH, L. Z.; MILLER, M. A. **Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics.** Am J Epidemiol. 2007 Jun 15;165(12):1434-42. Epub 2007 Mar 16. PubMed. PMID: 17369609.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico: Situação Epidemiológica da SRAG-Influenza.** Brasília, DF, 2018. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/influenza/doc/informe_tecnico_anual_influenza2018.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informações Técnicas.** Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/gripe/informacoes-tecnicas>>.

CAINI, S. et al. Characteristics of seasonal influenza A and B in Latin America: Influenza surveillance data from ten countries. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174592>>.

CARNEIRO, M. et al. Influenza H1N1 2009: revisão da primeira pandemia do século XXI / H1N1 Influenza 2009: review of the first pandemic of the XXI century. Rev. AMRIGS; 54(2):206-213, abr.-jun. 2010. illus, tab, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Past pandemics. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/basics/past-pandemics.html>>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. How the Flu Virus Can Change: “Drift” and “Shift”. 2007. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>>.

COCKBURN, W. C.; DELON, P. J.; FERREIRA, W. ORIGIN AND PROGRESS OF 1968-69 HONG-KONG INFLUENZA EPIDEMIC. **Bulletin of the World Health**

Organization, v. 41, n. 3-5, p. 345-&, 1969. ISSN 0042-9686. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1969F656300001 >.

DAWOOD, F. S.; IULIANO, A. D.; REED, C. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study (vol 12, pg 687, 2012). **Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 9, p. 655-655, Sep 2012. ISSN 1473-3099. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000307916300008 >.

GARTEN, R. J. et al. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 197-201, Jul 2009. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000267802000046 >.

HARDY, C. T./ YOUNG, S. A.; WEBSTER, R. G.; NAEVE, C. W.; OWENS, R. J. Egg fluids and cells of the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs can select different variants of influenza A (H3N2) viruses. **Virology**. 1995 Aug 1; 221(1):302-6.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 129-+, Jan 2001. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166436100007 >.

HSIEH, Y. C. et al. Influenza pandemics: Past, present and future. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 105, n. 1, p. 1-6, Jan 2006. ISSN 0929-6646. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000236017700001 >.

JAWETZ, MELNICK & ADELBERG. Orthomyxoviruses (Influenza Viruses). In: BROOKS, G. F.; CARROL, K. .C; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Medical Microbiology**. 26. ed. Mc Graw Hill, 2013. P. 577-590.

KAWAOKA, Y.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. AVIAN-TO-HUMAN TRANSMISSION OF THE PB1 GENE OF INFLUENZA-A VIRUSES IN THE 1957 AND 1968 PANDEMICS. **Journal of Virology**, v. 63, n. 11, p. 4603-4608, Nov 1989. ISSN 0022-538X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1989AU74000016 >.

KILBOURNE, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 9-14, Jan 2006. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234419700003 >.

LAMB, R. A. e KRUG, R. M.: Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. Fields Virology. In Knipe D. M., Howley P. M. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

LIPATOV, A. S. et al. Influenza: Emergence and control. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 8951-8959, Sep 2004. ISSN 0022-538X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223386600001 >.

MATSUZAKI Y., et al. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. **J Virol**. 2014 Nov;88(21):12364-73. doi: 10.1128/JVI.01381-14.

MIYAKI, C. et al. Influenza vaccine production for Brazil: A classic example of successful North-South bilateral technology transfer. **Vaccine**, v. 29, p. A12-A15, Jul 2011. ISSN 0264-410X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292623100004 >.

Orthomyxoviridae - Negative Sense RNA Viruses - Negative Sense RNA Viruses (2011) - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2018. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/209/orthomyxoviridae>.

PALESE, P. Influenza: old and new threats. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. S82-S87, Dec 2004. ISSN 1078-8956. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000225733900004 >.

ROBERTSON, J. S.; NAEVE, C. W.; WEBSTER, R. G.; BOOTMAN, J. S.; NEWMAN, R.; SCHILD, G. C. Alterations in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. **Virology**, 1985 May; 143(1):166-74.

SIMONSEN, L. et al. Pandemic versus epidemic influenza mortality: A pattern of changing age distribution. **Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 1, p. 53-60, Jul 1998. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000074357900008 >.

SMITH, G. J. D. et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**, v. 459, n. 7250, p. 1122-U107, Jun 2009. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000267636700042 >.

SUN, W.; KANG, D. S.; ZHENG, A.; LIU, S. T. H.; BROECKER, F.; SIMON, V.; KRAMMER, F.; PALESE, P. Antibody Responses toward the Major Antigenic Sites of Influenza B Virus Hemagglutinin in Mice, Ferrets and Humans. **Jouna of Virology**. Jan 2019. 93 (2) e01673-18; DOI: 10.1128/JVI.01673-18.

TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. 1918 influenza: the mother of all pandemics. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 15-22, Jan 2006. ISSN 1080-6040. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234419700004 >.

TONG, S. et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. In: (Ed.). **PLoSPathog**, v.9, 2013. ISBN 1553-7366 (Print)1553-7374 (Electronic).

WANG, Q.; CHENG, F; LU, M.; TIAN, X.; MA, J. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. **J Virol**. 2008 Mar; 82(6):3011-20. DOI: 10.1128/JVI.02477-07.

WEBSTER, R. G.; BROWN, L. E.; LAVER, W. G. Antigenic and biological characterization of influenza virus neuraminidase (N2) with monoclonal antibodies. **Virology**, v. 135, n. 1, p. 30–42, 1984

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol Rev**, v. 56, n. 1, p. 152-79, Mar 1992. ISSN 0146-0749 (Print)0146-0749. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

WEBSTER, R. G.; GOVORKOVA, E. A. Continuing challenges in influenza. 2014. Ann

N Y Acad Sci. September; 1323(1): 115–139. DOI:10.1111/nyas.12462. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4159436/>>.

WILEY, D.C.; WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*, v. 289, n. 5796, p. 373-378, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pandemic H1N1 2009. Report of Regional Consultation on Pandemic H1N1 2009 and Strengthening Country Capacity for Pandemic Preparedness. Jul 2009. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205605/B4399.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pandemic H1N1 2009. Report of Regional Consultation on Pandemic H1N1 2009 and Strengthening Country Capacity for Pandemic Preparedness. Jul 2009. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205605/B4399.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 southern hemisphere influenza season. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201809_recommendation.pdf?ua=1>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 southern hemisphere influenza season. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201809_recommendation.pdf?ua=1>.

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14). Disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#432339277>>.

ANEXO A – Figuras de resultados dos alinhamentos de aminoácidos

Figura A.1 - Representação do alinhamento das seqüências de aminoácidos de HA, de Influenza A H1N1, dos lotes H1/BVT160002 e H1/BVT160002 e cepa referência (número de acesso KU933493.1). Apenas as alterações em relação à cepa referência estão indicadas. (*) indica *stop* códon, (-) indica fragmento não sequenciado.

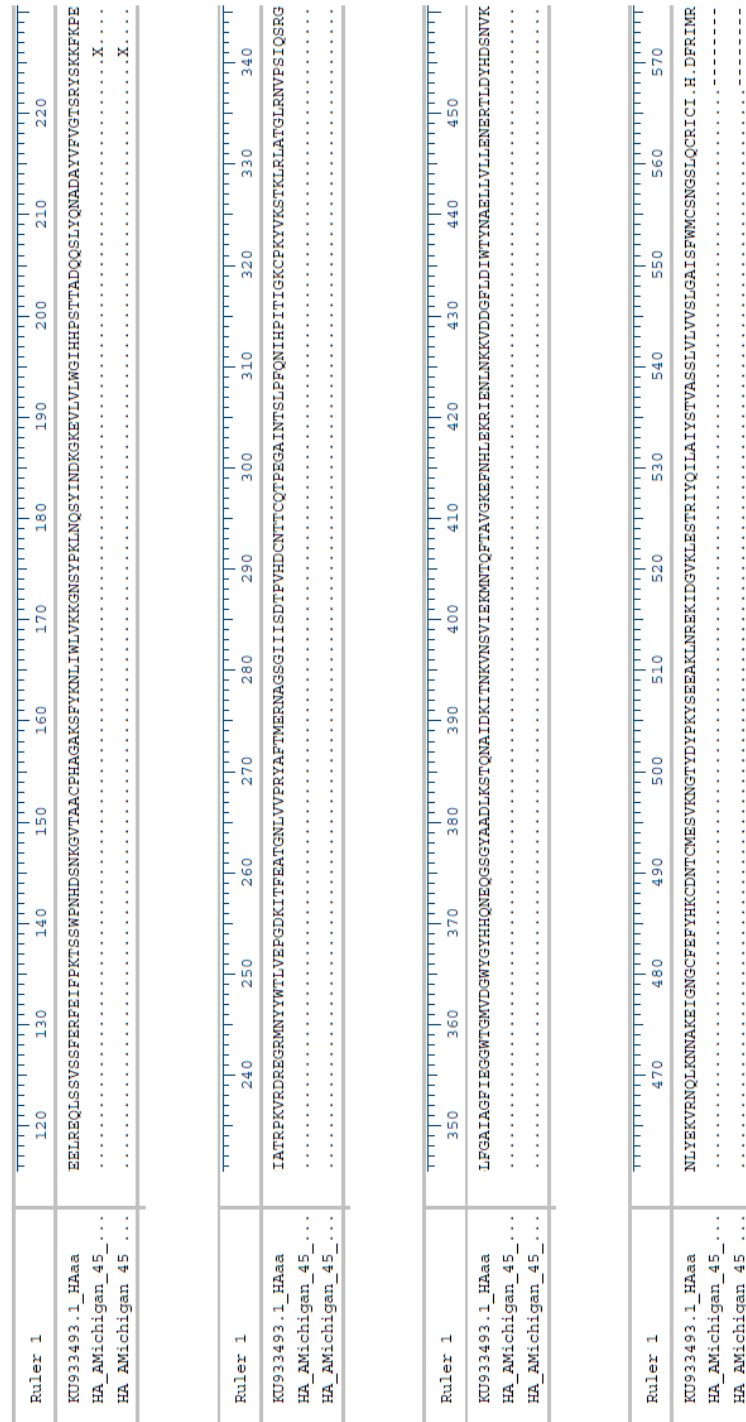


Figura A.2 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos de HA, de Influenza B, dos lotes B/BVT180001 e B/BVT160001 e cepa referência (número de acesso CY236600.1). Apenas as alterações em relação à cepa referência indicadas. (*) indica *stop* códon, (-) indica fragmento não sequenciado.

| | |
|--------------------|--|
| Ruler 1 | 1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 |
| CY236600.1Haaa.pro | MKAIIVLLMVTSSADRICTGITSNSPHVVKATQGEVNVTVGVIPLATTTKSHFANLKGTTETRGKLCPCINCTDLDVALGRPKCTGKIPSAVRSILHEVVPVTSQCFPIHDR |
| HA_IB_BVT180001 | |
| HA_IB_BVT_180002 | |
| Ruler 1 | 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 |
| CY236600.1Haaa.pro | TKIRQLNLLRGVYEHVRLSTHNVAEGAPGOPYKIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWVDPKNTATNPLTIEVYVCTEGEQITVWGFHSZDEIQMAKLYGDSKPKQKFTSSANG |
| HA_IB_BVT180001 |D.....D.....N.I.....N.I..... |
| HA_IB_BVT_180002 |D.....D.....N.I.....N.I..... |
| Ruler 1 | 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 |
| CY236600.1Haaa.pro | VTHVVSQIGGFNFQEDGGLPQSGRIVVDVMQKSGKTGITYQRGILLPQKWCASGRSKVIGKSLPLIGSEADCLHEKYGLINKSKPYTGEHAKAIGNCPVWVKPLKLANGT |
| HA_IB_BVT180001 | |
| HA_IB_BVT_180002 | |
| Ruler 1 | 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 |
| CY236600.1Haaa.pro | KYRPPAKLLKERFFGALAGFLEGGWEGMAGWHGYSHGAGVAADLAKSTQEAINKITKNLNSLSELVKNLQRLSGAMDELHNEILLELDEKVDLFRADTTISSQIELAVLLSN |
| HA_IB_BVT180001 | |
| HA_IB_BVT_180002 | |

Figura A.3 - Representação do alinhamento das seqüências de aminoácidos de HA, de Influenza A H3N2, dos lotes H3/BVT160002 e H3/BVT160003 e banco semente. Apenas as alterações em relação ao banco semente estão indicadas. (*) indica *stop* códon, (-) indica fragmento não sequenciado.

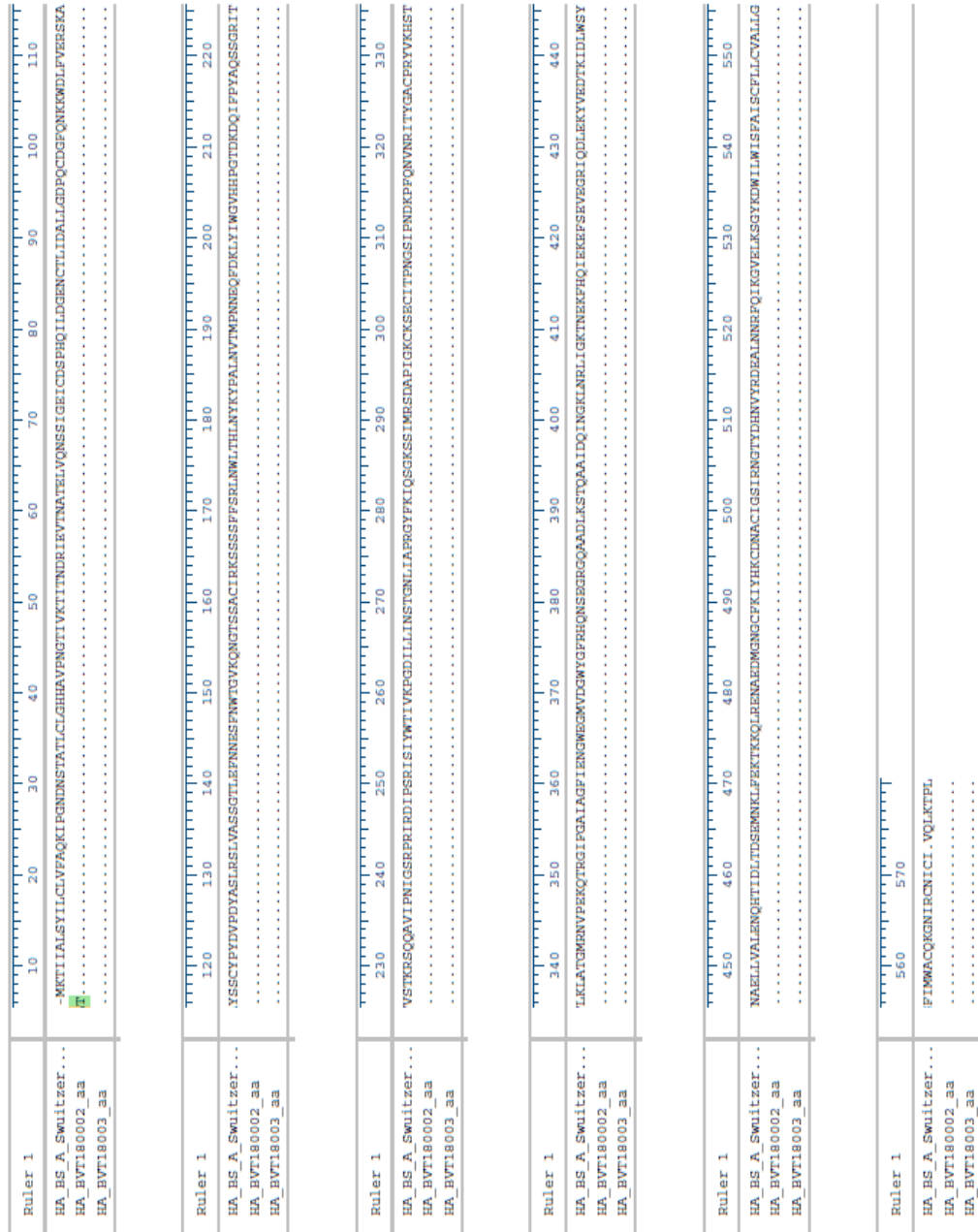


Figura A.4 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos de NA, de Influenza A H1N1, dos lotes H1/BVT160002 e H1/BVT160002 e cepa referência (número de acesso KY117025.1). Apenas as alterações em relação a cepa referência estão indicadas. (*) indica *stop* códon, (-) indica fragmento não sequenciado.

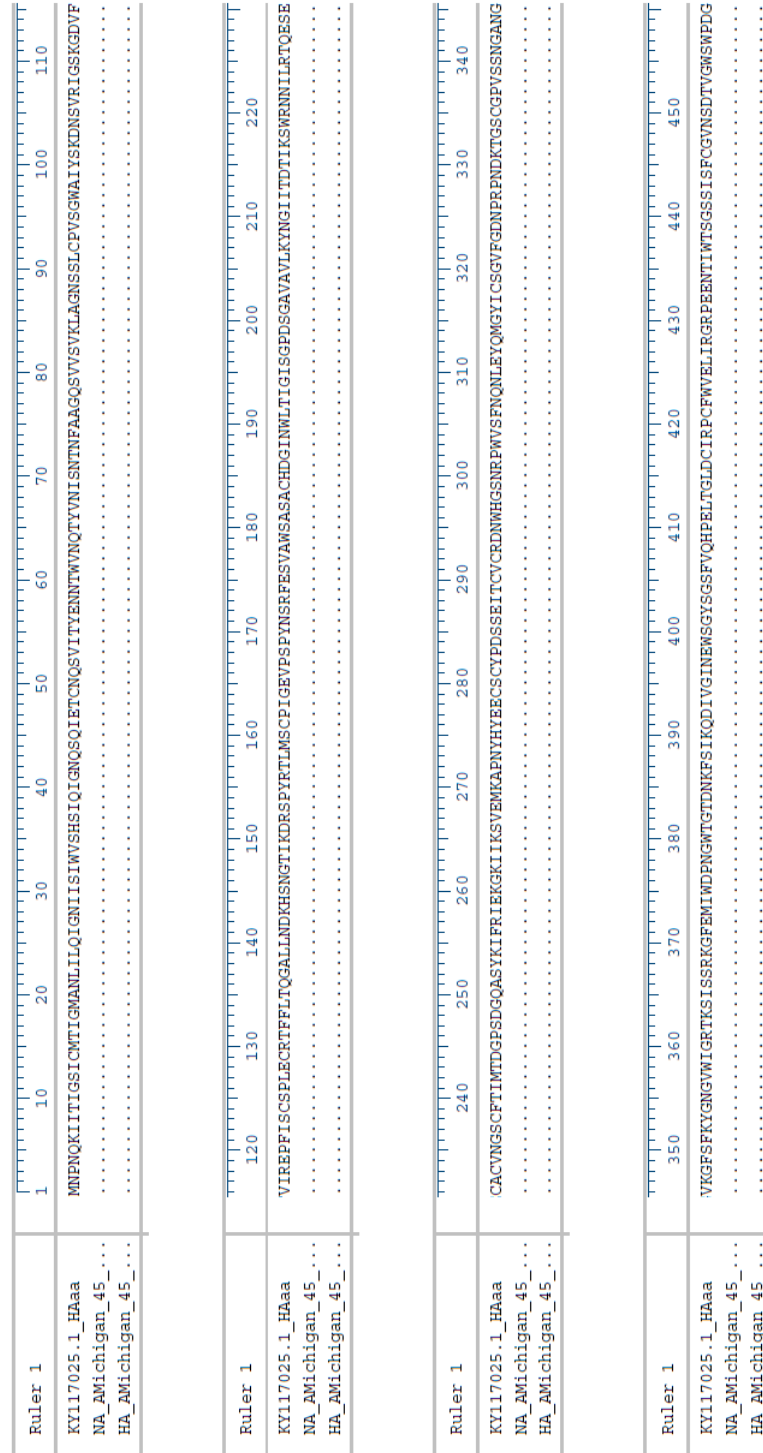


Figura A.5 - Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos de NA, de Influenza B, dos lotes B/BVT180001 e B/BVT160001 e cepa referência (número de acesso CY236601.1). Apenas as alterações em relação à cepa referência indicadas. (*) indica *stop* códon, (-) indica fragmento não sequenciado.

| | |
|----------------|--|
| Ruler 1 | 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 |
| CY236601_NAaa | EFFVACGNECKHFALTHYAAQGGYNGTRGRNKLRLHLSVKLGKIPVENSIFHMAAWSGSA |
| BVT180001_NAaa |K..... |
| BVT180002_NAaa | |
| Ruler 1 | 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 |
| CY236601_NAaa | GGNCYLMTDGSASGVSECRFLKIREGRLLKEIFPTGRVVKHTECTCGFASNKTI |
| BVT180001_NAaa | |
| BVT180002_NAaa | |
| Ruler 1 | 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 |
| CY236601_NAaa | KGGFVHQRMKSKI GRWYSRTMSOTERMGMGLYVKYGGDPWADSDALAFSGVMVSMK |
| BVT180001_NAaa |K..... |
| BVT180002_NAaa |K..... |
| Ruler 1 | TTT |
| CY236601_NAaa | AL. |
| BVT180001_NAaa | ... |
| BVT180002_NAaa | ... |

Figura A.6 - Representação do alinhamento das seqüências de aminoácidos de NA, de Influenza A H3N2, dos lotes H3/BVT160002 e H3/BVT160003 e banco semente. Apenas as alterações em relação ao banco semente estão indicadas. (*) indica *stop* códon, (-) indica fragmento não sequenciado.

