

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Thelma Fátima de Mattos Silva Oliveira

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS INFLUENZA
DETECTADOS EM CRIANÇAS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA
AGUDA, ATENDIDAS EM UBERLÂNDIA, MG, ENTRE 2001 E 2010

Uberlândia

2013

Thelma Fátima de Mattos Silva Oliveira

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS INFLUENZA
DETECTADOS EM CRIANÇAS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA
AGUDA, ATENDIDAS EM UBERLÂNDIA, MG, ENTRE 2001 E 2010

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Divina A. O. Queiróz

Co-orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Co-orientador: Dr. Fernando C. Motta

Uberlândia

2013

Thelma Fátima de Mattos Silva Oliveira

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS INFLUENZA
DETECTADOS EM CRIANÇAS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA
AGUDA, ATENDIDAS EM UBERLÂNDIA, MG, ENTRE 2001 E 2010

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para a
obtenção do título de doutor.

Uberlândia, 23 de abril de 2013

Banca Examinadora

Prof^ª Dr^ª Divina Aparecida Oliveira Queiróz - ICBIM/UFU

Prof^ª Dr^ª Divina das Dôres de Paula Cardoso – IPTSP/ UFG

Prof^ª Dr^ª Fabíola Souza Fiaccadori – IPTSP/UFU

Prof. Dr. Orlando Cesar Mantese - FAMED/UFU

Prof. Dr. Wyller Alencar de Mello – IEC/PA

Agradecimentos

À Deus, que me deu forças físicas e espirituais para realizar este trabalho e que me guiou nos momentos de incertezas.

À minha mãe pela presença, sempre, em todas as etapas da minha vida.

Ao meu pai, onde quer que esteja, sempre estará presente no meu coração.

À minha família querida, Ronaldo e Vitória, que vivenciaram ao meu lado todos os momentos, obrigada pelo carinho, pela força para que eu pudesse trilhar esse caminho e pela compreensão da minha presença ausente.

À Prof^a Divina Queiróz, a quem admiro e respeito, além de tudo, amiga para todas as horas. Com seu jeito único de ser, me ensinou desde partículas virais até o gosto pela pesquisa e a dedicação ao trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Jonny, pela atenção, empenho e pelas sugestões tão pertinentes, que foram fundamentais para o andamento deste trabalho.

Ao Dr. Fernando Motta, meu co-orientador, pelas sugestões e viabilização dos reagentes e das cepas padrão.

Ao Lourenço F. Costa, ao Lucas Zimon e ao Guilherme O. Freitas, que além do trabalho em equipe, construímos uma amizade. Obrigada pelo auxílio, incentivo e companheirismo nos anos de convívio no Laboratório de Virologia.

À Aline Tolardo, obrigada por tornar os dias mais felizes.

Aos alunos Paulo Guilherme e Cynthia Silva, que contribuíram na detecção e tipagem dos vírus influenza por RT-PCR.

Aos amigos do Laboratório de Virologia: Nayhane, Bruno, Rafaella, Heber, Edigar, Victor, Loiane, Lorraine, Flávia e Prof^a Juliana por compartilharem as alegrias e dificuldades encontradas até o presente momento.

Aos membros da banca de defesa da tese, Prof^a Dr^a Divina das Dôres de Paula Cardoso, Prof^a Dr^a Fabíola Souza Fiaccadori, Prof. Dr. Orlando Cesar Mantese, Prof. Dr. Wyller Alencar de Mello; e da qualificação, Prof^a Dr^a Eloisa Amália Vieira Ferro, Prof^a Dr^a Valéria Bonetti e Prof^a Dr^a Yara Cristina de Paiva Maia, por todas as sugestões e contribuições.

Ao pediatra Dr. Hélio Lopes da Silveira por sua dedicação, apoio e empenho na seleção dos pacientes no HC e na análise das fichas clínicas.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da coleta e processamento dos espécimes clínicos.

À minha filha Vitória pelo auxílio na digitação de algumas páginas desta tese.

Aos responsáveis pelos laboratórios de Genética Molecular/INGEB/UFU e Fisiologia/ICBIM/UFU, que gentilmente nos disponibilizaram equipamentos e espaço físico.

Ao João Paulo e a Tamiris do Laboratório de Genética Molecular, pelas reações de sequenciamento.

Aos responsáveis pelos laboratórios de Parasitologia e Imunologia do ICBIM/UFU por disponibilizarem gavetas nos ultrafreezers para o armazenamento das amostras clínicas.

Aos amigos e membros da família, obrigada pelo apoio, mesmo que distantes.

Às secretárias do PPIPA, Luceleide Damásio e Lucélia Assis pela amizade, presteza e pela colaboração de vocês sempre que precisei.

Ao Laudo Laboratório Avícola Uberlândia Ltda, que abriu as portas, para que pudéssemos realizar os ensaios em ovos embrionados de galinha, na tentativa de isolar os vírus.

Ao Rogério e ao Gustavo Ferraz pelo empenho e dedicação durante os experimentos no Laudo Laboratório.

Às agências de fomento, CNPq e Fapemig, pelo suporte financeiro.

Aos pacientes que participaram deste estudo. A eles o meu eterno respeito e gratidão.

A todos aqueles que participaram da minha vida e que, de uma forma ou de outra, contribuíram para esta empreitada, **MUITO OBRIGADA.**

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota d’água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

Resumo

Considerando o impacto que as diferentes variantes dos vírus influenza causam à saúde pública, o presente estudo teve como objetivos detectar e caracterizar molecularmente esses vírus, em casos de doença respiratória aguda em crianças menores de cinco anos de idade, atendidas em Uberlândia, MG. Foram analisados 605 aspirados de nasofaringe coletados entre 2001 e 2010. Os vírus influenza foram detectados em 40 (6,6%) amostras, sendo 39 do tipo A e uma do tipo B, de casos que ocorreram entre fevereiro e setembro. O percentual das crianças com gripe atendidas em ambulatórios foi maior do que o das hospitalizadas, sendo que os casos que requereram internação apresentaram mediana de quatro meses de idade. Por meio da RT-PCR, os vírus do tipo A foram caracterizados em subtipos, sendo que o subtipo H3N2 foi o mais prevalente. Os subtipos H1N1 e H1N2 também foram detectados. Comparando-se as sequências deduzidas de aminoácidos da hemaglutinina às sequências das cepas utilizadas nas vacinas disponibilizadas, nos mesmos períodos, observou-se que os sítios de ligação com o receptor foram preservados, apesar de terem sido observadas, em alguns casos, substituições, porém, por aminoácidos similares. As sequências da neuraminidase não mostraram alterações importantes nos sítios antigênicos. O vírus influenza B foi caracterizado como sendo da linhagem Victoria, enquanto que a cepa vacinal utilizada no mesmo ano (2002) foi a da linhagem Yamagata. Os vírus do subtipo H3N2 mostraram importantes alterações nos sítios antigênicos e aqueles detectados entre 2001 e 2003 apresentaram menor identidade na sequência de nucleotídeos em relação à cepa vacinal. Esse resultado sugere que a circulação dessas variantes virais não foi afetada pela vacinação na época. Dessa forma, um monitoramento precoce sobre as variantes em circulação no país ou em uma região pode fornecer informações importantes sobre a eficácia da vacina que será administrada naquela temporada.

Palavras-chave: Vírus influenza. Crianças. RT-PCR. Sequenciamento. Hemaglutinina. Neuraminidase.

Abstract

Influenza remains a major health problem due to the seasonal epidemics that occur every year caused by the emergence of new virus strains. Therefore, this study aimed to identify and to characterize molecularly the influenza viruses from cases of acute respiratory disease in children less than five years of age in Uberlândia, MG. For this purpose, 605 nasopharyngeal aspirates were collected between 2001 and 2010. Influenza virus was detected in 40 (6.6%) samples, 39 were of type A and one of type B, from cases that occurred between February and September. The percentage of children with influenza attended at ambulatory pediatrics was higher than hospitalized, and the cases that required hospitalization had a median of four months old. The type A viruses were further characterized in subtypes by RT-PCR, and the H3N2 subtype was the most prevalent. Deduced amino acid sequence analysis of partial hemagglutinin sequence indicated that, compared to strains sequences used in the vaccines provided in the same periods, the receptor binding sites were preserved, although substitutions with similar amino acids in these sites were observed in few cases. The neuraminidase sequences did not show significant changes, i.e., in the antigenic sites. The influenza B virus was characterized as Victoria lineage, whereas the vaccine strain used in the same year (2002) belonged to the Yamagata lineage. The subtype H3N2 viruses showed substantial changes in antigenic sites and those detected between 2001 and 2003 also presented lower identity in nucleotide sequences compared to the sequence of the vaccine strain. These results suggest that viral variants that circulated in those seasons were not affected by the vaccination. Thus, an early monitoring of variants circulating in the country or in a region may provide important information about the probable efficacy of the vaccine that will be administered in the season.

Keywords: Influenza virus. Children. RT-PCR. Sequencing. Hemagglutinin. Neuraminidase.

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

°c - graus Celcius

μl - microlitro (10^{-6} litro)

ANF - aspirado de nasofaringe

AS - ácido siálico

BAPA - *benzylsulfonyl-d-arginine-proline-4-amidinobenzylamide*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CC - cultura de células

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

DEPC - dietilpirocarbonato

DNA - ácido dextrorribonucleico

dNTP - *deoxyribonucleotide triphosphates* (desoxirribonucleotídeos trifosfatos)

DMSO - dimetilsulfóxido

DRA - doença respiratória aguda

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EIA - ensaio imunoenzimático

ENF-Ped - enfermagem de pediatria

HA - hemaglutinina

HPAI - *Highly Pathogenic Avian Influenza* (vírus influenza de alta patogenicidade)

IFI - imunofluorescência indireta

LPAI – *Low Pathogenic Avian Influenza* (vírus influenza de baixa patogenicidade)

M – molar

mL - mililitro (10^{-3} litro)

μ L - microlitro (10^{-6} litro)

mM - milimolar (10^{-3} molar)

M1 - proteína de matriz

M2 - proteína de canal de íons

NA - neuraminidase

ND - não determinado

nm - nanômetro

NP - nucleoproteína

NS1 e NS2 - proteínas não estruturais

nt - nucleotídeos

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAP - pronto atendimento pediátrico

pb - pares de base

PCR – polimerase chain reaction

pH - potencial hidrogeniônico

PM - peso molecular

pmol - picomol (10^{-12} moles)

PA, PB1 e PB2 - polimerases

PBS - *phosphate-buffered saline* (solução-tampão salina de fosfatos)

PS-Ped - pronto-socorro de pediatria

RNA - ácido ribonucleico

RNAc - RNA complementar

RNAm - RNA mensageiro

RNA_v - RNA viral

RNP - complexo da ribonucleoproteína

rpm - rotações por minutos

RT-PCR - *reverse transcription of polymerase chain reaction* (transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase)

SEBER - setor de berçário

SLN - sinais de localização nuclear

U – unidade

UAI - Unidade de Atendimento Integrado

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

UTI - Neo - unidade de terapia intensiva neonatal

UTI - Ped - unidade de terapia intensiva pediátrica

Aminoácidos

Nome	Abreviação
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Aspartato ou ácido aspártico	D
Cisteína	C
Fenilalanina	F
Glicina ou glicocola	G
Glutamato ou ácido glutâmico	E
Glutamina	Q
Histidina	H

Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Prolina	P
Serina	S
Tirosina	Y
Treonina	T
Triptofano	W
Valina	V

Bases nitrogenadas dos nucleotídeos

Nome	Abreviação
Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 - Ilustração esquemática da transmissão entre espécies do vírus influenza A	23
Fig.2 - Eletromicrografia do vírus influenza.....	24
Fig.3 - Representação esquemática de um vírion	25
Fig.4 - Diagrama esquemático da estrutura do vírus influenza A.....	26
Fig.5 - Estrutura antigênica da HA dos vírus influenza A e B.....	28
Fig.6 - Ciclo de replicação do vírus influenza A.....	31
Fig.7 - Mapa da localização aproximada dos <i>primers</i> para amplificação do gene da HA.....	48
Fig.8 - Mapa da localização aproximada dos <i>primers</i> para amplificação do gene da NA.....	49
Fig.9 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da <i>nested-PCR</i>	55
Fig.10 - Distribuição dos casos de influenza detectados em Uberlândia de 2001 a 2010 conforme a faixa etária.....	56
Fig.11 - Distribuição mensal dos casos de influenza em Uberlândia de 2001 a 2010.....	56
Fig.12 - Distribuição dos tipos/subtipos dos vírus influenza identificados no estudo, conforme o ano de coleta.....	57
Fig.13 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do domínio HA1 dos vírus H1N2 e H1N1.....	62
Fig.14 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do domínio HA1 dos vírus H3N2 detectados entre 2001 e 2003.....	63
Fig.15 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do domínio HA1 dos vírus H3N2 detectados em 2004.....	64
Fig.16 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do domínio HA1 do vírus H3N2 detectado em 2005.....	65
Fig.17 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do domínio HA1 do vírus H3N2 detectado em 2006.....	65
Fig.18 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do domínio HA1 do vírus H3N2 detectado em 2007.....	66
Fig.19 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do domínio HA1 do vírus B detectado em 2002.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos oligonucleotídeos utilizados.....	46
Tabela 2 - Cepas dos vírus influenza recomendadas para composição das vacinas entre 2001 e 2007.....	51
Tabela 3 - Dados demográficos sobre os pacientes e os espécimes clínicos positivos para o vírus influenza e isolados com maior identidade no segmento sequenciado da HA e da NA.....	53
Tabela 4 - Comparação da sequência de N1 do vírus influenza A com cepa vacinal.....	67
Tabela 5 - Comparação das sequências de N2 do vírus influenza A com cepas vacinais.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Considerações gerais	17
1.2 Histórico	20
1.2.1 Pandemias.....	21
1.3 Classificação, estrutura e replicação.....	22
1.3.1 Classificação.....	22
1.3.2 Estrutura viral	24
1.3.3 Replicação	29
1.4 Variação antigênica	31
1.5 Patogênese e características clínicas.....	33
1.6 Epidemiologia.....	34
1.7 Diagnóstico laboratorial	37
1.8 Prevenção e tratamento.....	39
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 Objetivo principal.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 População de estudo	43
3.2 Espécimes clínicos.....	43
3.2.1 Coleta.....	43
3.2.2 Processamento	44
3.3 Teste de imunofluorescência indireta	44
3.4 Extração do RNA viral	44
3.5 Reação de amplificação por RT-PCR.....	45
3.5.1 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	45

3.5.2 Reação de amplificação do gene HA.....	47
3.5.3 Reação de amplificação do gene NA.....	48
3.6 Eletroforese em gel de agarose.....	49
3.7 Purificação dos produtos de PCR.....	49
3.8 Sequenciamento nucleotídico e análise.....	50
3.9 Edição, alinhamento das sequências e análise de nucleotídeos.....	50
3.9 Análise estatística.....	51
4. RESULTADOS.....	52
4.1 Triagem dos vírus influenza A e B.....	52
4.2 Caracterização molecular dos vírus influenza tipos A e B.....	52
4.3 Análise comparativa dos genes da hemaglutinina e da neuraminidase do vírus influenza.....	57
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Doenças respiratórias agudas (DRA) acometem indivíduos de ambos os gêneros e de diferentes idades em todo o mundo. Dentre os principais agentes responsáveis pelas DRA, os vírus influenza têm sido investigados devido a sua importância em termos de morbidade e também de mortalidade, particularmente em idosos, crianças e em indivíduos com comprometimento cardíaco, pulmonar e da função imune (COX; SUBBARAO, 1999; BRINKHOF *et al.*, 2006). A facilidade de transmissão desses vírus, assim como as altas taxas de mutação nos antígenos de superfície - hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) - são responsáveis pelo aparecimento de surtos anuais, que variam dependendo de fatores como a virulência da cepa, a presença de imunidade prévia, a intensidade da exposição ao vírus e, provavelmente, fatores genéticos e ambientais, que afetam a transmissão de pessoa-pessoa (CARRAT; FLAHAULT, 2007; MEMARZADEH, 2011).

A gripe, doença causada por esse patógeno, de caráter agudo, febril e foi responsável por dizimar grande parte da população, por muitos séculos. De acordo com achados históricos, as pandemias já apareciam em intervalos, desde os tempos antigos (SCHOLTISSEK, 1994; HORIMOTO; KAWAOKA, 2005). Estudos de soroprevalência indicam que a maioria dos indivíduos até seis anos de idade já teve pelo menos uma infecção pelo vírus influenza (SAUERBREI *et al.*, 2009).

Em países industrializados, a maioria das hospitalizações é de crianças mais novas e de idosos (≥ 65 anos), porém indivíduos de todas as idades são afetados pela doença. As crianças desempenham um papel importante como disseminadoras, transmitindo esses vírus para os adultos e os idosos, que podem ser vulneráveis a infecção devido à ausência de imunidade contra novas cepas (LUI; KENDAL, 1987).

Apesar da disponibilidade anual de vacinas, a cada ano a gripe atinge até 15% da população mundial e responde por cerca de 250.000 a 500.000 mortes (OMS, 2003). Considerando o absenteísmo ao trabalho, à escola e as despesas médicas diretas, o impacto econômico anual devido à gripe, em alguns países, tem sido estimado na ordem de 12-14 bilhões de dólares (SZUCS, 1999; MONTO, 2000; NEUZIL; HOHLBEIN; ZHU, 2002).

Um dos aspectos mais importantes desses vírus refere-se à capacidade adaptativa em decorrência da elevada taxa de mutação, propiciando sua manutenção em animais e humanos, em razão de pressões imunológicas e, conseqüentemente, demandando uma constante vigilância epidemiológica (LAVANCHY; GAVINIO, 2001; FERGUSON; GALVANI; BUSH, 2003; HOLMES, 2003; MOYA *et al.*, 2004). Questões sobre quando, como e até que ponto o vírus irá se alterar e se propagar globalmente, ainda não foram totalmente elucidadas, apesar do crescente avanço nas pesquisas sobre a gripe. Além disso, não se sabe exatamente se as epidemias acontecem em decorrência de uma persistência local ou ainda se são provenientes de outras regiões (NELSON *et al.*, 2007; RUSSELL *et al.*, 2008b).

Os programas de vacinação constituem a principal intervenção preventiva em saúde pública contra as infecções por esses vírus (ESPOSITO *et al.*, 2003). Atualmente o público alvo a ser vacinado no Brasil, inclui os maiores de 60 anos de idade, os trabalhadores da saúde, as crianças entre seis meses e dois anos de idade, as gestantes, os povos indígenas, os pacientes com comorbidades e a população presidiária (BRASIL, 2012); conseqüentemente, os lactentes continuam sendo o grupo etário mais vulnerável.

Quanto à detecção dos vírus influenza, um diagnóstico rápido e adequado é imprescindível no contexto epidêmico (DWYER *et al.*, 2006, MACKAY *et al.*, 2008). Apesar de métodos de imunofluorescência indireta (IFI) serem aplicados de rotina, métodos moleculares têm se mostrado mais efetivos na detecção desses patógenos (HERRMANN; LARSSON; ZWEYGBERG, 2001; ELLIS; ZAMBON, 2002; DWYER *et al.*, 2006). Neste sentido, com a aplicação da transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), tem sido possível detectar e subtipar os vírus influenza a partir de amostras clínicas (STOCKTON *et al.*, 1998).

Diante do exposto, a identificação e a caracterização de diferentes tipos e subtipos, bem como o sequenciamento genético dos vírus influenza circulantes na região de Uberlândia, constitui importante ferramenta epidemiológica em termos de um monitoramento desses agentes.

De 2001 a 2004, o Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia investigou a presença dos vírus influenza em amostras de nasofaringe de crianças, com doença respiratória aguda, atendidas em unidades de saúde pública de Uberlândia, MG, pela técnica de imunofluorescência indireta (COSTA *et al.*, 2006). Objetivando aprofundar a pesquisa sobre esses vírus, acrescentou-se a tipagem e a

subtipagem pela RT-PCR, além do sequenciamento nucleotídico das variantes virais encontradas.

1.2 Histórico

A doença respiratória aguda conhecida como gripe, altamente contagiosa, parece ter afligido os seres humanos desde os tempos antigos. A primeira descrição científica de uma doença identificada como influenza foi feita por Hipócrates no ano 412 a.C. (KAPLAN; WEBSTER, 1977 apud MURPHY; WEBSTER, 1996). Posteriormente, durante a Idade Média, foram descritos vários episódios de infecções compatíveis com as causadas pelo vírus influenza. Na América, o primeiro relato de uma síndrome respiratória grave ocorreu em Texcoco (México) em 1552, que se denominou peste catarral. Em 1580, na Itália, sucedeu-se a primeira pandemia reconhecida, descrita como “influência planetária”, pela associação entre os sinais clínicos dessa virose com fenômenos astrais observados, e de onde se derivou o nome atual de influenza (MURPHY; WEBSTER, 1996; VIESCA, 1996 apud GARCÍA-GARCÍA; RAMOS, 2006).

Em 1933, os pesquisadores Wilson Smith, Christopher Andrewes e Patrick Laidlow isolaram o vírus influenza humano e então, a partir desta data, a história dessa infecção pôde ser registrada e confirmada por diagnóstico laboratorial. Posteriormente este vírus ficou conhecido como influenza A. A primeira vacina contra gripe foi preparada a partir de vírus inativado replicado em células pulmonares de camundongos em 1936 e depois em ovos embrionados de galinha (KUSZEWSKI; BRYDAK, 2000).

Já em 1940 foi encontrado um novo vírus (B/Lee/40) com características estruturais semelhantes e antigenicamente diferente do influenza A, que denominou-se influenza tipo B (FRANCIS, 1940).

Após a observação de Hirst (1941), que os vírus da gripe aglutinavam hemácias de galinha, a técnica de hemaglutinação foi amplamente utilizada para detecção de antígeno viral ou dosagem de anticorpos em soros de pacientes.

E em 1950 Taylor isolou o vírus influenza tipo C (TAYLOR, 1951 apud LAMB; KRUG, 2001).

1.2.1 Pandemias

Dentre as pandemias que ocorreram nos últimos 400 anos, investigações têm mostrado que a maioria delas teve início na Ásia (KUSZEWSKI; BRYDAK, 2000). Assim, surtos epidêmicos e pandêmicos ocasionados em especial pelos vírus influenza do tipo A têm sido relatados ao longo das décadas com constante alternância de cepas, dentre as quais se mencionam os subtipos originários de cepas aviárias, tais como: H1N1, causadora da gripe espanhola (1918-1919), responsável mundialmente pela morte de 20 a 40 milhões de pessoas - cerca de 2 a 5% da população mundial; H2N2, responsável pela gripe asiática (1957); H3N2, causadora da gripe de Hong-Kong (1968-1969). Supõe-se que mudanças em pontos-estratégicos na sequência da H3 teriam propiciado o surgimento de variantes emergentes que possibilitaram sua evasão do sistema imune (BOTH *et al.*, 1983); H5N1 e H9N2, responsáveis por surtos de gripe originado em aves em Hong-Kong (1997 e 1999, respectivamente), indicando um possível rearranjo entre cepas (KAWAOKA; KRAUSS; WEBSTER, 1989; GUAN *et al.*, 1999; STEVENS *et al.*, 2004). Em 2003, novos surtos foram registrados, em Hong-Kong, provocado pelas cepas H5N1 e H9N2, e na Holanda pela cepa H7N7. Já em 2004, foram registrados surtos pelas cepas H7N3 no Canadá e H5N1 em alguns países do sudeste asiático, onde se suspeitou que aves selvagens tivessem contribuído para a manutenção e disseminação do vírus para humanos (LI *et al.*, 2004). A disseminação da infecção pelo H5N1 no homem se estendeu até 2007 causando grave epidemia na Ásia e na África (COUCEIRO; ALBUQUERQUE, 2008) e respondendo por mais de 370 mortes de 2003 até o momento (WHO, 2013a).

A relação de proximidade do homem com outros animais e a elevada taxa de mutação e rearranjos do genoma viral entre cepas de diferentes animais têm sido a causa do surgimento de cepas acentuadamente patogênicas para o homem (CLAAS *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2008b). Em 2009, um novo subtipo de vírus influenza A H1N1 pandêmico (derivado de um triplo rearranjo entre cepas do vírus tipo A de humanos, suínos e aves da Eurásia), emergiu no hemisfério norte e se espalhou rapidamente entre humanos em todo o mundo, respondendo por um elevado número de óbitos, inclusive no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2009; SCALERA; MOSSAD, 2009).

Apesar do impacto causado pelas três maiores pandemias (1918, 1957 e 1968) foi estimado que as epidemias anuais causadas pelos vírus influenza A H1N1, H3N2 e

vírus influenza B ao longo dos últimos 100 anos tiveram um impacto acumulado, ainda maior (WEBSTER *et al.*, 1992; HAY *et al.*, 2001).

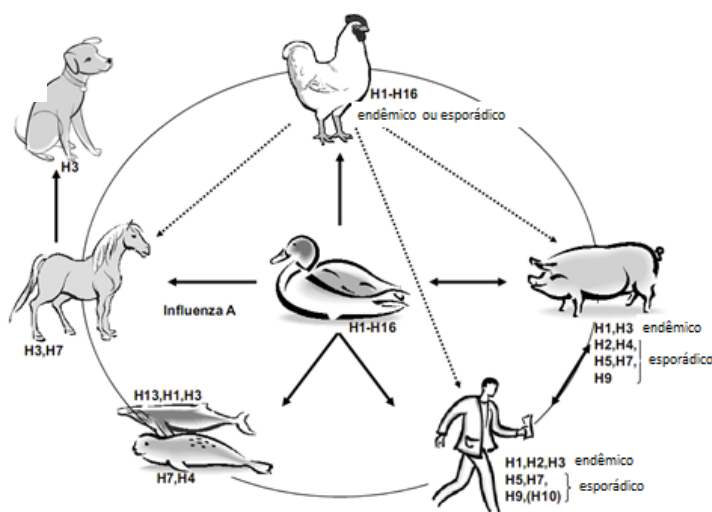
1.3 Classificação, estrutura e replicação

1.3.1 Classificação

Os vírus influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* (*orthos* - original; *myxa* - muco), composta por seis gêneros: *Influenzavirus A, B e C, Thogotovirus e Isavirus, Quaranjavirus* (ICTV, 2012). Os três primeiros gêneros correspondem as espécies dos vírus influenza tipos A, B e C, respectivamente, que apresentam importância clínica para os seres humanos. Esses agentes virais são classificados em A, B e C baseando-se nas diferenças antigênicas de suas nucleoproteínas (NP) e proteínas de matriz (M1) (MURPHY; WEBSTER, 1996). O vírus do tipo A ainda é classificado em subtipos de acordo com suas duas glicoproteínas de superfície - HA e NA. Este tipo viral infecta humanos, cavalos, porcos e outros mamíferos e aves (de la BARRERA; REYES-TERAN, 2005). Os hospedeiros naturais dos vírus influenza A são as aves aquáticas, dos quais já foram identificados 16 subtipos virais de HA (H1-H16) e nove subtipos virais de NA (N1-N9), porém, dentre esses, apenas três subtipos de HA (H1, H2, H3) e dois de NA (N1 e N2) vêm causando doença sustentada em humanos desde o século passado (FOUCHIER *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007). Recentemente foi descrito o 17º subtipo viral em morcegos da Guatemala (TONG *et al.*, 2012). Nas aves, os vírus do tipo A normalmente não provocam doença e se replicam na maioria das vezes em células do trato gastrointestinal e são excretados em altos níveis pelas fezes (WEBSTER *et al.*, 1978). Não obstante Esses podem vírus ser divididos em dois grupos conforme sua patogenicidade e virulência. Os mais virulentos, que causam gripe aviária altamente patogênica (HPAI - *Highly Pathogenic Avian Influenza*), com mortalidade próxima a 100%, têm sido restritos aos subtipos H5 e H7, embora nem todos os subtipos H5 e H7 do vírus causam HPAI. Os outros subtipos virais causam uma doença mais suave, principalmente respiratória, sendo pouco patogênicos para as aves (LPAI – *Low Pathogenic Avian Influenza*). Até recentemente os vírus HPAI foram raramente encontrados em aves selvagens, mas, para os vírus LPAI, taxas de detecção extremamente altas foram registradas em estudos de vigilância entre patos, gansos e outras espécies. Cepas de vírus aviários são geralmente transmitidas entre as aves

através da via fecal-oral, mas acredita-se que a transmissão para os seres humanos ocorra, sobretudo através do contato direto de secreções de aves infectadas com a mucosa respiratória humana (CDC, 2005). Os vírus LPAI dos subtipos H1 e H3 aviários têm sido encontrados também em suínos. Estes na sua maioria são recombinantes, contendo genes de cepas aviárias, suínas e humanas. Isso suporta o clássico conceito de que os suínos são susceptíveis aos vírus humanos e aos aviários, atuando como hospedeiros intermediários para esses vírus antes da emergência em humanos. Entretanto, a transmissão entre espécies não humanas dos vírus influenza A por si só não é suficiente para iniciar uma pandemia de gripe humana e ainda os vírus de origem animal devem sofrer grandes mudanças genéticas para se estabelecer na população humana. (VAN REETH, 2007). Estudos sobre o vírus influenza A têm demonstrado que a prevalência de transmissão interespecie depende da espécie animal, sendo as aves aquáticas a fonte principal desses vírus (figura 1) (WEBSTER *et al.*, 1992).

Figura 1 - Ilustração esquemática da transmissão entre espécies do vírus influenza A.



Fonte: adaptado de KALTHOFF; GLOBIG; BEER, 2010.

Diferentemente dos vírus influenza A, os influenza B evoluem em ritmo mais lento e não se tem informação da identificação de subtipos de HA e NA. Os vírus influenza B infectam os humanos causando epidemias moderadas e os sintomas são geralmente pouco evidentes, tendo sido também encontrados em focas e cavalos (OSTERHAUS *et al.*, 2000; ACHA; SZYFRES; 2003). Os vírus C são relativamente menos importantes para os humanos quando comparados aos tipos A e B. Também já

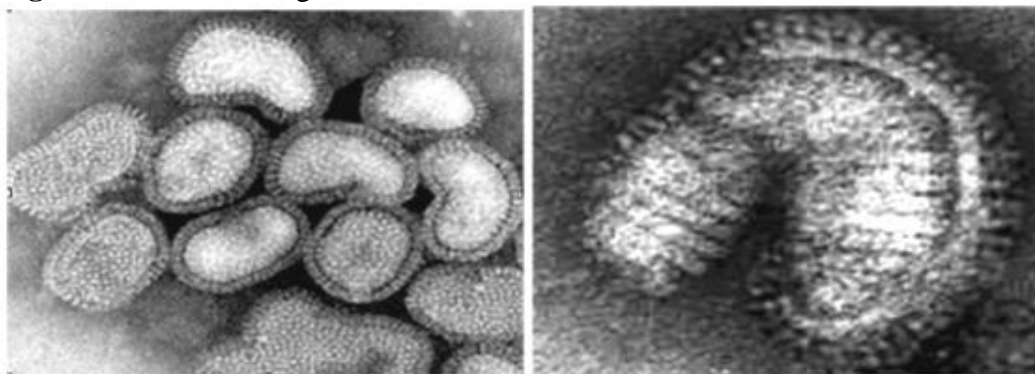
foram detectados em porcos (YUANJI *et al.*, 1983). Possui genoma bastante estável, com baixa taxa de mutação e dificilmente causa sintomas ou, quando ocorrem, são geralmente mais brandos - limitados ao trato superior (de la BARRERA; REYES-TERAN, 2005; MATSUZAKIA *et al.*, 2012).

As diferentes cepas virais são denominadas de acordo com seu tipo, com a espécie da qual foi isolada (omitida se humana), com a localização geográfica, o número e o ano de detecção, e, no caso dos influenza A, os subtipos de acordo com a HA e a NA (PALESE; SHAW, 2007). Assim sendo, a denominação de uma amostra do vírus influenza A que possui HA3 e NA2, por exemplo, é comumente conhecida como H3N2 (WRIGHT; WEBSTER, 2001).

1.3.2 Estrutura viral

Os vírus influenza são pleomórficos em tamanho e morfologia (figura 2), com diâmetro variando entre 80-120 nm, apresentando grandes projeções (espículas) de HA e NA na superfície viral, que também abriga a proteína M2. A respeito das espículas, tem sido estimado que as mesmas encontram-se numa proporção de 5:1 (HA: NA) por partícula viral (RUIGROK *et al.*, 1984), podendo ocorrer variação em algumas cepas mutantes ou em rearranjos virais (KILBOURNE; JOHANSSON; GRAJOWER, 1990).

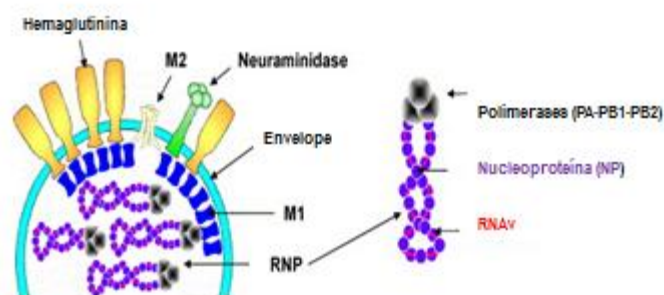
Figura 2 - Eletromicrografia do vírus influenza



Fonte: MARTINS, 2001.

Logo abaixo do envelope, localiza-se a proteína de matriz M1 e na porção mais interna encontra-se o core da partícula viral, composto pelo complexo da ribonucleoproteína (RNP), que contém os segmentos de ácido ribonucleico (RNA), as polimerases PA, PB1 e PB2 e a nucleoproteína (NP) (figura 3). As proteínas NS1 e NS2 se localizam no núcleo da célula infectada, onde a replicação do vírus ocorre.

Figura 3 - Representação esquemática de um vírion com detalhe da ribonucleoproteína do vírus influenza.



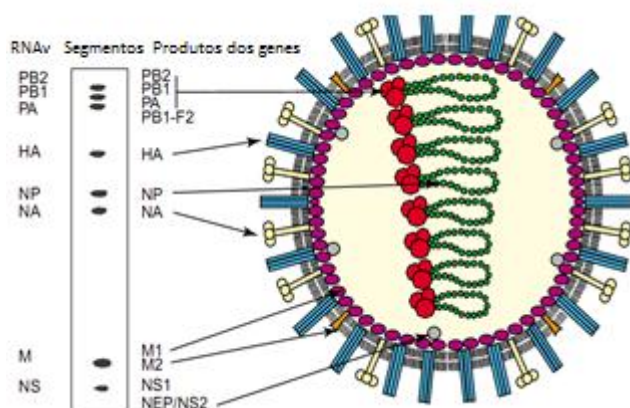
Fonte: adaptado de BOULO *et al.*, 2007

Esses vírus se apresentam de forma esférica, quando são cultivados repetidas vezes em ovos e ou células, ou na forma filamentosas em isolados clínicos recentes (CHOPPIN; MURPHY; TAMM, 1960). Tem sido especulado que as partículas filamentosas são as responsáveis pela transferência viral entre células, enquanto que as de forma esférica são incorporadas em gotículas de secreção dos aerossóis respiratórios e, portanto, responderiam pela transmissão de pessoa-pessoa (ACHESON, 2007).

Por sua natureza química, esses agentes são sensíveis ao calor de 56°C por 30min, ao pH ácido (3,0) e aos solventes lipídicos (COUCEIRO; ALBUQUERQUE, 2008).

Os vírus influenza possuem o material genético composto por RNA de fita simples, segmentado, de polaridade negativa. Os vírus influenza A e B apresentam oito segmentos, que codificam 11 proteínas virais: PB2 (segmento 1), PB1 e PB1-F2, para o tipo A ou PB1, para o tipo B (segmento 2), PA (segmento 3), HA (segmento 4), NP (segmento 5), NA, para o tipo A ou NA e NB, para o tipo B (segmento 6), M1 e M2 (segmento 7); NS1 e NS2 (segmento 8) (figura 4), enquanto que o vírus C tem somente sete RNAs, codificando para nove proteínas (PALESE; SHAW, 2007).

Figura 4 - Diagrama esquemático da estrutura do vírus influenza A



Fonte: adaptado de LUDWIG *et al.*, 2003.

O complexo polimerase, formado pelas proteínas PB2, PB1 e PA, age sequencialmente na formação do RNA mensageiro (RNAm) e do RNA viral (RNAv) (COUCEIRO; ALBUQUERQUE, 2008). A proteína PB2 é requerida para a transcrição do RNAv e se liga a estrutura de Cap-1 metilado do pré-RNAm para clivagem pela PB1 (LI; RAO; KRUG, 2001; FECHTER *et al.*, 2003). A proteína PB1 contém regiões conservadas e bem caracterizadas de RNA polimerase dependente de RNA e é fundamental para a atividade da RNA polimerase. Ela se liga as extremidades terminais do RNAv e RNA complementar (RNAc) para iniciar a transcrição e a replicação, respectivamente. A interação com a extremidade 3' do RNAv ativa a sua atividade de endonuclease que gera o oligonucleotídeo com 5' cap para síntese de RNAm (BISWAS; NAYAK, 1994; CIANCI; TILEY; KRYSTAL, 1995). O segmento PB1 da maioria dos vírus influenza A contém uma segunda fase de leitura aberta, próxima a extremidade 5', que codifica a proteína PB1-F2. Esta última tem atividade pró-apoptótica e não foi identificada nos vírus influenza B nem C (CHEN *et al.*, 2001). O papel da proteína PA tem sido parcialmente descrito na replicação e na transcrição, assim como na clivagem do *capped primer* do RNA (FODOR *et al.*, 2003).

A NP, a maior proteína componente da RNP, é relativamente bem conservada e se liga ao longo de todo o comprimento de cada segmento de RNA genômico em intervalo de 24 nucleotídeos, formando a estrutura de dupla hélice encontrada em vírus maduros (COMPANS; CONTENT; DUESBERG, 1972; GORMAN *et al.*, 1990; BAUDIN *et al.*, 1994). É uma das proteínas mais abundantes em células infectadas e participa de vários processos importantes, como tráfico intracelular, replicação e

empacotamento do RNA viral e montagem do vírus (NEUMANN; CASTRUCCI; KAWAOKA, 1997; LAMB; KRUG, 2001; TAO; YE, 2010).

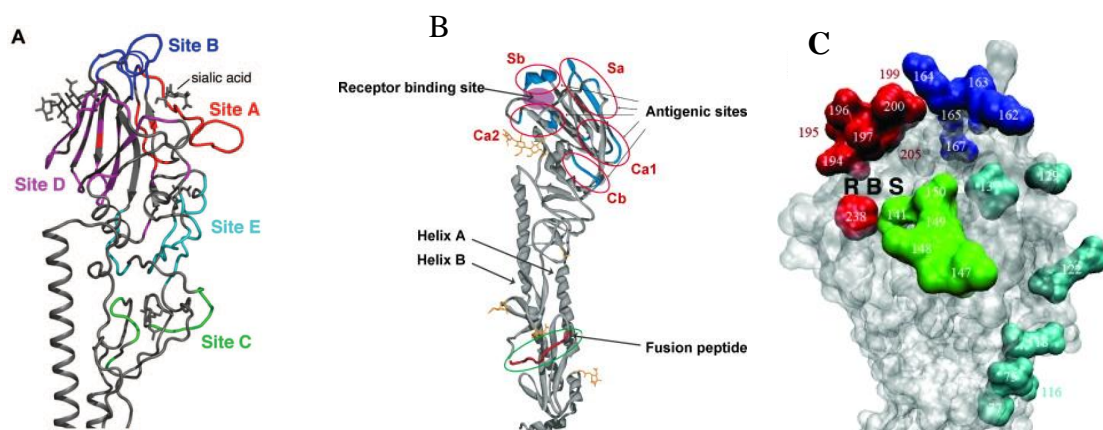
O segmento do gene M codifica duas proteínas, M1 e M2. M1 é a mais abundante do vírion, enquanto que a M2 é o componente menor e tem atividade de canal de íon (LAMB; KRUG, 1996). A proteína M1 encontra-se sob o envelope lipídico e faz o contato com as glicoproteínas e com a RNP, formando uma ponte entre o interior do core e as proteínas de membrana. Desempenha também um importante papel recrutando componentes do vírus para o sítio de montagem na membrana plasmática, além de participar do processo de brotamento da partícula viral (MARTIN; HELENIUS, 1991; GOMEZ-PUERTAS *et al.*, 2000; NAYAK; HUI; BARMAN, 2004). O papel da M2 está relacionado à acidificação de vesículas, tanto no estágio inicial do ciclo viral, quanto no tardio. Já na entrada do vírus a M2 participa da dissociação da matriz proteica do complexo RNP. Depois da endocitose, essa proteína tem a função de conduzir os prótons através do envelope até o interior da partícula viral. Também participa equilibrando o pH ácido do complexo de Golgi durante o processo de maturação, prevenindo o rearranjo conformacional da HA (HAY *et al.*, 1985).

O gene do segmento não estrutural (NS) codifica as proteínas NS1 e NS2/NEP (*nuclear export protein*) por um processamento alternativo do RNAm (LAMB; CHOPPIN, 1979). NS1 é uma proteína multifuncional implicada na inibição de processos celulares responsáveis pela ativação da resposta antiviral por meio de interferons, facilitando a replicação viral (KOCHS; SASTRE; SOBRIDO, 2007). A proteína NS2 está envolvida na exportação das RNPs para o citoplasma junto com a M1 (AKARSU *et al.*, 2003; CROS; PALESE, 2003).

A HA é essencial nos primeiros estágios da replicação viral, sendo o principal mediador para a entrada do vírus na célula. É assim chamada por fazer com que as hemácias se aglutinem (WEBSTER *et al.*, 1992). Ela é a responsável pela ligação dos vírus aos receptores celulares de oligossacarídeos contendo ácido siálico, intercedendo na entrada das partículas virais à célula hospedeira, sendo que para isso a molécula precursora HA₀ precisa ser clivada por proteases celulares para formar os segmentos HA₁ que contém todos os sítios antigênicos da HA, e HA₂, necessário a infectividade viral (LAZAROWITZ; CHOPPIN, 1975; WEBSTER *et al.*, 1992). A HA madura contém 328 resíduos de aminoácidos na subunidade HA₁ e 221 resíduos na subunidade HA₂ (GARTEN; KLENK, 1983). Outra importante participação desta proteína é na

fusão da membrana do endossomo celular com o envelope viral, necessária para a etapa de desnudamento para que ocorra a replicação viral (SKEHEL; WILEY, 2000; EARP *et al.*, 2005). Essa proteína também tem um papel estrutural na fase de brotamento e na formação das partículas, além de atuar como principal alvo de anticorpos neutralizantes (KNOSSOW *et al.*, 2002). Dessa forma, as propriedades antigênicas da HA são de fundamental importância no nível de proteção das vacinas contra a gripe. Por análise da sequência de aminoácidos e através da construção de mapas antigênicos, foi demonstrado que a estrutura antigênica da HA₁ do subtipo H3 do vírus influenza apresenta cinco sítios antigênicos imunodominantes designados de A, B, C, D e E (WILEY; WILSON; SKEHEL, 1981) e a HA₁ do subtipo H1, os sítios Sa, Sb, Ca1, Ca2 e Cb (GERHARD *et al.*, 1981; CATON *et al.*, 1982), comparáveis aos do vírus influenza A H3N2 (figura 5). Importantes variações antigênicas também foram observadas no gene da HA do vírus influenza B, tendo sido reportado que os quatro principais epítomos antigênicos estão presentes no domínio distal da HA₁ e que se encontram no alça 120 (HA₁ 116–137), no alça 150 (HA₁ 141–150), no alça 160 (HA₁ 162–167) e na região da hélice 190 (HA₁ 194–202) (WANG *et al.*, 2008a).

Figura 5 - Estrutura antigênica da HA dos vírus influenza A (ilustrações A e B) e influenza B (ilustração C).



A) Os sítios antigênicos A e B estão localizados na parte superior da HA de subtipo H3, em torno da região de ligação do receptor; B) Estrutura molecular de um monômero de HA de subtipo H1 do vírus influenza A H1N1 de 1918. A cabeça contém o sítio de ligação do receptor com o ácido siálico, que está envolto pelos cinco sítios antigênicos (Sa, Sb, Ca1, Ca2, e Cb). A haste compreende as hélices A e B, e o peptídeo de fusão; C) O sítio antigênico com os epítomos: alça 120 (azul claro), alça 150 (verde), alça 160 (azul escuro) e hélice 190 (vermelho). Fonte: POPOVA *et al.*, 2012; BOUVIER; PALESE, 2008; WANG *et al.*, 2008a.

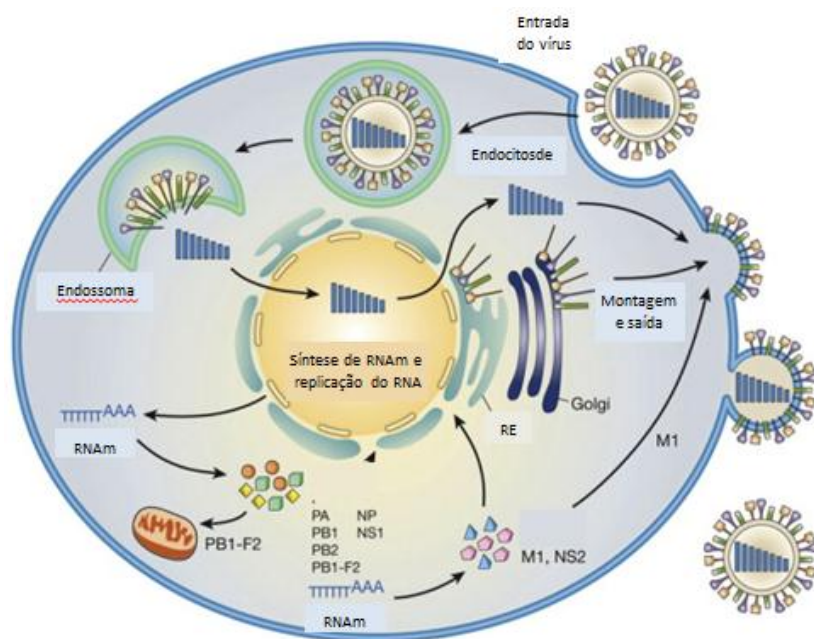
A NA é a segunda maior glicoproteína de superfície do vírus influenza e tem a função de catalisar a remoção dos resíduos de ácido siálico, liberando as novas partículas sintetizadas após a replicação (WRIGHT; WEBSTER, 2001). Tem sido mostrado que a NA também desempenha um papel no início da infecção, possivelmente facilitando a entrada do vírus (MATROSOVICH *et al.*, 2004a) e, que possui os sítios ativos bem conservados, o que permite um largo espectro de atividade dos inibidores da NA. Como a HA, a NA também possui determinantes antigênicos, sendo que a maior parte dos anticorpos neutralizantes produzidos contra o vírus é direcionada contra essas regiões (AIR; LAVER, 1989). Historicamente HA e NA são as proteínas mais pesquisadas, pelos papéis que desempenham durante o ciclo replicativo do vírus.

1.3.3 Replicação

O ciclo de replicação do vírus influenza inicia-se com a adsorção da partícula viral à célula hospedeira mediada pela ligação da HA aos receptores contendo ácido siálico (AS) presentes na membrana celular. A interação dos vírus com essas moléculas é restrita, pelo fato de a HA produzida por células de diferentes espécies animais apresentar especificidade para tipos de ligação específica do AS. Vírus humanos preferencialmente se ligam ao AS ligado à galactose na posição $\alpha 2,6$, enquanto que os vírus aviários, ao AS à galactose na posição $\alpha 2,3$. Entretanto, essa especificidade não é absoluta, pois tanto as células aviárias, quanto as humanas podem conter as duas ligações e uma única substituição de um aminoácido permite a HA reconhecer ligações em células diferentes (CONNOR *et al.*, 1994; GLASER *et al.*, 2004; MATROSOVICH *et al.*, 2004b). Após a adsorção, ocorre o processo de endocitose mediada principalmente por clatrin (MATLIN *et al.*, 1981) e, posteriormente, a fusão (dependente de pH) da membrana viral com a membrana do endossomo. Esta atividade de fusão é induzida por alteração estrutural na HA, porém, primeiramente deve acontecer a clivagem da HA₀ por proteases celulares, em HA₁ e HA₂. A molécula de HA clivada sofre uma alteração conformacional e expõe o peptídeo de fusão na porção N-terminal da HA₂, possibilitando a sua ação junto à membrana do endossomo (STEGMANN, 2000). A acidificação do endossomo ativa o canal iônico M2, permitindo a interrupção da ligação M1-RNP e o subsequente desnudamento do vírus (RNPs) para o citoplasma. Os segmentos do genoma viral são então transportados para dentro do núcleo através de sinais de localização nuclear (SLN) carregados pela NP e a

via mediada pela alfa beta importina (STEGMANN *et al.*, 1987; O`NEILL *et al.*, 1995). Inicialmente, no núcleo, o RNA_v de polaridade negativa é transcrito em RNA_m. Os produtos do RNA_m recebem um *cap* na extremidade 5' e uma cauda de poli (A) na extremidade 3' (KRUG, 1981). Em seguida, a fita de RNA_v é replicada em RNA_c de polaridade positiva, que serve como modelo para a síntese de novas cópias de RNA_v. A síntese do RNA_m e do RNA_c ocorre por dois mecanismos distintos. A transcrição é um processo dependente de iniciador e o término ocorre pela sequência de resíduos de U do RNA_v, gerando uma cauda de poli (A). Por outro lado, a replicação do RNA_v é uma reação independente de iniciador e uma fita completa de RNA_c é sintetizada (FODOR; BROWNLEE, 2002; NEUMANN *et al.*, 2004; NAGATA; KAWAGUCHI; NAITO, 2008). Após a formação da RNP dentro do núcleo, M1, NEP e NP catalisam o seu transporte para o citoplasma através de uma via dependente de CRM1 (BUI *et al.*, 2000; ELTON *et al.*, 2001; CROS; PALESE, 2003). Os complexos RNP-M1 são dirigidos para montagem na membrana plasmática apical, juntamente com a HA e a NA. A proteína M1 interage com as extremidades citoplasmáticas das glicoproteínas, levando à montagem e ao brotamento de partículas virais (BOULAN; PENDERGAST, 1980; GOMEZ-PUERTAS *et al.*, 2000). A liberação da progênie viral na superfície da célula depende da atividade de sialidase da NA (PALESE; SHAW, 2007) (figura 6).

Figura 6 – Ciclo de replicação do vírus influenza A.



Após endocitose mediada por receptor, as RNP são liberadas no citoplasma e posteriormente transportadas para o núcleo, onde a replicação e transcrição ocorrem. Os RNAm são exportados para o citoplasma para a tradução. Proteínas virais necessárias para a replicação e transcrição, são transportadas de volta ao núcleo. No final do ciclo, as proteínas NS2 e M1 auxiliam a exportação nuclear de RNP recém-sintetizadas. A montagem e o brotamento da progênie viral ocorrem na membrana plasmática. Fonte: adaptado de ARIAS *et al.*, 2009.

1.4 Variação antigênica

Os vírus influenza utilizam dois mecanismos, referidos como *drift* e *shift* antigênicos, para escapar da resposta imune (ZAMBON, 1999). As alterações menores e pontuais – *drifts* – se referem às mutações nos segmentos do genoma viral e podem resultar em mudanças de aminoácidos das glicoproteínas de superfície HA e NA. Essas mutações podem ocorrer através de substituições, inserções ou deleções de nucleotídeos, tanto para os vírus tipo A quanto os tipo B, embora os padrões de evolução observados variem dependendo da cepa (HAY *et al.*, 2001). O gene da HA sofre as mais elevadas taxas de mutação quando comparado com outros genes, indicando que a seleção imune desempenha um papel importante na evolução dessa proteína (PLOTKIN; DUSHOFF, 2003). Sabe-se que a porção HA₁ do vírus influenza A está evoluindo a uma velocidade de 5,7 substituições de nucleotídeos por ano (FITCH *et al.*, 1997), enquanto que para o gene da NP, essa taxa de mutação é de 3,3 e 1,15 substituições anuais para os vírus do tipo A e B, respectivamente (GAMMELIN *et al.*, 1990). Devido a essas alterações, as novas cepas escapam do sistema imune, uma vez

que não são devidamente neutralizadas por anticorpos produzidos contra cepas anteriores (TREATOR, 2004). Uma única infecção é suficiente para fornecer imunidade permanente à cepa invasora, entretanto, a intensa pressão exercida pelo sistema imune resulta em seleção de novas cepas antigênicas (FINKENSTADT; MORTON; RAND, 2005). Essas variações geralmente ocorrem a cada cinco ou seis anos para os vírus do tipo B e a cada dois ou três anos para os subtipos do vírus influenza A, sendo que os vírus H3N2 apresentam as mais altas taxas de evolução entre os subtipos circulantes (NICHOLSON; WOOD; ZAMBON, 2003). Essa característica dos vírus influenza constitui um grande obstáculo ao controle efetivo da gripe através da vacinação (BERTON; NAEVE; WEBSTER, 1984). Sendo assim, a habilidade de se compreender o mecanismo do *drift* antigênico e as diferenças antigênicas entre cepas, pode vir a melhorar a seleção de cepas que compõem as vacinas (BUSH *et al.*, 1999). Por isso, as cepas vacinais são revisadas a cada estação de circulação do vírus, tanto para o hemisfério norte, quanto para o sul, com o objetivo de garantir que haja maior similaridade entre as cepas circulantes e as cepas que serão contempladas na vacina, para desta forma, promover uma proteção imunogênica eficaz (WOOD, 2002).

Uma variante *drift* de importância epidemiológica geralmente requer alterações em pelo menos quatro resíduos de aminoácidos localizados entre dois ou mais sítios antigênicos (WILSON; COX, 1990). Outros estudos indicam que novas variantes antigênicas aparecem quando mais de duas variações ocorrem em sítios antigênicos ou quando uma variação ocorre em um sítio antigênico e outra em um sítio de ligação do receptor de ácido siálico (SHIH *et al.*, 2007). Raramente uma única substituição em um sítio antigênico pode causar alteração antigênica relevante (SMITH *et al.*, 2004)

Os *shifts* se caracterizam por alterações maiores, mediante processo de rearranjo e resultam em um novo subtipo viral do influenza A ou em um vírus com uma HA de origem animal ou ainda com a HA e a NA, também de animal. Essa nova variante é diferente do subtipo originário. E quanto à patogenicidade, esse vírus pode ser atenuado, não viável, ou ser altamente virulento e, quando isso ocorre, ele apresenta um potencial pandêmico, pois além de ser patogênico, possui antígenos de superfície contra os quais a população não tem imunidade (ZAMBON, 1999). Depois de originada a cepa pandêmica, a mesma poderá ter a sua virulência diminuída durante o processo replicativo, através do mecanismo de *drift*, adaptando-se ao hospedeiro e continuando a produzir epidemias em todo o mundo. Subtipos novos ou substancialmente diferentes

do vírus influenza A têm o potencial de causar uma pandemia quando são capazes de serem introduzidos na população humana, produzindo doença grave e demonstrando eficiente transmissão entre as pessoas, quando houver pouca ou nenhuma imunidade pré-existente (CDC, 2013).

Com relação ao vírus influenza B, as duas linhagens antígenicamente e geneticamente distintas, representadas pelas cepas de referência B/Victoria/2/87 e B/Yamagata/16/88 têm sido encontradas em humanos desde 1983 (ROTA *et al.*, 1990). Embora não se conheçam reservatórios não humanos, nem subtipos distintos, os vírus tipo B podem ser considerados até mais heterogêneos do que os do tipo A (HAY *et al.*, 2001; BARR *et al.*, 2003). Estes agentes se modificam apenas pelo processo de *drift*, sendo que nenhum *shift* antigênico fora observado (CDC, 2011).

1.5 Patogênese e características clínicas

Os vírus influenza são facilmente transmitidos de pessoa a pessoa por partículas de aerossóis geradas durante o ato de espirrar, falar ou tossir, ou pelas mãos, que após contato com superfícies recém-contaminadas por secreções respiratórias podem levar o agente infeccioso direto à boca, aos olhos e ao nariz. A infecção acontece principalmente nas células epiteliais colunares do trato respiratório, onde ocorre o primeiro ciclo de replicação (entre 4-6 horas), causando perda do epitélio ciliado e consequentemente da redução da funcionalidade desse tecido (HILLEMANN, 2002; FORLEO-NETO *et al.*, 2003). Altos títulos virais são eliminados nesta fase da infecção. Além disso, a replicação induz a produção de interferons, citocinas e outros fatores, levando às respostas inflamatórias locais e sistêmicas e resultando nos sintomas que definem a síndrome denominada influenza. A perda do epitélio ciliado facilita a entrada de bactérias no trato respiratório inferior, podendo resultar em pneumonias bacterianas secundárias, responsáveis por muitas das mortes atribuídas à infecção pelo vírus influenza (ZAMBON, 1999).

Após um período de incubação de dois a três dias, pode haver um início abrupto com aparecimento de tremores, mal-estar, dor de cabeça, dores musculares, tosse, dor de garganta, calafrios, febre (entre 38-40°C) e outros sintomas inespecíficos. Os sintomas causados por esses vírus podem ainda diferir, dependendo do indivíduo e do subtipo infeccioso (DOUGLAS, 1975; COLLIER; OXFORD, 2006). Subtipos pouco patogênicos causam, na maioria das vezes, apenas sintomas respiratórios e conjuntivite,

enquanto que os mais patogênicos podem causar, além dos sintomas gripais, diarreia grave e convulsões, podendo levar à morte (de la BARRERA; REYES-TERAN, 2005).

Crianças costumam apresentar febres mais altas, que podem ser acompanhadas por otite média, laringotraqueobronquite, pneumonia e miosite e até convulsões (PRICE; POSTLETHWAITE; LONGSON, 1976; PELTOLA; ZIEGLER; RUUSKANEN, 2003). Crianças com idade de até três anos podem apresentar manifestações gastrointestinais (PAISLEY *et al.*, 1978, HU *et al.*, 2004). Normalmente, a gripe em pessoas jovens tem um período de curta duração. Em idosos e em indivíduos que possuem fatores de risco como imunodeficiências, asma, doenças cardíacas e pulmonares (O'RIORDAN *et al.*, 2010) a cura pode demorar muito mais, com persistente fraqueza e prostração. Geralmente, a gravidade é proporcional à faixa etária e as crianças de tenra idade têm tanto risco de complicações quanto os idosos, sendo que as cepas H3N2 são as responsáveis, na maioria das vezes, pelas maiores taxas de hospitalização e de mortalidade (THOMPSON *et al.*, 2003; THOMPSON *et al.*, 2004; COLLIER; OXFORD, 2006).

De uma forma geral, não há diferença entre os sintomas clínicos causados pelos vírus influenza A e B, embora a chance de gravidade requerendo hospitalização seja quatro vezes maior para o vírus influenza A (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

1.6 Epidemiologia

O impacto da gripe é reconhecido em todo o mundo há muitos anos, resultando em considerável sofrimento humano e perdas econômicas (COX; SUBBARAO, 2000; MONTO, 2008). A sazonalidade do vírus influenza no inverno em países de clima temperado é uma das características mais amplamente conhecidas, com picos típicos entre dezembro e abril no hemisfério norte e de junho a setembro no hemisfério sul (SIMONSEN, 1999; NELSON *et al.*, 2007). Aspectos fisiológicos e comportamentais têm sido propostos para explicar o aumento dos casos de gripe humana durante os meses mais frios nessas regiões, pois coincide com a queda da temperatura, a população passa um maior tempo em ambientes fechados, aumentando, assim, a chance desses vírus se espalharem. Geralmente, as epidemias dominadas pelo vírus influenza A H3N2 começam mais cedo, seguidas pelo vírus tipo B, fechando a estação (MONTO; KIOUMEHR, 1975; FINKELMAN *et al.*, 2007). Em outras partes do mundo,

principalmente onde não há uma estação de inverno definida, os padrões de transmissão são diferentes (MONTO, 2008). Regiões tropicais e subtropicais com invernos moderados também estão sujeitas a oscilações sazonais, no entanto, o padrão é geralmente menos pronunciado do que nas áreas temperadas, inclusive com a circulação do vírus ocorrendo ao longo do ano (VIBOUD; ALONSO; SIMONSEN, 2006).

No Brasil, embora tenham sido relatados picos da gripe entre os meses de maio e setembro na maioria dos estudos (FORLEO-NETO *et al.*, 2003), os casos de influenza começam mais cedo nas zonas equatoriais (MELLO *et al.*, 2009) e são detectados progressivamente mais tarde nas zonas tropicais e subtropicais, com uma diferença de três meses no pico de circulação entre as regiões norte e sul (ALONSO *et al.*, 2007). Em estudos realizados em diferentes regiões, os vírus influenza foram responsáveis por índices que variaram de 5,0% a 19,3% dentre as DRAs, evidenciando um papel relevante na saúde pública. (PAIVA *et al.*, 2003; CARRARO *et al.*, 2007; THOMAZELLI *et al.*, 2007; VIDAL *et al.*, 2008; MOURA; PERDIGÃO; SIQUEIRA, 2009).

O subtipo H3N2, que emergiu em 1968, continua circulando até hoje, juntamente com os H1N1, que reapareceram em 1977. Desde então, esses dois subtipos virais têm cocirculado com o vírus influenza B (WEBSTER *et al.*, 1992). A cocirculação de múltiplos subtipos, ou de linhagens facilita o rearranjo durante a infecção de um único indivíduo por dois subtipos do vírus influenza A ou por duas linhagens do vírus influenza B (YAMANE; ARIKAWA; ODAGIRI, 1978; MCCULLERS *et al.*, 1999).

Nos últimos 50 anos, os vírus influenza A foram relacionados à ocorrência de quatro *shifts*: em 1957 quando o vírus H1N1 foi substituído pelo H2N2, causando a gripe asiática; em 1968 quando o subtipo H3N2 substituiu o H2N2, ocasionando a gripe de Hong Kong; em 1977 quando o H1N1 reapareceu causando a gripe russa (GLEZEN, 1996; ALEXANDER; BROWN, 2000; PALESE, 2004). Em 2009, a cepa H1N1 causou a primeira pandemia do novo século. Este novo vírus da gripe de origem suína, A (H1N1), foi identificado no México em março de 2009 e se espalhou rapidamente em todo o mundo entre os humanos (SCALERA; MOSSAD, 2009). Tendo em vista o elevado número de países que reportaram casos humanos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elevou o alerta da pandemia para o nível seis (mais elevado) em 11 de junho de 2009. Como a característica do vírus era a de infectar principalmente crianças,

adultos jovens, mulheres grávidas e indivíduos com doenças de base, e ainda por causa do aumento considerável das internações, a indústria farmacêutica empenhou-se no desenvolvimento de vacinas contra a gripe pandêmica (COLLIN; RADIGUES, 2009; WIWANITKIT, 2009).

As pandemias de 1957 e 1968 resultaram de rearranjos de cepas virais humanas e aviárias, enquanto que estudos filogenéticos sugerem que a doença de 1918 tenha sido causada pela introdução de um vírus aviário primeiramente em porcos, e daí para os seres humanos (SCHOLTISSEK, 1994; REID *et al.*, 1999; REID *et al.*, 2000; BASLER *et al.*, 2001). Estudo realizado por Trifonov e colaboradores (2009) indicou que a cepa que provocou a pandemia pelo H1N1 de 2009 foi resultado do rearranjo dos vírus influenza humano, aviário e suíno.

Durante as epidemias sazonais de gripe, a taxa de infecção atinge entre cinco e 15% da população mundial, resultando em 3 a 5 milhões de casos graves e até 500.000 mortes por ano (OMS, 2003). Os dois subtipos do vírus influenza A, H3N2 e H1N1, e o vírus influenza B, produzem doença com características clínicas similares, entretanto, em crianças mais velhas e em adultos saudáveis, o H3N2 está associado a maior gravidade, seguido pelo tipo B e H1N1 (SIMONSEN *et al.*, 1997; HU *et al.*, 2004). Em idosos e outros grupos que possuem fatores de risco, as hospitalizações e mortes relacionadas às complicações também estão associadas ao subtipo H3N2 na maioria dos casos (LUI; KENDAL, 1987).

Enquanto o maior índice de mortalidade entre as crianças de tenra idade tem sido observado durante as pandemias (LUK; GROSS; THOMPSON, 2001; PEBODY *et al.*, 2010) para a gripe sazonal, esse aspecto não é notado nesta faixa etária, exceto em anos quando há altas taxas de casos de influenza, principalmente em regiões restritas e em um curto período de tempo (MONTANO, 2008). Por outro lado, pelo menos em países desenvolvidos, as hospitalizações estão associadas particularmente às crianças com até dois anos de idade (NEUZIL *et al.*, 2000; THOMPSON *et al.*, 2004).

A vigilância epidemiológica dos casos de influenza vem sendo realizada pela OMS desde 1952, envolvendo centros colaboradores em todo mundo. O objetivo desses laboratórios é monitorar os *drifts* e os *shifts* antigênicos e cepas emergentes do vírus influenza e recomendar quais cepas deverão ser incorporadas anualmente na composição da vacina (CARRAT; FLAHAULT, 2007).

Neste ano de 2013, já foi observado que a atividade dos vírus influenza está próxima do nível sazonal em grande parte da América do Norte, Europa e norte da Ásia, embora baixo nível de transmissão persistente tenha sido associado aos vírus influenza B nesses países. O subtipo H3N2 foi o mais encontrado na América do Norte e o H1N1 pdm na Europa, enquanto que proporções variáveis dos dois subtipos foram observadas nos países do norte da Ásia. Baixos níveis de atividade do vírus influenza foram relatados em todas as regiões tropicais do mundo e nos países do hemisfério sul. E quase todos os vírus influenza A e os B, da linhagem Yamagata foram antigenicamente relacionados à vacina atual, embora um número considerável de vírus da linhagem Victoria também tenha sido detectado. Poucas cepas de vírus resistentes ao oseltamivir e ao zanamivir foram encontradas. E na China, desde abril deste ano, mais de 100 casos do vírus influenza A subtipo H7N9 em humanos foram relatados até o momento (WHO, 2013b).

1.7 Diagnóstico laboratorial

A infecção pelo vírus influenza dificilmente pode ser diagnosticada apenas por características clínicas, pois essas podem ser confundidas com as infecções causadas por outros vírus respiratórios (NICHOLSON, 1998).

O diagnóstico laboratorial é importante para o monitoramento das infecções por esses agentes, tanto nos surtos anuais, quanto nas pandemias (PETRIC; COMANOR; PETTI, 2006). Testes rápidos e precisos auxiliam na conduta médica, pois permitem o fornecimento oportuno da terapia antiviral e profilática, assim como a implementação de estratégias apropriadas para o controle da infecção e a limitação do emprego desnecessário de antibioticoterapia (PLAYFORD; DWYER, 2002; NICHOLSON; WOOD; ZAMBON, 2003).

Os espécimes clínicos de escolha para a realização dos testes de detecção desses vírus são os aspirados de nasofaringe, lavados nasais e lavados bronco alveolares, por conterem células epiteliais colunares. A coleta deve ser realizada na fase aguda da doença e a amostra clínica deve ser transportada ao laboratório em baixa temperatura, em torno de 4°C, para ser processada o mais rapidamente possível (CRUZ *et al.*, 1987, DWYER *et al.*, 2006).

As técnicas mais comumente utilizadas para a identificação dos vírus influenza são: i) o isolamento do vírus em cultura de células (CC) ou em ovos embrionados de

galinha; ii) detecção de antígenos pela imunofluorescência indireta (IFI) e por ensaios imunoenzimáticos (EIA); e iii) moleculares, como a RT-PCR, que podem detectar a presença dos RNA virais em amostras respiratórias (HERRMANN; LARSSON; ZWEYGBERG, 2001). A identificação do gênero e subtipos do vírus também pode ser realizada por reação de inibição da hemaglutinação, utilizando-se de antissoros específicos (COMPANS, 1974).

O método tradicional para a recuperação do vírus a partir de amostras clínicas é o isolamento em CC. Este teste ainda permite o isolamento viral para caracterização e análise de potenciais cepas vacinais. No entanto, esse procedimento é mais demorado do que os testes moleculares ou de imunofluorescência (DWYER *et al.*, 2006).

A técnica de IFI é uma boa alternativa para a detecção e tipagem inicial dos vírus e podem ser utilizados kits comerciais contendo anticorpos monoclonais específicos. É o ensaio mais rápido quando os referidos anticorpos são aplicados diretamente nas amostras clínicas, embora esteja sendo substituído por testes moleculares (PLAYFORD; DWYER, 2002).

Atualmente a PCR é a técnica molecular melhor desenvolvida e com ampla aplicabilidade no diagnóstico viral, sendo a RT-PCR a melhor alternativa para tipar e subtipar os vírus influenza (ELLIS; FLEMING; ZAMBON, 1997). Embora o teste seja sensível e específico, resultados negativos por RT-PCR não excluem o diagnóstico da doença (CDC, 2012a). Alguns desses ensaios moleculares são capazes de detectar e diferenciar a infecção pelo vírus influenza A ou B (VAN ELDEN *et al.*, 2001), outros podem identificar subtipos específicos do vírus influenza A (STOCKTON *et al.*, 1998). Oligonucleotídeos específicos para diferentes genes do vírus e diferentes métodos de extração de ácidos nucleicos e protocolos de amplificação, têm sido descritos. Além disso, algumas dessas reações incluem a etapa de *nested* PCR, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e até a especificidade do teste (ATMAR *et al.*, 1996; COIRAS *et al.*, 2003; YANG; ROTHMAN, 2004). Apesar do tempo deste ensaio ser considerado curto, a maioria das reações para determinação dos subtipos virais requer passos separados para a amplificação e detecção de genes virais. Para superar esta limitação, técnicas mais aprimoradas, foram desenvolvidas, como a RT-PCR em tempo real (BOIVIN *et al.*, 2004).

O sequenciamento dos genes amplificados da HA e da NA é também um importante método, pois permite a identificação de novas cepas, a análise de variações

nos segmentos dos genes e pode também indicar o local de origem dos vírus (ABED *et al.*, 2002).

1.8 Prevenção e tratamento

Até o momento, a vacinação é a melhor estratégia na prevenção da morbidade e da mortalidade causadas pela gripe, principalmente para os indivíduos com alto risco para complicações (FIORE *et al.*, 2008). As alterações que acontecem nos antígenos de superfície dos vírus influenza produzem novas cepas que evadem da imunidade dos indivíduos e por isso a composição da vacina precisa ser atualizada anualmente (CARRAT; FLAHAULT, 2007).

Ocasionalmente, um novo vírus também pode emergir de um reservatório animal e tornar-se transmissível entre os humanos, exigindo o desenvolvimento rápido de uma nova vacina contra o vírus, potencialmente pandêmico (SMITH *et al.*, 2004; RICHARD; VIBOUD; MILLER, 2010). Porém, a vacinação só é eficaz se as cepas vacinais forem antigenicamente similares às cepas circulantes, fornecendo assim, proteção aos indivíduos vacinados (JIN *et al.*, 2005), caso contrário, pode implicar em consequências epidemiológicas e econômicas importantes.

Embora seja evidente que um *drift* antigênico possa reduzir a eficácia da vacina, nem todas as cepas evadem da imunidade na população (OHMIT *et al.*, 2006). Considerando-se o potencial epidêmico dos *drifts*, a OMS desde 1973, prevê quais cepas têm maior probabilidade de circular na temporada seguinte em um período de seis meses de antecedência (tempo para produzir e distribuir a vacina), com base em estudos dos vírus mundialmente prevalentes em temporadas anteriores (KITLER; GAVINIO; LAVANCHY, 2002; HAMPSON, 2008). Também se analisa a capacidade de produção da cepa vacinal e a imunidade existente na população (RUSSELL *et al.*, 2008a).

Como referido atualmente, dois subtipos virais A (H1N1 e H3N2) e um tipo B circulam na população. Os antígenos HA de cada uma das cepas representativas são incluídos na vacina, que é composta por partículas inativadas de vírus fracionados (*splits*) (COUCH, 2008). Devido à ampla disseminação da cepa pandêmica A/California/07/2009 (H1N1pdm) a partir de abril de 2009 e posterior cocirculação com os vírus influenza B e H3N2, a mesma foi incorporada junto à vacina anual, ao invés da H1N1 sazonal (RICHARD; VIBOUD; MILLER, 2010). No Brasil essa é a vacina

utilizada e para crianças com idade entre seis meses e oito anos, que estão sendo vacinadas pela primeira vez, recomenda-se a administração de duas doses.

Além das vacinas trivalentes ora em vigência, vacinas quadrivalentes contendo dois subtipos do vírus influenza A e duas linhagens do vírus influenza B (Victoria e Yamagata) estão em fase de desenvolvimento clínico (GREENBERG *et al.*, 2013). Também existem vacinas monovalentes para prevenção da infecção pelo vírus H1N1pdm e pelo vírus H5N1 (BEELER; EICHELBERGER, 2013).

Em geral, é esperado que a vacinação previna em torno de 80% dos casos de gripe em pessoas saudáveis nos anos em que as cepas vacinais são antigenicamente compatíveis com as circulantes. Porém, essa eficácia diminui para 50% quando há incompatibilidades (JEFFERSON *et al.*, 2007).

Em algumas situações nas quais a vacinação não é indicada, tais como crianças menores de seis meses de idade, indivíduos alérgicos ao ovo, ou que tenham tido uma reação alérgica grave a uma dose prévia da vacina, ou ainda por apresentarem alergia grave a um dos componentes da vacina, recomenda-se o uso de drogas antivirais eficazes (CDC, 2012b).

O tratamento com antivirais ainda é pouco utilizado no Brasil, devido ao seu alto custo, número limitado de medicamentos e sua aplicação ainda carece de mais estudos, pois se sabe que os tais medicamentos podem contribuir para a seleção de cepas resistentes e aparecimento de efeitos colaterais, especialmente nas categorias de risco, como crianças e mulheres grávidas (CHENG *et al.*, 2009; KITCHING *et al.*, 2009). As duas classes de drogas profiláticas ou terapêuticas utilizadas contra o vírus influenza são os bloqueadores de canais M2 e os inibidores de neuraminidase.

Os bloqueadores de M2, amantadina e rimantadina, inibem a replicação do vírus influenza A. Entretanto, em um estudo, foi relatado que mutantes resistentes a essas drogas estavam presentes em cerca de 30% dos pacientes tratados e que essas variantes resistentes, além de serem geneticamente estáveis, tinham o potencial de serem transmitidas de pessoa-pessoa (CHENG *et al.*, 2009).

Os inibidores da neuraminidase - oseltamivir (oral), zanamivir (inalado) e peramivir (intravenoso) – são as drogas ativas contra os vírus tipos A e B, sendo que o oseltamivir é a droga de escolha para o tratamento da gripe. Como acontece com outros compostos antivirais (HAYDEN, 2001), mutantes resistentes a esses medicamentos já foram caracterizadas (KISO *et al.*, 2004; FERRARIS; LINA, 2008).

Recentemente, uma combinação de BAPA (benzylsulfonyl-d-arginine-proline-4-amidinobenzylamide) com carboxilato de oseltamivir apresentou melhores resultados em comparação com qualquer um dos inibidores em isolado (BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSERA *et al.*, 2012).

O constante monitoramento das alterações antigênicas provocadas pelos *drifts*, de cepas que causam infecções sazonais e *shifts* que podem levar ao surgimento de uma cepa pandêmica é de extrema importância para a saúde pública. Esse monitoramento é realizado através da análise das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos diferentes tipos e subtipos do vírus, principalmente com relação aos sítios antigênicos. Dessa forma, permite acompanhar a circulação, a evolução e a profilaxia desses agentes, visto que a vigilância global só é possível mediante o desenvolvimento de estudos individuais. Além disso, um diagnóstico laboratorial rápido do subtipo viral que está causando determinada infecção pode orientar o médico sobre a conduta do tratamento e pode constituir um indicador precoce do início da circulação dos vírus influenza, na comunidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

- Detectar e caracterizar os vírus influenza em aspirados de nasofaringe (ANF) de crianças menores de cinco anos de idade, com doença respiratória aguda (DRA), atendidas na rede municipal de saúde de Uberlândia, MG e no Hospital de Clínicas da UFU, entre 2001 e 2010.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar os vírus influenza tipos A e B em ANF de crianças com DRA;
- Identificar os subtipos do vírus influenza tipo A nas amostras positivas;
- Avaliar a identidade das sequências parciais de nucleotídeos e de aminoácidos, dos genes da hemaglutinina e da neuraminidase, dos vírus influenza investigados, em relação às cepas vacinais e outras que circularam mundialmente durante o período de estudo;
- Identificar as alterações nas sequências deduzidas de aminoácidos, a partir das regiões sequenciadas da HA e da NA;
- Conhecer aspectos epidemiológicos dos vírus influenza tipos A e B, circulantes na região de Uberlândia, MG.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População de estudo

A população de estudo foi composta por uma amostra de conveniência de 605 crianças com idade até cinco anos, atendidas em unidades de saúde pública de Uberlândia, MG, entre 2001 e 2010. Como critério de inclusão, a criança tinha que apresentar quadro clínico de DRA com o início dos sintomas de até cinco dias e com manifestações de coriza, tosse, com ou sem presença de febre, sibilos e dificuldade respiratória.

No Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU) os pacientes foram atendidos nas quatro unidades de internação infantil: enfermaria de pediatria (ENF-Ped), unidade de terapia intensiva pediátrica (UTI-Ped), berçário e unidade de terapia intensiva neonatal (UTI-Neo), além de alguns casos atendidos no pronto-socorro de pediatria (PS-Ped) e outros, no pronto atendimento pediátrico (PAP). Também foram incluídos casos de ambulatórios das Unidades de Atendimento Integrado (UAI) - Pampulha e Roosevelt e da enfermaria da Clínica Infantil Dom Bosco.

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (nº326/08) (anexo I) e um termo de consentimento (anexo II) foi obtido dos pais ou responsáveis pela criança. Dados clínicos e demográficos também foram colhidos, através de preenchimento da ficha clínica pelo pediatra (anexo III).

3.2 Espécimes clínicos

3.2.1 Coleta

A coleta dos aspirados de nasofaringe (ANF) foi realizada conforme Oliveira e colaboradores (2008), por enfermeiras do HC ou alunas dos cursos de Enfermagem ou ainda da pós-graduação, pertencentes à equipe da Virologia/UFU. Para as primeiras 213 amostras também foi obtido o *swab* nasal, que foi misturado ao ANF durante o processamento. Resumidamente, para a coleta do aspirado, 0,5 mL de PBS (*phosphate-*

buffered saline; pH=7,2) foram instilados em cada narina da criança e, utilizando-se de um cateter conectado a um sistema a vácuo, a secreção foi aspirada para um recipiente estéril. Em seguida, o ANF foi acondicionado e transportado em gelo até o Laboratório de Virologia da UFU, onde foi processado segundo Queiróz e colaboradores (2002) em um período máximo de 4 horas. As amostras foram alíquotadas e estocadas em nitrogênio líquido ou à -70°C.

3.2.2 Processamento

Os espécimes clínicos foram ressuspensos e homogeneizados com PBS e duas alíquotas, das amostras *in natura*, foram armazenadas a -70°C. O restante da secreção foi centrifugado a 350 x g por 10 min a 4°C para a obtenção do sobrenadante, que foi estocado a -70°C. Finalmente o sedimento com as células foi ressuspenso e utilizado para o teste de imunofluorescência indireta.

3.3 Teste de imunofluorescência indireta

As células ressuspensas foram depositadas nos orifícios das lâminas de imunofluorescência, fixadas com acetona e estocadas a -20°C até a sua utilização. Para o teste de imunofluorescência indireta (IFI) foi utilizado o kit comercial Respiratory Panel I Viral Screening and Identification Kit (Millipore/Chemicon International, Inc., Temecula, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante, para detectar a presença dos vírus influenza A e B, vírus respiratório sincicial, vírus parainfluenza tipos 1, 2 e 3 e adenovírus. A interpretação dos resultados seguiu conforme Queiróz e colaboradores (2002): o espécime foi considerado positivo quando mais de três células tiveram fluorescência específica, negativo se nenhuma fluorescência foi observada em mais de 20 células epiteliais e suspeito se menos de três células apresentaram fluorescência específica. Neste último caso, se depois de repetida a reação, a mesma ainda se apresentava suspeita, o resultado era tido como inconclusivo.

3.4 Extração do RNA viral

O RNA foi extraído utilizando-se o kit comercial Viral RNA mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, 140 µL do ANF foram adicionados a 560 µL do tampão de lise (AVL) e 5,6 µL de

carreador de RNA do kit e a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, as partículas virais circulantes foram lisadas e o RNA foi precipitado com 560 µL de etanol (96-100%). Depois de centrifugação a 8000 rpm por 1 min, o RNA foi adsorvido a uma membrana de sílica. Um volume de 500 µL de cada um dos dois tampões de lavagem, AW1 e AW2, foi adicionado à coluna em sequência, seguido de centrifugação rápida (8000 rpm por 1 min e 14000 rpm por 3 min, para AW1 e AW2, respectivamente). O RNA foi eluído da coluna com 60 µL de tampão de eluição (AVE) e rápida centrifugação. O RNA foi então utilizado imediatamente para preparar o cDNA ou armazenado a -70°C.

3.5 Reação de amplificação por RT-PCR

A RT-PCR para os vírus influenza tipo A e B foi inicialmente realizada com objetivo de amplificar parcialmente o domínio HA₁ do gene da hemaglutinina (HA), utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o tipo B e subtipos A H1 e H3 (tabela 1 e figura 7). E a amplificação parcial do gene da neuraminidase (NA) para os vírus influenza tipo A foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos específicos para os subtipos N1 e N2 (tabela 1 e figura 8), fornecidos pelo Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo - Fiocruz/IOC-RJ.

As reações de transcrição reversa e de amplificação foram baseadas nas condições e oligonucleotídeos descritos anteriormente por Stockton e colaboradores (2008) e pelo *Standard Operating Procedures V-5372/01-05* (Health and Protection Agency, Londres, Reino Unido) para os genes da HA e NA, respectivamente (tabela 1 e figuras 7 e 8). Controles negativos e positivos foram utilizados em todas as etapas do processo de amplificação.

3.5.1 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a transcrição reversa, um volume de 5 µL do RNA extraído foi adicionado à mistura da primeira reação contendo 0,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP) e 1 µM dos oligonucleotídeos específicos AH1 A, AH3 A ou BHA A (tabela 1), para o gene da hemaglutinina dos vírus influenza H1, H3 e B, respectivamente, ou AN1/418F ou AN2A/Multi, para o gene da neuraminidase dos vírus influenza N1 e N2, respectivamente, além de água tratada com pirocarbonato de dietila para completar o

Tabela 1– Relação dos oligonucleotídeos utilizados na síntese dos DNAs complementares e nas reações de amplificação por RT-PCR e de sequenciamento dos vírus influenza.

Etapas da amplificação e oligonucleotídeo	Pol.	Sequência de nucleotídeos 5'-3'	Gene	Posição no genoma	Genebank ^a
<i>Primeira</i>					
AH1A	(+)	CAG ATG CAG ACA CAA TAT GT	HA ₁	54-73	CY028724
AH1FII	(-)	AAA CCG GCA ATG GCT CCA AA	HA ₁	1049-1068	CY028724
AH3A	(+)	CAG ATT GAA GTG ACT AAT GC	HA ₁	145-164	AB298687
AH3DII	(-)	GTT TCT CTG GTA CAT TCC GC	HA ₁	1008-1024	AB298687
BHAA	(+)	GTG ACT GGT GTG ATA CCA CT	HA ₁	132-151	CY030839
BHADII	(-)	TGT TTT CAC CCA TAT TGG GC	HA ₁	1015-1034	CY030839
AN1/418F	(+)	TTC TGA CCC AAG GTG CTC TA	NA	406-425	CY125030
AN1/EII	(-)	TAC TTG TCA ATG GTG AAC GG	NA	1411-1430	CY125030
AN2A/Multi	(+)	AAC ATT ACT GGA TTT GCA CC	NA	277-296	CY116588
AN2DII/1082	(-)	CAA AGG CCC AGC CTT TCA CT	NA	1063-1082	CY116588
<i>Segunda^b</i>					
AH1B	(+)	ATA GGC TAC CAT GCG AAC AA	HA ₁	74-93	CY028724
AH1EII	(-)	CTT AGT CCT GTA ACC ATC CT	HA ₁	998-1017	CY028724
AH3B	(+)	AGC AAA GCT TTC AGC AAC TG	HA ₁	319-338	AB298687
H3.938.R ^c	(-)	<u>TGT CAG AGG TTT TCA CCG TCG CTT</u> CCA TTT GGA GTG ATG C	HA ₁	890-909	AB298687
BHAB	(+)	CAT TTT GCA AAT CTC AAA GC	HA ₁	174-195	CY030855
BHACII	(-)	TGG AGG CAA TCT GCT TCA CC	HA ₁	930-946	CY030855
AN1/418F	(+)	TTC TGA CCC AAG GTG CTC TA	NA	406-425	CY125030
AN1/1219R	(-)	GAA ACT TCC GCT GTA CCC TG	NA	1207-1226	CY125030
AN2B	(+)	GGT GAC GAG AGA ACC TTA TG	NA	364-383	CY116588
AN2DII/1082	(-)	CAA AGG CCC AGC CTT TCA CT	NA	1063-1082	CY116588
<i>Outras</i>					
H3.101.F	(+)	CAG CAC GGC AAC GCT G	NA	101-116	DQ249261
3GSTRV	(-)	TGT CAG AGG TTT TCA CCG TC			
AH3CII	(-)	GCT TCC ATT TGG AGT GAT GC	HA ₁	890-909	AB298687

^aCepas de vírus influenza que foram utilizadas como molde para localização dos oligonucleotídeos; ^bSegunda = *nested*-PCR; ^cO oligonucleotídeo H3.938.R foi alterado com a inserção de uma sequência não relacionada ao gene da hemaglutinina; pol: polaridade.

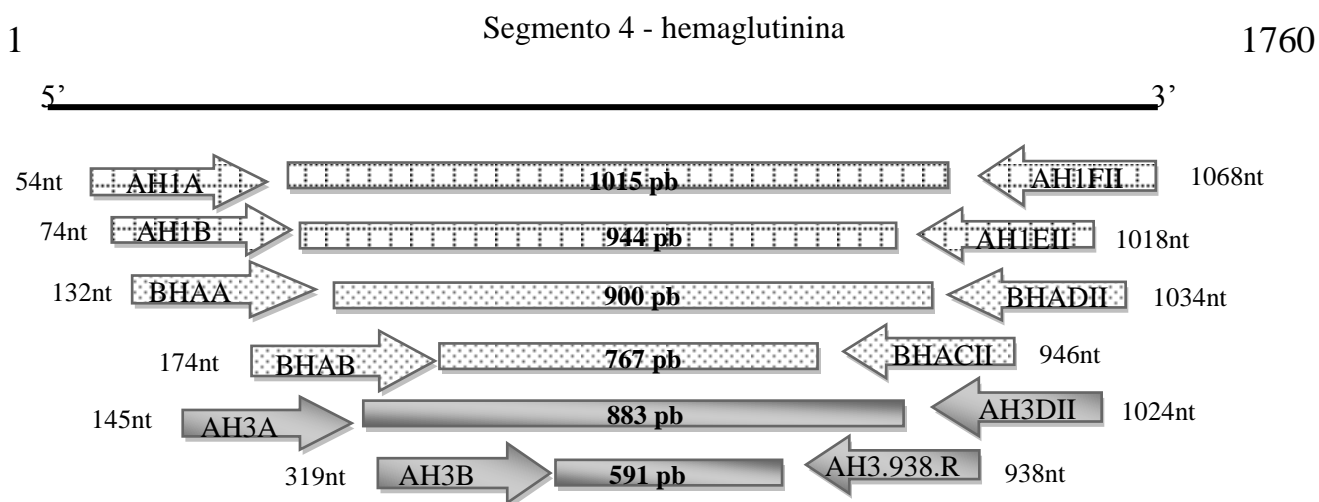
volume final de 9,5 μL . A mistura foi aquecida à 95°C por 3 min e colocada em gelo por 1 min. Em seguida, adicionou-se 4,5 μL da segunda mistura, preparada com 2 μL do tampão 5X First-Strand, 1 μL 0,1 M de ditioneitol e 100 U da SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Life Technologies Corp, Grand Island, NY, EUA). A reação foi incubada à 50°C por 60 min, seguida da inativação da enzima por incubação à 95°C por 3 min.

3.5.2 Reação de amplificação do gene HA

Para a primeira amplificação, 4 μL do cDNA foram adicionados a 16 μL da mistura, contendo os componentes – numa concentração final – tampão PCR 1x (fornecido com a enzima), MgCl_2 1 mM, dNTP 0,2 mM e 1 U de Platinum *Taq* DNA polymerase (Life Technologies) e cada par de oligonucleotídeo usado separadamente a 1 μM . A reação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, e 72°C por 1 min. O produto da primeira PCR foi diluído na proporção 1:100 em água ultra pura (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) e 0,8 μL desta diluição foi transferida para 19,2 μL da mistura da segunda amplificação, contendo os ingredientes para concentração final de: tampão PCR 1x, MgCl_2 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 1 U de Platinum® *Taq* DNA polymerase e os oligonucleotídeos da *nested*-PCR separadamente a 0,125 μM . As condições utilizadas foram as seguintes: 94°C por 1 min, seguida por 37 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min e 72°C por 1 min e 30 s.

Alternativamente com o objetivo de se obter amplificação de um segmento de tamanho maior para caracterização dos sítios antigênicos do gene H3, foram elaborados dois outros oligonucleotídeos, um para a *nested*-PCR (H3.938.R) e outro para o sequenciamento (H3.101F). Para a *nested*-PCR, os oligonucleotídeos AH3B e H3.938.R foram utilizados. Este último foi elaborado com auxílio do programa SeqBuilder do pacote Lasergene 10 version 10 (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EUA), acrescentando-se ao oligonucleotídeo AH3CII, uma sequência não relacionada ao genoma do vírus (sublinhada).

Figura 7 - Mapa da localização aproximada dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação do gene da hemaglutinina, subtipos H1 e H3 e tipo B.

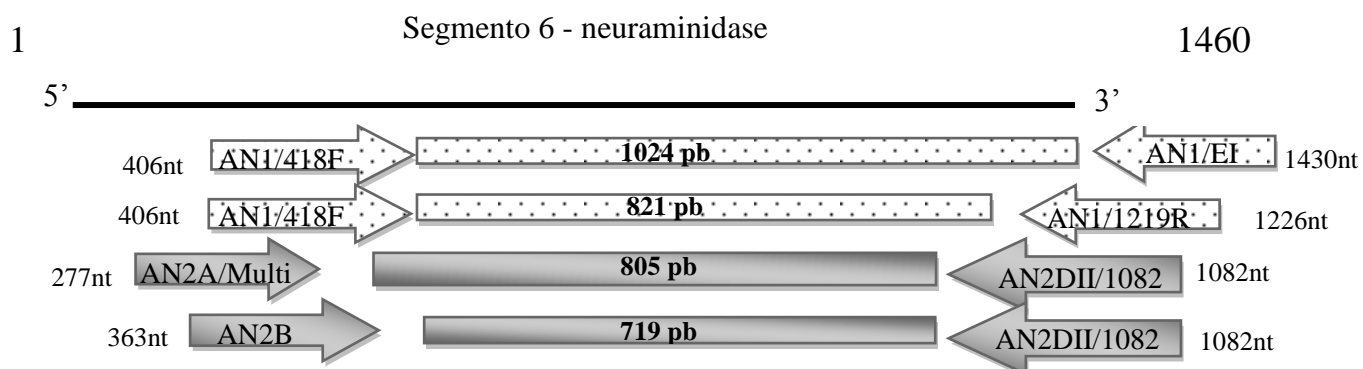


A 1ª linha representa a fita alvo, com tamanho do gene em nucleotídeos. As setas coloridas representam os oligonucleotídeos com a orientação e a posição no genoma e as linhas centrais representam os produtos da 1ª PCR e *nested*-PCR, com os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados.

3.5.3 Reação de amplificação do gene NA

As condições da primeira amplificação foram as mesmas descritas para a amplificação das sequências do gene da HA, exceto que a temperatura de anelamento utilizada foi de 55°C e os oligonucleotídeos utilizados separadamente a uma concentração final de 0,25 µM. Para a segunda amplificação, as condições também foram as mesmas da *nested*-PCR para o gene da HA, exceto os oligonucleotídeos e a temperatura de anelamento que foi de 57°C.

Figura 8 - Mapa da localização aproximada dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação do gene da neuraminidase, subtipos N1 e N2.



A 1ª linha representa a fita alvo, com tamanho do gene em nucleotídeos. As setas coloridas representam os oligonucleotídeos com a orientação e a posição no genoma e as linhas centrais representam os produtos da 1ª PCR e *nested*-PCR, com os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados.

3.6 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão tris-borato-EDTA 0,5 X (pH 8,0). Uma mistura contendo 1 µL do produto amplificado ou do marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Molecular Weight Marker XIV – Roche), 1 µL de tampão da amostra 6 X (azul de bromofenol 0,25% + glicerina 30%) e 1 µL de GelRed TM (Biotium, Hayward, CA, EUA) diluído 1:2000 foi aplicada no gel e submetida à eletroforese horizontal. Os fragmentos foram visualizados em transiluminador com luz ultravioleta. Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados para H1, H3, B, N1 e N2 foram 944 pb, 591 pb, 767 pb, 821 pb e 719 pb, respectivamente.

3.7 Purificação dos produtos de PCR

Após a amplificação, os produtos foram purificados utilizando-se o GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). Para isso, foram adicionados em um tubo, cinco volumes de tampão de ligação e um volume de produto de PCR. A solução foi homogeneizada e transferida para a coluna previamente tratada com tampão de preparo. A coluna foi centrifugada a 12.000 x g por 1 min e o eluato desprezado. Foi acrescentado à coluna 0,5 mL de tampão de lavagem e a mesma foi centrifugada à 12.000 x g por no máximo 1 min. Foram aplicados 50 µL de solução de eluição no

centro de cada coluna, que após incubação à temperatura ambiente por 1 min, foi submetida à centrifugação. O produto purificado foi armazenado a -20°C até a sua utilização. A integridade do DNA foi analisada em eletroforese de gel de agarose.

3.8 Sequenciamento nucleotídico e análise

Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento genômico em ambos os sentidos, segundo descrito por Sanger e colaboradores (1977). O sistema de reação consistiu do Kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (GE Healthcare, UK Limited, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), conforme instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos específicos foram os mesmos utilizados nas reações de *nested*-PCR (tabela 1). Brevemente, o sequenciamento foi realizado utilizando-se 20 ng do produto de PCR purificado, diluído em 4 µL de PREMIX (kit), 5 pmol de cada oligonucleotídeo e água ultra pura, totalizando um volume de 10 µL de reação para cada amostra, submetida cada uma a duas reações. A reação foi realizada em termociclador MegaBACE 1000 (GE Healthcare) nas seguintes condições: 35 ciclos de 95°C por 20 s, 60°C por 15 s e 50°C por 1 min. Finalizada a reação, as amostras foram armazenadas à -20°C.

Para a reação de sequenciamento do gene H3, foi necessário elaborar outro oligonucleotídeo (H3.101.F) utilizando o programa SeqBuilder (DNASTAR), na tentativa de se obter o sequenciamento dos cinco sítios antigênicos (A-E). Este foi utilizado juntamente com o oligonucleotídeo 3GSTRV.

3.9 Edição, alinhamento das sequências e análise de nucleotídeos

A edição das sequências foi realizada com o auxílio do programa SeqMan Pro (DNASTAR). As sequências nucleotídicas dos genes H1, H3, N1 e N2 foram comparadas com outras sequências do vírus influenza utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). O alinhamento das sequências do gene da hemaglutinina e da neuraminidase foi feito pelo método ClustalW, modo FASTA, do programa MegAlign (DNASTAR), com sequências de cepas que circularam em diferentes períodos e lugares do mundo e também com sequências daquelas que compuseram as vacinas preconizadas para o hemisfério sul em cada ano do estudo (tabela 2). As sequências nucleotídicas dos vírus caracterizados neste estudo

serão submetidas ao GenBank. As cepas das sequências de referência utilizadas para o alinhamento e seus respectivos números de acesso foram os seguintes: A/New York/399/2003(H1N1) - CY002808, A/Taiwan/30005/2004(H3N2) - DQ249261, A/Taiwan/30017/2002(H1N1) - DQ249258, A/New York/396/2005(H3N2) - CY002074 e B/Singapore/222/79 - X00897, para os genes H1, H3, N1, N2 e B, respectivamente.

Tabela 2 – Cepas dos vírus influenza subtipos A H1N1 e H3N2 e tipo B recomendadas pela OMS para composição das vacinas preconizadas para o hemisfério sul, entre 2001 e 2007.

Ano	H1N1	H3N2	B
2001	A/New Caledonia/20/99	A/Moscow/10/99	B/Sichuan/379/99 (Yam)
2002	A/New Caledonia/20/99	A/Moscow/10/99	B/Sichuan/379/99
2003	A/New Caledonia/20/99	A/Moscow/10/99	B/Hong Kong/330/2001 (Vic)
2004	A/New Caledonia/20/99	A/Fujian/411/2002	B/Hong Kong/330/2001
2005	A/New Caledonia/20/99	A/Wellington/1/2004	B/Shanghai/361/2002 (Yam)
2006	A/New Caledonia/20/99	A/California/7/2004	B/Malaysia/2506/2004 (Vic)
2007	A/New Caledonia/20/99	A/Wisconsin/67/2005	B/Malaysia/2506/2004

Yam = linhagem Yamagata; Vic = linhagem Victoria

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa Graphpad Prism 4.0 (Graphpad Software Inc. San Diego, CA, EUA) e os dados foram analisados utilizando-se o teste exato de Fisher. Nas análises comparativas os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Triagem dos vírus influenza A e B

Um total de 605 amostras clínicas foi coletado de crianças com doença respiratória aguda entre 2001 e 2010 nos serviços de saúde pública de Uberlândia. Os espécimes clínicos foram triados por IFI para detecção de sete vírus respiratórios. Trinta e sete amostras (6,1%) apresentaram resultado positivo para os vírus influenza, sendo 36 do tipo A e uma do tipo B, e das 568 amostras restantes, 376 foram negativas ou inconclusivas.

4.2 Caracterização molecular dos vírus influenza tipos A e B

Dentre as amostras negativas ou inconclusivas por IFI, 218 foram testadas pela RT-PCR para amplificação dos segmentos dos genes da HA e da NA, tendo sido possível detectar mais três amostras positivas para o vírus influenza tipo A. Deste modo, o índice de positividade para esses vírus na população foi de 6,6% (40/605). Assim, entre as 40 amostras positivas, a amplificação para HA, foi possível em 25 delas, sendo que oito foram subtipadas como H1 (figura 9A), 16 como H3 (figura 9B) e uma foi caracterizada como tipo B (figura 9C). Em relação ao gene da NA, sete espécimes foram subtipados como N1 e 24 como N2 (figura 9D). Os resultados da tipagem e subtipagem estão apresentados na tabela 3.

Do total das amostras clínicas positivas, a maioria (33/40; 82,5%) foi obtida de crianças não hospitalizadas, cuja mediana de idade foi de 14,5 meses, variando entre um e 60 meses. Os sete casos hospitalizados tinham até três anos de idade (mediana de quatro meses), sendo que cinco deles não apresentavam doença de base – comprometimento da função cardíaca, pulmonar ou imune (dados não mostrados). O A/H3N2 foi o subtipo identificado em cinco desses sete pacientes. O maior número de casos de influenza ocorreu em crianças com idade entre um e dois anos (17/40; 42,5%) (figura 10) e pertencentes ao gênero masculino (26/40; 65%) ($p=0,013$).

Os casos de influenza em Uberlândia tiveram seus picos em julho e variaram de fevereiro a setembro no período de estudo, sendo que a maioria deles foi encontrada no ano de 2002 (figura 11).

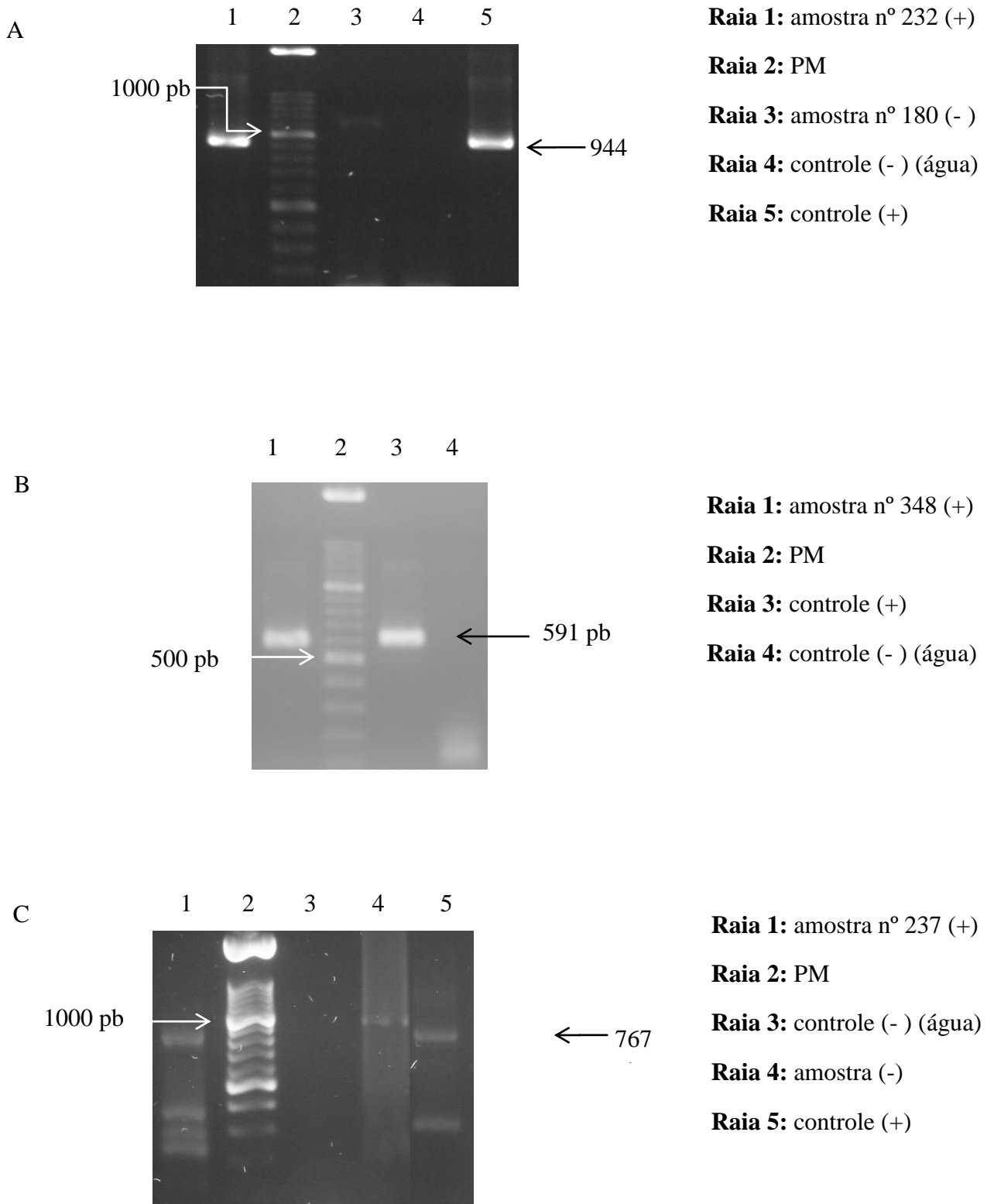
Tabela 3- Dados demográficos sobre os pacientes e os espécimes clínicos positivos para os vírus influenza coletados em Uberlândia, MG e isolados com maior identidade no segmento sequenciado da HA e da NA respectivamente, de 2001 a 2010.

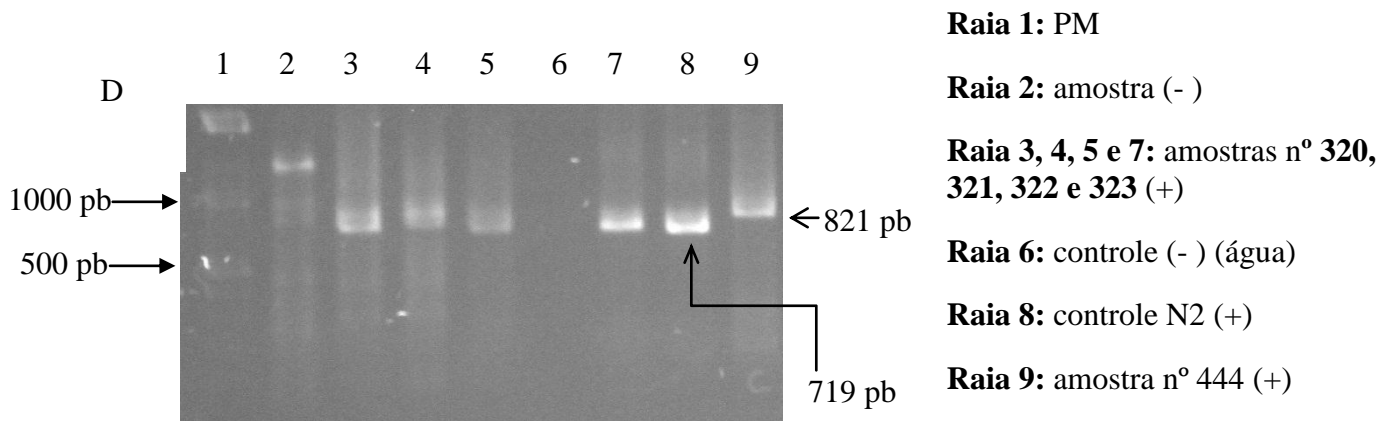
Número amostra	Data coleta (dd-mm-aa)	Idade (meses)	Gênero	Procedência	Tipo/subtipo	Isolado > identidade HA (% nucleotídeos; % aminoácidos)	Isolado > identidade NA (% nucleotídeos; % aminoácidos)
35	19/03/2001	12	F	PAP	A		
76	14/05/2001	18	M	PAP	A		
85	23/05/2001	7	M	PAP	A		
86	24/05/2001	19	F	PAP	A		
110	24/06/2001	23	M	PS-Ped (hosp)	A H3N2	A/RiodeJaneiro/465/01 (H3N2) (99,1; 97,9)	A/Missouri/NHRC0001/2000(H3N2) (99,5; 99,5)
180	02/05/2002	4	M	PAP	A N2		
185	09/05/2002	8	F	PAP	A N1		
188	16/05/2002	14	M	PAP	A		
191	21/05/2002	30	M	PS-Ped	A		
193	24/05/2002	3	M	ENF-Ped	A N1		
194	29/05/2002	15	M	PS-Ped	A N1		
212	25/06/2002	14	F	PAP	A		
213	01/07/2002	24	F	PAP	A H1N2	A/New York/78/2002 (H1N2) (98,9; 97,8)	A/Hawaii/10/2002(H1N2) (100,0; 100,0)
214	02/07/2002	60	M	PAP	A H1N2	A/New York/78/2002 (H1N2) (99,8; 100,0)	A/Hawaii/10/2002(H1N2) (100,0; 100,0)
215	03/07/2002	20	F	PAP	A H1N2	A/New York/78/2002 (H1N2) (99,8; 100,0)	A/Hawaii/10/2002(H1N2) (100,0; 100,0)
221	16/07/2002	3	M	PAP	A H3N2	A/Denmark/6/2002 (H3N2) (99,5; 98,9)	A/Netherlands/120/2002(H3N2) (99,8; 99,4)
223	18/07/2002	22	M	PAP	A		
228	24/07/2002	34	M	PAP	A H1N2	A/1660/02/2002 (H1N2) (99,8; 100,0)	A/Hawaii/10/2002(H1N2) (100,0; 100,0)
232	01/08/2002	5	F	PAP	A H1N2	A/New York/78/2002 (H1N2) (99,6; 99,5)	A/Hawaii/10/2002(H1N2) (99,8; 100,0)
235	12/08/2002	48	F	PAP	A H1N2	A/New York/78/2002 (H1N2) (99,5; 98,9)	A/Hawaii/10/2002(H1N2) (100,0; 100,0)
237	26/08/2002	12	F	PAP	B	B/RiodeJaneiro/209/02 (99,8; 100,0)	
241	17/09/2002	14	M	PAP	A H1N2	A/New York/78/2002 (H1N2) (99,8;100,0)	A/Hawaii/10/2002(H1N2) (99,4; 98,8)
249	06/02/2003	9	M	PAP	A H3N2	A/EspiritoSanto/88/02 (H3N2)	A/New York/409/2002(H3N2) (99,7; 99,2)

						(99,3; 98,4)	
320	01/07/2003	36	F	PAP	A H3N2	A/Brazil/BR-IAL-2302/2005 (H3N2) (98,8; 98,2)	A/Denmark/4/2002(H3N2) (99,7; 99,2)
321	01/07/2003	18	M	PAP	A H3N2	A/Texas/NHRC0001/2002 (H3N2) (99,2; 98,3)	A/Denmark/4/2002(H3N2) (99,7; 99,2)
322	03/07/2003	8	M	PAP	A H3N2	A/Dunedin/12/2002 (H3N2) (99,1; 98,4)	A/New York/409/2002(H3N2) (100,0;100,0)
323	09/07/2003	35	M	PS-Ped (hosp)	A H3N2	A/Bangladesh/C5-16/2003 (H3N2) (99,6; 100,0)	A/Netherlands/213/2003(H3N2) (100,0; 100,0)
330	02/03/2004	17	F	PAP	A H3N2	A/Brazil/BR-IAL-2302/2005 (H3N2) (99,6; 99,5)	A/Finland/303/2003 (H3N2) (99,6; 100,0)
333	10/03/2004	8	M	UTI-Ped	A H3N2	A/Paraguay/PY-697/2004 (H3N2) (99,8; 100,0)	A/Scotland/81/2003(H3N2) (100,0; 100,0)
339	24/03/2004	24	M	PAP	A H3N2	A/RiodeJaneiro/17/04 (H3N2) (99,5; 99,5)	A/England/558/2003(H3N2) (99,6; 98,9)
341	29/03/2004	14	M	PAP	A H3N2	A/Brazil/BR-1898-ORIGINAL/2006 (H3N2) (99,7; 99,5)	A/SANTIAGO/9491/2006(H3N2) (100,0; 100,0)
348	14/04/2004	35	F	PAP	A H3N2	A/StaCatarina/380/04 (H3N2) (100,0; 100,0)	A/England/558/2003(H3N2) (99,6; 100,0)
363	27/05/2004	1	F	Berçário	A H3N2	A/Argentina/AG-R126-04/2004 (H3N2) (99,3; 99,0)	-
412	08/07/2005	6	F	UAI Roosevelt	A H3N2	A/Texas/TX-VC4-775/2004 (H3N2) (99,8; 100,0)	A/Niigata/494/2005(H3N2) (99,3; 98,7)
435	24/05/2006	55	M	UAI Pampulha	A N1		
442	19/06/2006	24	M	UAI Pampulha	A N1		
444	28/06/2006	2	M	UTI-Ped	A H1N1	A/Juliaca/FLU3973/2006 (H1) (99,8; 99,5)	A/Tennessee/UR06-0236/2007(H1N1) (99,1; 98,8)
452	24/07/2006	27	M	PAP	A H3N2	A/Brazil/BR-1898-ORIGINAL/2006(H3N2) (100,0; 100,0)	A/California/NHRC0007/2005(H3N2) (99,6; 99,4)
490	06/07/2007	4	M	UTI-Ped	A H3N2	A/Maracay/FLU7827/2007 (H3N2) (100,0; 100,0)	A/Brazil/80/2007(H3N2) (100,0; 100,0)
531	27/04/2009	4	M	UAI Pampulha	A N1		

F: feminino; M: masculino; hosp: hospitalizado; PAP: pronto atendimento pediátrico; PS-Ped: pronto-socorro de pediatria; ENF-Ped: enfermaria de pediatria; UTI-Ped: unidade de terapia intensiva pediátrica; UAI: unidade de atendimento integrado.

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da *nested*-PCR





A) amplificação do segmento de 944 bp do gene HA₁ do vírus influenza A H1; B) amplificação do segmento de 591 bp do gene HA₁ do vírus influenza A H3; C) amplificação do segmento de 767 bp do gene HA₁ do vírus influenza B; D) amplificação do segmento de 821 pb e 719 pb, dos genes N1 e N2, respectivamente, do vírus influenza A. PM: marcador de peso molecular 100pb.

Figura 10 - Distribuição dos casos de influenza em Uberlândia de 2001 a 2010, conforme a faixa etária.

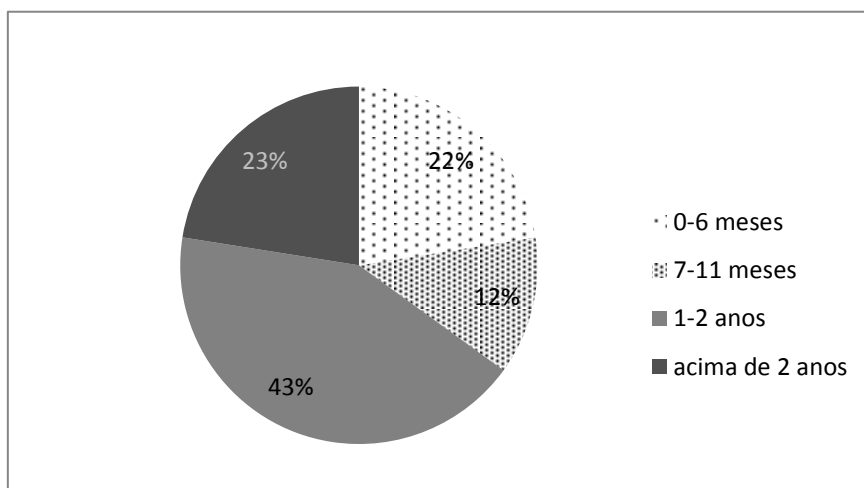
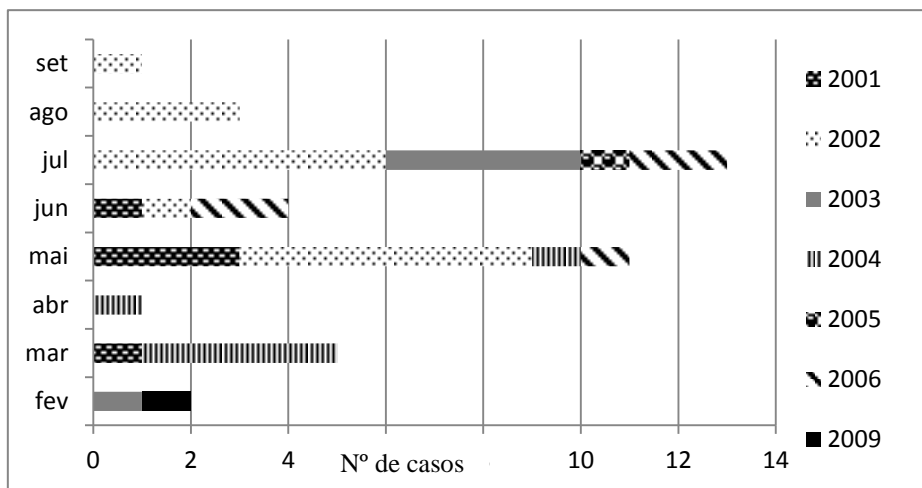
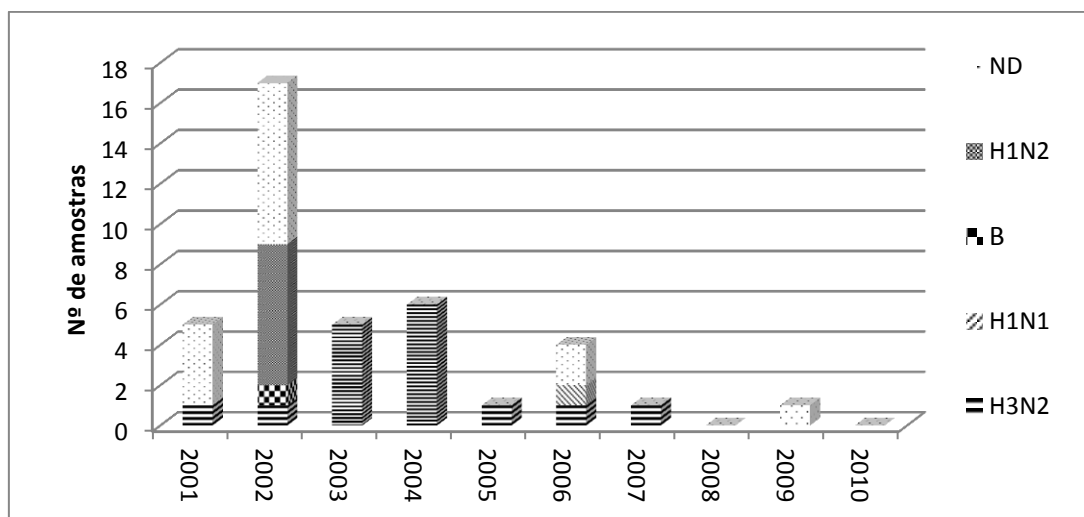


Figura 11 - Distribuição mensal dos casos de influenza em Uberlândia de 2001 a 2010.



A subtipagem dos vírus influenza revelou que 40% (16/40), 17,5% (7/40), 2,5% (1/40) e 2,5% (1/40) das infecções foram atribuídas aos subtipos H3N2, H1N2, H1N1 e ao tipo B, respectivamente (figura 12). Os vírus influenza H1N2, H3N2 e B foram encontrados simultaneamente em Uberlândia durante a temporada de 2002. Ainda naquele ano, foram identificadas três amostras com vírus do subtipo N1 e uma do subtipo N2. O subtipo viral N1 também circulou nos anos de 2006 e 2009. Os vírus de oito amostras não puderam ser subtipados por nenhum dos protocolos de amplificação (HA e NA) utilizados neste estudo.

Figura 12 - Distribuição dos tipos/subtipos dos vírus influenza identificados, conforme o ano de coleta.



ND = não determinado.

4.3 Análise comparativa dos genes da hemaglutinina e da neuraminidase do vírus influenza

Para uma caracterização mais aprofundada dos vírus influenza encontrados na região de Uberlândia, produtos de PCR das 25 amostras subtipadas pela HA e 24 pela NA foram purificados e sequenciados. As sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas à procura de sequências altamente similares através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Foi observado que todas as sequências das cepas encontradas em Uberlândia apresentaram altos valores de identidade com sequências que circularam em diferentes regiões do mundo, conforme Genbank.

Dentre as oito amostras de vírus influenza subtipo H1, foram obtidas sequências nucleotídicas e de aminoácidos, de todas. Seis delas (213, 214, 215, 228, 232 e 241) quando comparadas entre si, compartilharam sequências quase idênticas umas com as outras. Realizando a busca pelo BLAST, foi possível observar que as sequências deduzidas de aminoácidos das amostras de 2002 (214, 215, 228 e 241) foram idênticas a um isolado que circulou nos EUA no mesmo ano (tabela 3). Ao se comparar as sequências dos vírus H1 circulantes em Uberlândia, com a sequência da cepa vacinal, A/New Caledonia/20/99, observou-se maior identidade de nucleotídeos (98,5%) com a amostra 214, sendo que a identidade de aminoácidos (98,2%) foi idêntica para todas as obtidas no ano de 2002, exceto para a amostra 235. Por outro lado, a amostra 444 de 2006, apresentou a menor identidade (97,3 e 97,2%, respectivamente). Todas as sequências de H1 continham alterações no sítio antigênico Ca₁, enquanto que, apenas as amostras de 2002 apresentaram uma alteração adicional no sítio Sb.

Das amostras de vírus influenza identificadas como H3, foram obtidas sequências nucleotídicas de 16. Porém, por meio do BLAST, somente três amostras (348, 452 e 490) apresentaram sequências idênticas a isolados, caracterizados anteriormente na América do Sul (tabela 3). Esses vírus circularam nos mesmos anos das cepas encontradas neste estudo. Outras três amostras (323, 333 e 412) tiveram suas sequências deduzidas de aminoácidos idênticas a isolados encontrados no mesmo ano ou em ano imediatamente anterior.

As sequências deduzidas de aminoácidos do domínio HA₁ dos vírus influenza A H3 foram comparadas à sequência da cepa H3N2 (A/Moscow/10/99), que compôs a vacina distribuída de 2001 a 2003 (figura 14). A maior identidade nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos foi observada com a amostra 321 (96,7% e 93,2%, respectivamente), enquanto que a menor identidade foi observada com a amostra 323 (94,5% e 89,0%, respectivamente). Todas as sequências de H3 dos vírus encontrados em Uberlândia durante o período 2001-2003 apresentaram substituições nos sítios antigênicos B e E, o que também foi observado para alguns vírus de outros continentes. E algumas delas também exibiram trocas adicionais nos sítios antigênicos A, C e D. Além disso, a maioria das sequências continha substituições em três dos cinco sítios antigênicos. As amostras 110 e 323 foram aquelas que mostraram maior número de substituições nos sítios antigênicos, enquanto que as amostras 221, 320 e 322,

apresentaram trocas em quatro dos cinco sítios antigênicos. Alterações nas posições 105 na sequência da amostra 221 (dados não apresentados), e 144 na sequência da amostra 323, conferiram possíveis sítios extras de N-glicosilação nesses vírus.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos dos seis vírus detectados em Uberlândia em 2004 foram quase idênticas e quando comparadas à cepa da vacina A/Fujian/411/2002, a amostra 330 mostrou a mais alta identidade (98,6% e 98,4%) baseada nos nucleotídeos e nos aminoácidos, respectivamente. Por outro lado, a amostra 341 apresentou a menor identidade (96,7% e 95,3%), também respectivamente. Comparando-se à cepa vacinal, a maioria das cepas de Uberlândia (figura 15), exibiu duas variações de aminoácidos no sítio B. Além disso, a cepa 341 apresentou uma mudança no sítio A e outra no sítio B e a troca do aminoácido valina por isoleucina no sítio de ligação com o ácido siálico. Foi observada em todas as amostras uma substituição no sítio de ligação com o receptor.

A sequência do vírus influenza H3 (isolado 412) de 2005 apresentou alta identidade de nucleotídeos e de aminoácidos, respectivamente (99,1% e 98,9%) em relação à cepa vacinal A/Wellington/1/2004, distribuída no mesmo ano. Também exibiu um aminoácido diferente (figura 16) no sítio A. Outro aminoácido no sítio de ligação com o ácido siálico da amostra 412 também diferiu da cepa vacinal.

A comparação entre as sequências da amostra 452 de 2006 com as sequências da cepa vacinal A/California/7/2004, mostrou 97,8% e 97,3% de identidade dos nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente. A amostra de Uberlândia apresentou três substituições no sítio antigênico B comparados à cepa vacinal (figura 17). O aminoácido no sítio de ligação com o ácido siálico terminal do vírus foi I-226, como ocorreu no ano anterior, mas revelou similaridade com a cepa da vacina.

As sequências do vírus influenza H3 (amostra 490) de 2007 foram comparadas às sequências da vacina A/Wisconsin/67/2005, recomendada para aquele ano. A sequência de Uberlândia apresentou alta identidade de nucleotídeos e de aminoácidos (98,6% e 96,3%, respectivamente), mas exibiu duas substituições, uma no sítio A e outra no sítio E (figura 18). Um sítio extra de N-glicosilação foi observado na posição 122 da sequência. Além disso, o resíduo de aminoácido 226 foi isoleucina, como os isolados prévios.

A única amostra de vírus influenza do tipo B, caracterizada pela HA₁, teve sua sequência deduzida de aminoácidos idêntica a um isolado encontrado no mesmo ano, no Brasil (tabela 3). As sequências deste vírus foram comparadas às sequências da cepa vacinal (B/Sichuan/379/99-linhagem Yamagata), utilizada no mesmo ano (figura 19) e apresentaram diferenças em relação aos resíduos da vacina (88,1% e 86,2%, de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente). Também se observou seis substituições no alça 120, uma no alça 160 e quatro na região da hélice 190. Além disso, nosso estudo revelou que a sequência do vírus influenza B aqui encontrado adquiriu um códon a mais (AAC), que codifica para o aminoácido 162. Em adição, dois novos sítios de N-glicosilação foram observados; um deles na região da hélice 190 e outro na posição 230-232, e o aminoácido de ligação ao ácido siálico terminal foi P-238 e S-240.

A sequência nucleotídica da amostra de vírus influenza (444) caracterizada como N1 apresentou a maior porcentagem de identidade com uma cepa que circulou no ano posterior no hemisfério norte (tabela 3). A sequência de nucleotídeos e a sequência deduzida de aminoácidos deste vírus quando comparadas à cepa vacinal A/New Caledonia/20/99 (vacina liberada de 2000 a 2007) mostraram identidade de 98,3 e 98%, respectivamente e os resíduos de aminoácidos divergentes estão representados na tabela 4.

Também um total de 22 sequências nucleotídicas da N2 dos vírus H3N2 e H1N2 foram obtidas e analisadas pelo BLAST. Dessas amostras, 10 (213, 214, 215, 228, 235, 322, 323, 333, 341 e 490) apresentaram sequências idênticas a isolados encontrados no mesmo ano ou em ano imediatamente anterior; exceto a sequência da amostra 341 que foi idêntica à sequência de uma cepa que circulou dois anos depois, no hemisfério sul (tabela 3).

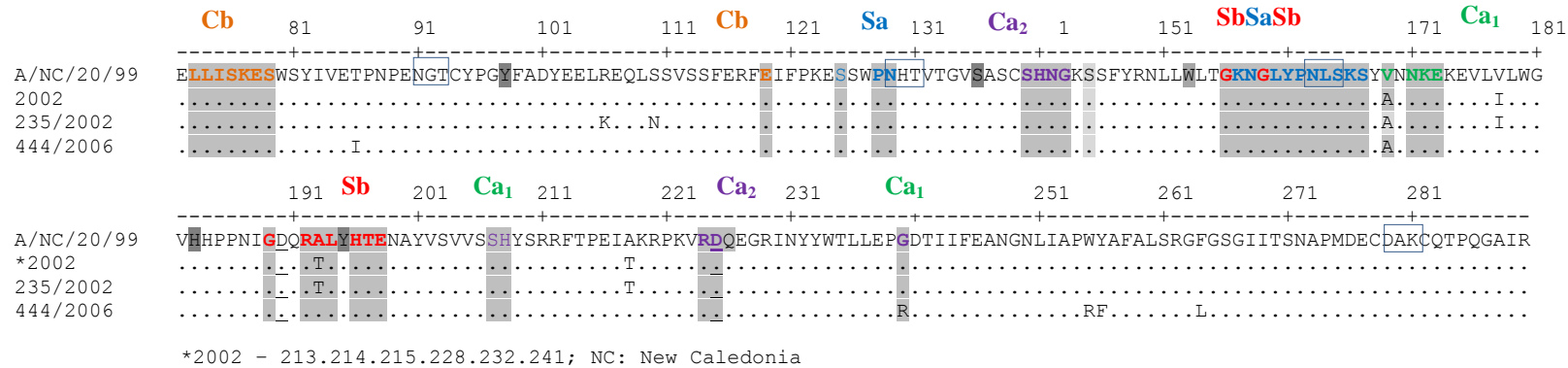
Outras três amostras (232, 330, 348) tiveram suas sequências deduzidas de aminoácidos idênticas a isolados encontrados no mesmo ano ou em ano imediatamente anterior.

Quando as sequências deduzidas de aminoácidos da N2 dos vírus influenza A foram comparadas às sequências das cepas vacinais, A/Moscow/10/99 (liberada de 2000 a 2003) e outras (distribuídas nos anos posteriores), observou-se maior identidade com a amostra 452 (98,9% e 99,4%, respectivamente) de 2006, enquanto que as menores

identidades foram observadas com as amostras 320 e 321 (97,7% e 96,9%, respectivamente) obtidas em 2003. Os resíduos de aminoácidos divergentes estão representados na tabela 5.

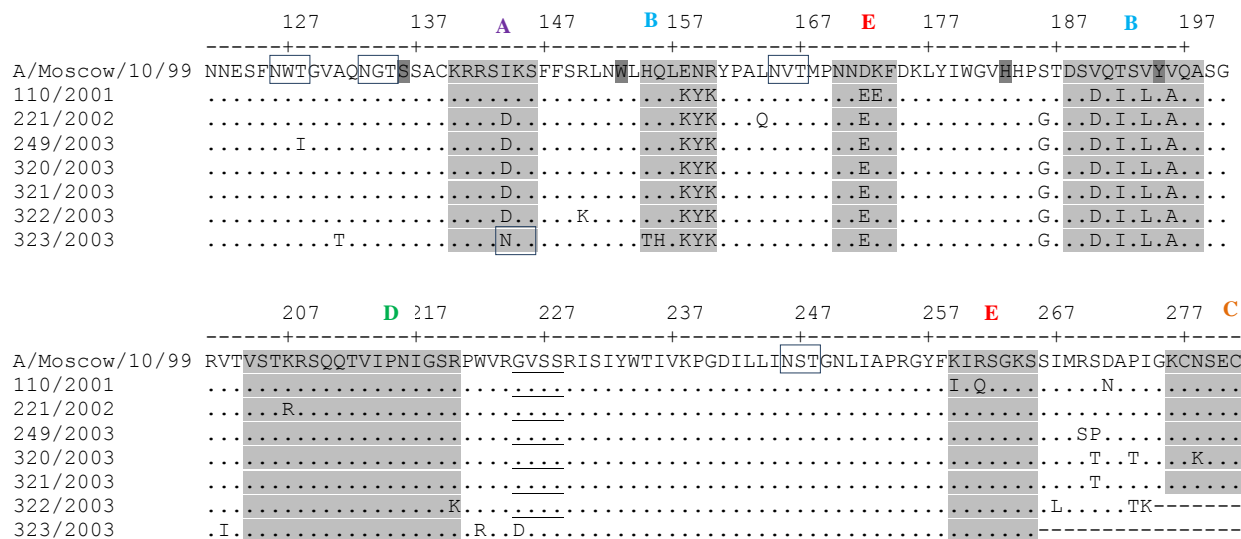
As análises da NA do H1N1 e H3N2 mostraram que os resíduos de aminoácidos dentro dos sítios catalíticos e *framework* foram conservados em todos os vírus (a composição dos sítios catalíticos foi R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371, e Y406 e a composição do *framework* foi E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294 e E425. Nenhuma das cepas isoladas apresentou as conhecidas mutações de resistência na NA, nas posições 151, 152, 222, 224, 274, 276, 292 e 294.

Figura 13 - Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos do domínio HA₁ dos vírus H1N2 e H1N1 detectados em Uberlândia em 2002 e 2006, respectivamente com a cepa vacinal A/New Caledonia/20/99 (número de acesso AJ344014).



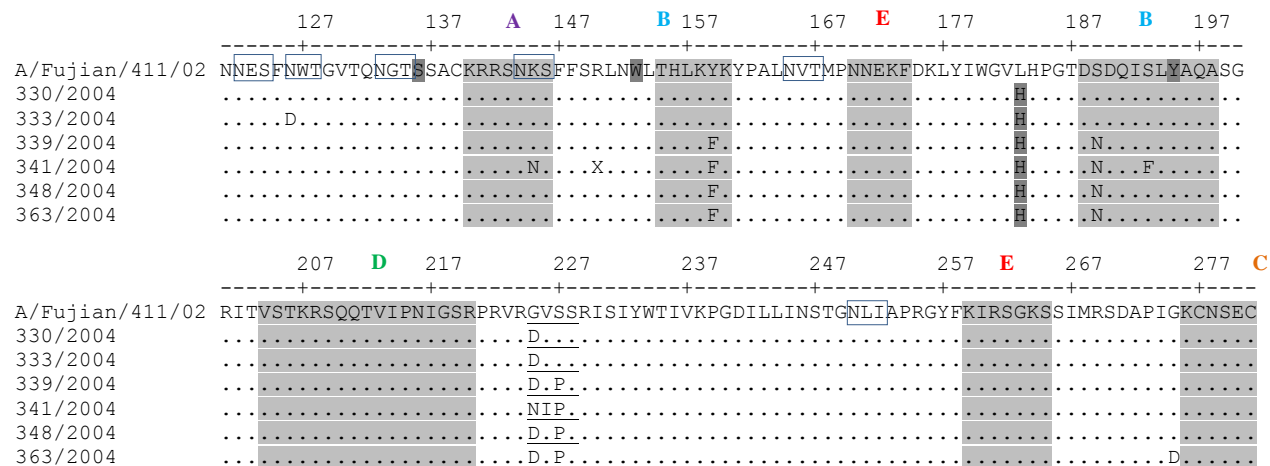
Os sítios de glicosilação estão marcados por caixas abertas; os resíduos envolvidos na ligação com receptor estão com sombreados escuros; os de ligação com ácido siálico estão grifados; e os sítios antigênicos aparecem com sombreados claros denominados de Ca₁, Ca₂, Cb, Sa e Sb. Resíduos idênticos àqueles da seqüência da vacina para a mesma posição estão representados por pontos; e aqueles divergentes estão mostrados. A numeração acima do alinhamento representa a posição dos resíduos de aminoácidos da proteína H1 de acordo com a seqüência de referência A/New York/399/2003(H1N1).

Figura 14 - Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos do domínio HA₁ dos vírus H3N2 detectados em Uberlândia entre 2001 e 2003, com a cepa vacinal A/Moscow/10/99 (número de acesso DQ487341).



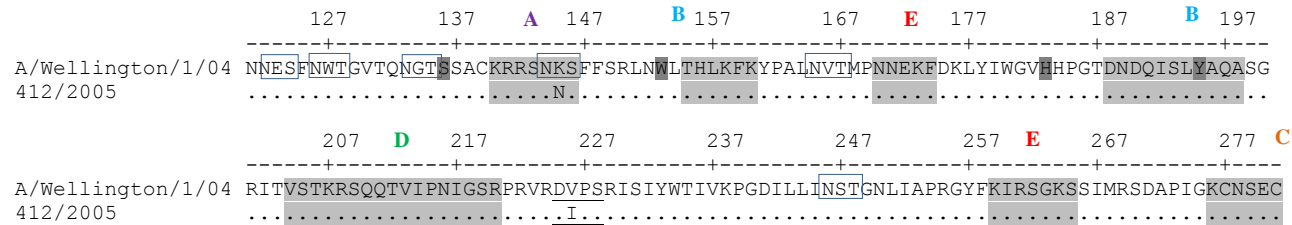
Os sítios de glicosilação estão marcados por caixas abertas; os resíduos envolvidos na ligação com receptor estão com sombreados escuros; os de ligação com ácido siálico estão grifados; e os sítios antigênicos aparecem com sombreados claros denominados de A-E. Resíduos idênticos àqueles da seqüência da vacina para a mesma posição estão representados por pontos; aqueles divergentes estão mostrados; e regiões não sequenciadas, representadas por traços. A numeração acima do alinhamento representa a posição dos resíduos de aminoácidos da proteína H3 de acordo com a seqüência de referência A/Taiwan/30005/2004(H3N2).

Figura 15 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do domínio HA₁ dos vírus H3N2 detectados em Uberlândia em 2004, com a cepa vacinal A/Fujian/411/2002 (número de acesso CY112933).



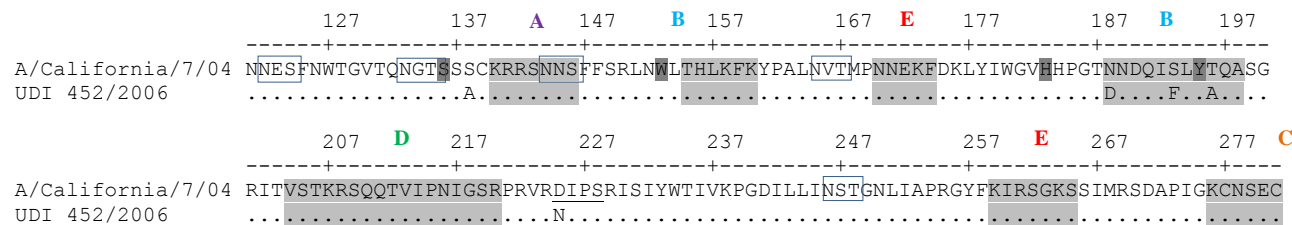
Os sítios de glicosilação estão marcados por caixas abertas; os resíduos envolvidos na ligação com receptor estão com sombreados escuros; os de ligação com ácido siálico estão grifados; e os sítios antigênicos aparecem com sombreados claros denominados de A-E. Resíduos idênticos àqueles da sequência da vacina para a mesma posição estão representados por pontos; aqueles divergentes estão mostrados; e regiões não sequenciadas, representadas por traços. A numeração acima do alinhamento representa a posição dos resíduos de aminoácidos da proteína H3 de acordo com a sequência de referência A/Taiwan/30005/2004(H3N2).

Figura 16 - Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos do domínio HA₁ do vírus H3N2 detectado em Uberlândia em 2005, com a cepa vacinal A/Wellington/1/2004 (número de acesso CY012104).



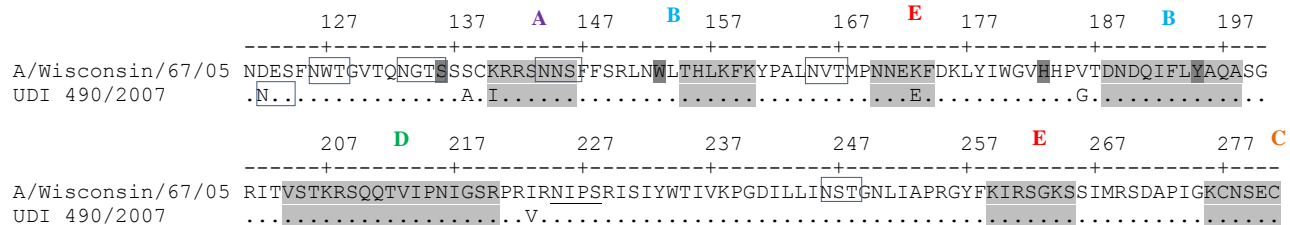
Os sítios de glicosilação estão marcados por caixas abertas; os resíduos envolvidos na ligação com receptor estão com sombreados escuros; os de ligação com ácido siálico estão grifados; e os sítios antigênicos aparecem com sombreados claros denominados de A-E. Resíduos idênticos àqueles da seqüência da vacina para a mesma posição estão representados por pontos; e aqueles divergentes estão mostrados. A numeração acima do alinhamento representa a posição dos resíduos de aminoácidos da proteína H3 de acordo com a seqüência de referência A/Taiwan/30005/2004(H3N2).

Figura 17 - Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos do domínio HA₁ do vírus H3N2 detectado em Uberlândia em 2006, com a cepa vacinal A/California/7/2004 (número de acesso CY114373).



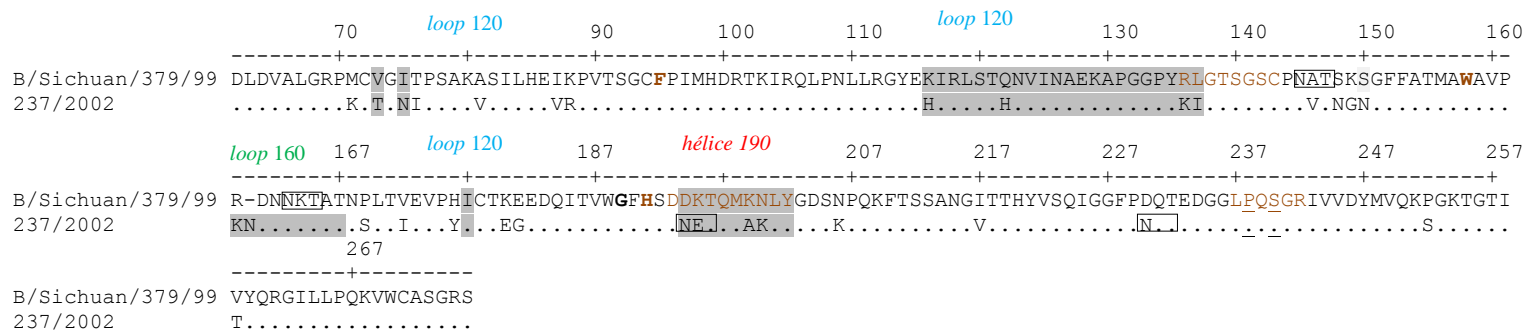
Os sítios de glicosilação estão marcados por caixas abertas; os resíduos envolvidos na ligação com receptor estão com sombreados escuros; os de ligação com ácido siálico estão grifados; e os sítios antigênicos aparecem com sombreados claros denominados de A-E. Resíduos idênticos àqueles da seqüência da vacina para a mesma posição estão representados por pontos; e aqueles divergentes estão mostrados. A numeração acima do alinhamento representa a posição dos resíduos de aminoácidos da proteína H3 de acordo com a seqüência de referência A/Taiwan/30005/2004(H3N2).

Figura 18 - Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos do domínio HA₁ do vírus H3N2 detectado em Uberlândia em 2007, com a cepa vacinal A/Wisconsin/67/2005 (número de acesso CY114381).



Os sítios de glicosilação estão marcados por caixas abertas; os resíduos envolvidos na ligação com receptor estão com sombreados escuros; os de ligação com ácido siálico estão grifados; e os sítios antigênicos aparecem com sombreados claros denominados de A-E. Resíduos idênticos àqueles da seqüência da vacina para a mesma posição estão representados por pontos; e aqueles divergentes estão mostrados. A numeração acima do alinhamento representa a posição dos resíduos de aminoácidos da proteína H3 de acordo com a seqüência de referência A/Taiwan/30005/2004(H3N2).

Figura 19 - Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos do domínio HA₁ do vírus influenza B detectado em Uberlândia em 2002 com a cepa vacinal B/Sichuan/379/99 (número de acesso EF566113).



Os sítios de glicosilação estão marcados por caixas abertas; os resíduos envolvidos na ligação com receptor estão com letra marrom; os de ligação com ácido siálico estão grifados; e os sítios antigênicos aparecem com sombreados claros denominados de alça e hélice. Resíduos idênticos àqueles da seqüência da vacina para a mesma posição estão representados por pontos; e aqueles divergentes estão mostrados. A numeração acima do alinhamento representa a posição dos resíduos de aminoácidos da proteína HA de acordo com a seqüência de referência B/Singapore/222/79.

Tabela 4 – Comparação da sequência da neuraminidase de subtipo N1 do vírus encontrado em Uberlândia em 2006 com cepa vacinal A/New Caledonia/20/99 (número de acesso AJ518092).

Cepa viral	Sítios de variação dos aminoácidos				
	187	286	331	374	377
A/New Caledonia/20/99	M	T	E	W	N
444/2006	K	K	K	R	Y

Tabela 5 – Comparação das sequências da neuraminidase de subtipo N2 dos vírus encontrados em Uberlândia entre 2001 e 2007 com cepas das vacinas disponibilizadas nos anos/períodos correspondentes.

Cepa viral /ano	Sítios de variação dos aminoácidos																			
	133	141	150	160	167	172	194	199	216	221	250	254	265	267	271	285	298	307	310	332
A/Moscow/10/99^a	N		M	P	K	V	E	G	K	A	I	T	P	S	P	G	V	Y		
110/2001		D		L																
* /2002		N					K						L							
221/2002		N			R		K					I	T							
241/2002		N		K			K						L			C				
249.322/2003								G	K			I	T	S					V	
320.321/2003								G	N			I	T	N					V	
323/2003								V	K			T	T	S					I	
A/Fujian/411/2002^b										A		T						I	S	
330.333/2004										A		I						V	F	
341.348/2004										A		T						I	S	
339/2004										T		T						I	S	
A/Wellington/1/2004^c	A									K		I							Y	
412/2005	G									E		V							W	
A/California/7/2004^d						K														
452/2006						R														
A/Wisconsin/67/2005^e		H				V										L			Y	
490/2007		R				I										P			H	

*Amostras de Uberlândia (213, 214, 215, 228, 232, 235); ^aDQ487331; ^bCY112935; ^cEF512573; ^dCY114375; ^eCY114383

5. DISCUSSÃO

O conhecimento de que epidemias anuais de gripe em regiões tropicais são diferentes do observado em regiões temperadas (COX; SUBBARAO, 2000), acrescido da disponibilidade de parte das amostras clínicas resultantes de um estudo prévio, em vírus respiratórios, (COSTA *et al.*, 2006) e ainda, o fato de que até o presente não se conhecia o padrão de cepas dos vírus influenza circulantes em Uberlândia, despertou para este estudo. Assim, sua circulação foi investigada pela análise de 605 amostras clínicas provenientes de crianças apresentando doença respiratória aguda, durante um período de dez anos em Uberlândia. Os vírus encontrados foram caracterizados e comparados com outras cepas.

Pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI), 6,1% dos espécimes clínicos foram positivos para os vírus influenza, sendo que um percentual similar (6,3%) também foi observado em um estudo no nordeste do Brasil empregando-se a mesma técnica (MOURA; PERDIGÃO; SIQUEIRA, 2009). Ainda no nosso país, outros trabalhos realizados com amostras clínicas de crianças, utilizando-se a IFI, o isolamento em cultura celular e/ou a RT-PCR, relataram índices menores de infecção por esse agente, variando de 1,2% a 5,0% (COELHO *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2007; THOMAZELLI *et al.*, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). Possivelmente, essas frequências de doenças respiratórias provocadas pelo vírus influenza estejam associadas à faixa etária, uma vez que, em estudos com indivíduos adultos, taxas maiores (17,6% - 40,0%) de casos de influenza foram relatadas (CARRARO *et al.*, 2007; de MELLO FREITAS, 2013). Ainda assim, apesar de frequências mais baixas, é importante ressaltar o papel das crianças na disseminação do vírus influenza na comunidade, pois elas excretam o vírus por mais tempo e em maior quantidade que os adultos (GLEZEN, 2008).

A gripe é considerada uma das principais doenças respiratórias febris em crianças na comunidade e, em especial durante a fase de pico está associada a um considerável aumento da taxa de morbidade. Com relação à hospitalização, a maioria dos casos (82,5%) deste estudo não requereu tal medida, ficando restrita ao atendimento ambulatorial, o que está em concordância com outras pesquisas (TSAI *et al.*, 2001; MOURA; PERDIGÃO; SIQUEIRA, 2009). Todos os casos que requereram internação,

embora não estatisticamente significante, foram de crianças menores de três anos de idade, sendo que a maioria delas não tinha doença de base. Este achado está de acordo com outros estudos que mostram que lactentes e crianças de tenra idade têm risco aumentado de hospitalização em infecções causadas pelo vírus influenza (PERROTTA; DECKER; GLEZEN, 1985; SUGAYA *et al.*, 2000). Além disso, a doença também tem um impacto significativo sobre as famílias das crianças enfermas, podendo causar a infecção de outros membros, aumentar os gastos com a saúde e levar à ausência no trabalho por parte dos pais (NEUZIL; HOHLBEIN; ZHU, 2002; PRINCIPI *et al.*, 2003). Ainda, o uso desnecessário e excessivo de antibióticos, que pode contribuir para resistência antimicrobiana é outro fator de impacto negativo em saúde pública (KLEIN *et al.*, 2007).

Apesar de os dados da literatura descreverem que a PCR apresenta maior sensibilidade do que a IFI (GILBERT *et al.*, 1996; ELLIS; FLEMING; ZAMBON, 1997; HERRMANN; LARSSON; ZWEYGBERG, 2001), neste estudo, nem todas as amostras que foram positivas para os vírus influenza por IFI foram positivas por RT-PCR. Um dos principais motivos da menor correspondência da RT-PCR, provavelmente, foi a degradação do RNA pelo armazenamento das amostras por longo período (STONE *et al.*, 2004), principalmente daquelas armazenadas em freezer -70 °C por cerca de 10 anos. Além disso, segundo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2012a), os melhores espécimes do trato respiratório superior para se detectar o RNA desses agentes por ensaios moleculares são de *swabs* nasais de rayon, lavados e principalmente aspirados de nasofaringe, sendo que os *swabs* com haste de madeira contendo algodão não são aconselháveis para a coleta da amostra respiratória, pois podem interferir com a RT-PCR. Nos primeiros anos desta investigação, além do aspirado de nasofaringe, também foram colhidos *swabs* nasais dos pacientes utilizando-se hastes de madeira e algodão, o que poderia ter contribuído para a falha na detecção do RNA viral dessas amostras.

Os casos de influenza detectados nesta pesquisa ocorreram entre o final do verão (fevereiro) e o final do inverno (setembro) e este período foi semelhante aos dados reportados por Carraro e colaboradores (2008) durante a temporada de influenza entre 2001 e 2003 na cidade de São Paulo. Além disso, o número de casos de gripe no período entre 2001 e 2003 em Uberlândia foi maior do que em outros períodos,

corroborando com as altas taxas de morbidade relacionadas a essa virose reportadas por outros autores nesses anos (WILKENS *et al.*, 2003; MILNE *et al.*, 2004) e que retratam a maior procura dos pais por unidades de assistência à saúde para o tratamento das crianças.

Geralmente, H1N1 e H3N2 são os subtipos do vírus influenza A mais encontrados em casos de infecções em humanos (BARR *et al.*, 2010) e os H3N2 têm sido dominantes na maioria dos anos, desde que emergiram em 1968 (FINKELMAN *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2008; ZARAKET *et al.*, 2009). Ainda, este subtipo vinha causando infecções respiratórias mais graves, até a emergência do novo vírus influenza H1N1 de origem suína em 2009, responsável pela primeira pandemia do século XXI (ZIMMER e BURKE, 2009). Em Uberlândia, o H3N2 também predominou – com 16 das amostras caracterizadas - além de ter sido o responsável pela maioria das internações, embora este dado não tenha sido estatisticamente significativo ($p=0,094$).

Há referências de que os vírus dos subtipos H1N1 e H3N2, desde 1977, têm cocirculado com o vírus influenza B (WEBSTER *et al.*, 1992; KUSZEWSKI; BRYDAK, 2000; PARIANI *et al.*, 2008; NJOUOM *et al.*, 2010). A cocirculação também foi encontrada na temporada de 2002 deste estudo, porém com o subtipo H1N2, ao invés do H1N1, sendo que o vírus influenza B foi detectado em um único espécime clínico. Chieochansin e colaboradores (2008) também encontraram apenas um caso envolvendo o vírus influenza B, quando analisaram 302 amostras coletadas de pacientes pediátricos hospitalizados na Tailândia. É provável que uma quarta variante viral, a H1N1, também tenha circulado em 2002, pois, apesar de o RNA da HA não ter sido detectado, as sequências da NA de três amostras clínicas foram caracterizadas como sendo do subtipo N1.

Com relação ao biênio 2001-2002, dados da Organização Mundial da Saúde mostraram que a maioria dos casos em surtos e epidemias daquela temporada foi causada pelo vírus de subtipo H3N2 (XU *et al.*, 2004). Entretanto, neste estudo, o subtipo mais prevalente no mesmo período foi o H1N2. Esta variante originou-se do rearranjo dos segmentos da HA e da NA e foi encontrada em diferentes partes do mundo, próximos ao ano de 2000 (PHLS, 2002; BARR *et al.*, 2003; ELLIS *et al.*, 2003). No Brasil, nas regiões norte e nordeste, o subtipo H1N2 foi detectado entre os

meses de março e abril de 2003 (comunicação oral), enquanto que em Uberlândia, região sudeste, o mesmo já havia circulado desde julho de 2002. Neste estudo, assim como em outros (PAGET; MEERHOFF; GODDARD, 2002; GODDARD *et al.*, 2004) as infecções causadas por essa variante não mostraram estar associadas à gravidade clínica, uma vez que não houve necessidade de hospitalização dos pacientes. Além disso, essa cepa não foi considerada como possuindo potencial pandêmico, pois foi referido que uma proporção considerável da população apresentava imunidade a esses antígenos devido às infecções prévias ou à vacinação (GREGORY *et al.*, 2002; GODDARD *et al.*, 2004). Como a vacina disponibilizada no período era composta pelas cepas A/New Caledônia/20/99 (H1N1) e A/Moscow/10/99 (H3N2), cujas sequências da HA e da NA, respectivamente, mostraram alta identidade com as sequências da variante H1N2 circulante, as cepas foram mantidas na vacina para o biênio 2002-2003 (RICHARD; VIBOUD; MILLER, 2010). Apesar dos vírus influenza contendo esses rearranjos genéticos não circularem por um longo período de tempo (GREGORY *et al.*, 2002), foi sugerido que esse processo é um importante mecanismo para sua manutenção em humanos ou em outros animais (YAMANE; ARIKAWA; ODAGIRI, 1978; MCCULLERS *et al.*, 1999).

A análise das sequências dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 e do vírus influenza B encontrados neste estudo mostrou alta identidade com as sequências de variantes que já haviam sido encontradas em outros continentes em anos anteriores, como na Ásia, principalmente, seguida pela Europa e América do Norte, sugerindo um padrão global de origem das cepas, disseminadas para outros países através da mobilidade da população humana (CHEN; WILSON, 2008; RUSSELL *et al.*, 2008b). Por outro lado, especialmente com relação aos vírus do subtipo H3N2 detectados em Uberlândia, variantes com diferenças antigênicas estiveram presentes durante uma mesma epidemia, ou em epidemias de anos consecutivos. A comparação das sequências dos vírus encontrados neste estudo com as sequências das cepas vacinais mostrou uma menor identidade dos casos dos três primeiros anos, principalmente o subtipo H3N2, em relação aos casos do período de 2004-2007.

No presente trabalho, no sítio A especificamente, a posição 144 da sequência da HA dos vírus H3N2 apresentou maior variabilidade, alterando de isoleucina, do vírus detectado em 2001, para ácido aspártico, em 2002 e 2003, e para asparagina, a partir de Comunicação oral de Dr. Wyller Mello, em Uberlândia/MG em 23/04/2013 (UFU).

2004, corroborando com Bragstad, Nielsen e Fomsgaard (2008), que afirmaram que depois do ano de 2002, esta foi uma das regiões em que se detectou o maior número de substituições no vírus de subtipo H3. Também, divergências simultâneas de nove a onze resíduos de aminoácidos, em três ou até quatro sítios antigênicos, em comparação com a cepa vacinal e com os vírus detectados no período de 2001-2003, podem ter causado uma diminuição na eficiência da proteção vacinal, que foi aplicada no mesmo período no país – possivelmente configurando o mecanismo de evasão da resposta imune por essas variantes (SHIH *et al.*, 2007). Ainda, enquanto alterações nos sítios antigênicos podem levar à evasão da vigilância imune, os sítios de ligação com os receptores tendem a resistir a essas alterações (SAHINI; TEMPCZYK-RUSSELL; AGARWAL, 2010).

A respeito da ligação da HA ao ácido siálico, os aminoácidos leucina e serina nas posições 226 e 228, respectivamente, têm sido reportados como tendo papel importante para a especificidade no reconhecimento dos vírus influenza de humanos do subtipo H3 ao receptor celular (VINES *et al.*, 1998). Todavia, nos vírus H3N2, detectados entre 2001 e 2004 em Uberlândia, foi encontrada a substituição L226V e, entre 2005 a 2007, a L226I. Devido à semelhança estrutural desses três aminoácidos, que são neutros e não polares, essas substituições não devem ter refletido em mudanças conformacionais importantes e, assim, as propriedades de ligação da HA ao ácido siálico devem ter sido preservadas, como proposto anteriormente (ROGERS *et al.*, 1983; BUSH *et al.*, 1999). Além disso, a mutação V226I identificada na proteína HA foi associada previamente com a multiplicação do vírus em ovos embrionados de galinha (WIDJAJA *et al.*, 2006).

Para o subtipo H1, as alterações importantes de resíduos de aminoácidos nas sequências da HA são aquelas que ocorrem nos sítios antigênicos Sa, Sb, Ca₁, Ca₂ e Cb, localizados em torno dos sítios de ligação com o receptor (CATON *et al.*, 1982; DEEM; PAN, 2009). No presente estudo, foi possível detectar um pequeno número de variações nos sítios Ca e Sb das sequências da H1 dos vírus detectados em 2002 e 2006 com relação à cepa vacinal.

Nas posições 226 e 228 dos vírus influenza do subtipo H1, são encontrados, respectivamente, os resíduos de glutamina e de glicina, nos vírus procedentes tanto de humanos, quanto de aves e os determinantes de especificidade de ligação deste subtipo viral ao receptor de célula humana são D190 e D225. Logo, a observação desses

resíduos de aminoácidos nas respectivas posições, reafirma tratar-se de um hospedeiro humano, neste estudo.

Os vírus influenza B são classificados em linhagens Yamagata e Victoria, baseados na sequência do gene da HA (ROTA *et al.*, 1990), sendo que esta última linhagem, após ter circulado mundialmente na década de 80 e no leste da Ásia na década de 90, reapareceu em muitos países a partir de 2001 (BARR *et al.*, 2003). Análises genéticas e antigênicas de cepas da epidemia de 2002 deste país indicaram que os vírus influenza B detectados foram identificados como sendo da linhagem Victoria (MOTTA *et al.*, 2006). Em Uberlândia, o vírus influenza B encontrado (amostra 237) nesse mesmo ano também foi identificado com sendo da linhagem Victoria e sua sequência do gene da HA apresentou alta identidade com as sequências dos vírus detectados nos estados do Rio de Janeiro e de Santa Catarina (MOTTA *et al.*, 2006). Estes foram estreitamente relacionados à cepa B/NewYork/1/02 e, portanto, divergentes do vírus influenza B (protótipo B/Sichuan/379/99-like, linhagem Yamagata) presente na vacina utilizada no país naquela temporada. Logo, devido à falta de reatividade cruzada de anticorpos produzidos contra os vírus da linhagem Yamagata pelos indivíduos vacinados ou por aqueles anteriormente infectados por estes vírus, assim como a ausência da circulação de vírus da linhagem Victoria no país, por longo período de tempo, este vírus que re-emergiu, representou um risco potencial à saúde pública. Sendo assim, com a disseminação global da linhagem Victoria a partir de 2001, a mesma foi incluída na vacina da temporada seguinte (XU *et al.*, 2004).

A análise da sequência do gene da HA do vírus influenza B da amostra de Uberlândia mostrou que os três principais epítomos antigênicos da linhagem Victoria (alças 120, 160 e 190) apresentaram alterações. O alça 120 (posições 73, 75 e de 116 a 137 da sequência de aminoácidos) apresentou troca de seis resíduos, corroborando com Verhoeyen e colaboradores (1983), que sugeriram ser essa uma das regiões mais frequentemente alteradas em isolados desse vírus. Além disso, foi detectado um códon (AAC) a mais, que codifica para asparagina na posição 162 (alça 160). Inserções desse tipo são geralmente localizadas em regiões ricas em U + G do RNA viral, causadas por falha da polimerase viral (BLOK; AIR, 1982) e foram inicialmente observadas quando as sequências nucleotídicas de duas cepas do influenza A foram comparadas, A/Victoria/3/75 e A/Aichi/2/68 (VERHOEYEN *et al.*, 1980; VERHOEYEN *et al.*, 1983). Substituições e deleções, além de inserções, nessa região, que é distinta para o

vírus influenza B, podem funcionar como um mecanismo de manutenção desses agentes na população (NEROME *et al.*, 1998; MCCULLERS *et al.*, 1999). Os resíduos dos sítios de ligação com os receptores para esse tipo viral, geralmente são P238 e S240, que são posições equivalentes aos resíduos L226 e S228 do subtipo H3, respectivamente (WANG *et al.*, 2007). A sequência do vírus da amostra 237 de 2002 apresentou esses resíduos, tal como a cepa da vacina, apesar de serem de linhagens distintas (Victoria e Yamagata, respectivamente).

O número aumentado de sítios de N-glicosilação tem mostrado estar associado com atenuação dos vírus influenza subtipo H3N2 em camundongos (VIGERUST *et al.*, 2007). Em contrapartida, a adição ou remoção de um sítio de glicosilação pode ser um mecanismo do vírus de evasão do sistema imune, inclusive da resposta gerada pela vacinação, e para ter sua circulação sustentada dentro da população humana (ZHANG *et al.*, 2004). Neste estudo, sequências de vírus de duas amostras, de um caso que ocorreu em 2002 (amostra 221) e de outro de 2003 (amostra 323), apresentaram um sítio adicional de glicosilação, nas posições 105 e 144, respectivamente, quando comparadas às sequências das cepas vacinais correspondentes. Além disso, na sequência da amostra de 2003, a substituição ocorreu no sítio antigênico A. Já a sequência do vírus influenza B de 2002, apresentou dois sítios a mais de glicosilação na HA, do que a cepa vacinal, sendo que um deles estava localizado na hélice 190, podendo aí ter tido um papel importante, ao cobrir esse sítio antigênico com resíduos de carboidratos, como proposto anteriormente (BERTON; NAEVE; WEBSTER, 1984), além das diferenças nas sequências de aminoácidos entre essas duas linhagens virais, sugerindo, portanto, uma interferência ainda maior na sensibilidade dos anticorpos produzidos pela vacina em relação à HA₁. Assim, tal como ocorre com o vírus influenza A, a adição ou remoção de sítios de glicosilação pode ser um mecanismo que altera a antigenicidade do domínio HA₁ e permite a evasão do sistema imune.

A respeito da neuraminidase (NA), as variações antigênicas normalmente ocorrem nos sítios catalíticos da proteína ou em locais (*framework*) que forneçam suporte a esses sítios ativos (COLMAN; VARGHESE; LAVER, 1983). As substituições nas sequências da NA dos vírus detectados em Uberlândia, em comparação com as sequências das cepas vacinais de cada ano correspondente, não estavam localizadas nem nos sítios catalíticos, nem nos *frameworks* e, portanto, podem não ter sido responsáveis por mudanças antigênicas significativas.

A circulação de variantes dos vírus H1N1 naturalmente resistentes ao oseltamivir tem sido reportada, mesmo na ausência de pressão seletiva exercida pelo emprego desse antiviral (CHENG *et al.*, 2009). Porém, com o aumento do seu uso, especialmente depois da emergência do vírus pandêmico H1N1, em 2009, sugeriu-se a ocorrência de seleção e aumento da frequência de infecções causadas por essas variantes (FRY; GUBAREVA, 2012; WU *et al.*, 2012). Neste estudo, porém, vírus com marcadores de resistência ao oseltamivir não foram detectados. É importante ressaltar, no entanto, que o sequenciamento foi realizado com produtos da RT-PCR, utilizando-se RNA extraído da secreção de nasofaringe. Este ensaio não revela a presença concomitante de variantes virais resistentes e não resistentes a esse antiviral em uma mesma amostra.

Estes achados constituem o primeiro estudo epidemiológico molecular do vírus influenza no Triângulo Mineiro e poderá ser utilizado como referência para estudos futuros. As alterações genéticas encontradas, particularmente aquelas caracterizadas em importantes sítios antigênicos, justificam os constantes esforços para acompanhar a evolução dos vírus influenza na tentativa de reduzir o impacto em saúde pública das infecções causadas por esse agente. Sugere-se ainda a caracterização desses vírus em mais regiões do país, principalmente no início da temporada de gripe, com os objetivos de determinar as variantes em circulação, avaliar a eficiência da vacina disponibilizada para a mesma temporada - pela comparação das sequências da hemaglutinina e da neuraminidase - e fornecer dados que possam contribuir para a composição da vacina para os anos seguintes, além de mostrar a sazonalidade de cada região. Aliado a esses esforços, há a necessidade de um melhor trabalho de divulgação do conhecimento sobre a gripe e as suas formas de prevenção, incluindo a vacinação, para reduzir o ônus que essa doença causa à comunidade.

6. CONCLUSÕES

- Das 605 amostras testadas, 40 foram positivas para os vírus influenza, sendo 39 do tipo A e uma do tipo B;
- Foram identificados os vírus influenza A H3N2, H1N2 e, possivelmente o H1N1, e o vírus influenza B, durante os anos de estudo. Verificou-se a cocirculação dos vírus H3N2, H1N2 e B e, provavelmente, H1N1 no mesmo período epidêmico de 2002;
- A comparação das sequências dos vírus detectados em Uberlândia com as sequências das cepas vacinais, disponibilizadas nos respectivos anos, revelou menor identidade com os vírus que circularam entre 2001 e 2003, especialmente o subtipo H3N2. O vírus influenza tipo B detectado em 2002 foi da linhagem Victoria, enquanto que a cepa da vacina preconizada para aquele ano continha o vírus da linhagem Yamagata;
- Não foram detectadas alterações em sítios antigênicos nas sequências da neuraminidase. Alguns vírus caracterizados mostraram importantes alterações nos sítios antigênicos, cuja circulação possivelmente deveu-se a uma menor eficiência de proteção da vacina, disponibilizada no período correspondente contra essas variantes;
- O percentual das crianças com gripe atendidas em ambulatórios foi maior do que o das hospitalizadas, sendo que os casos que requereram internação apresentaram mediana de quatro meses de idade.
- No período de estudo os vírus influenza foram detectados entre fevereiro e setembro, com predomínio do subtipo H3N2.

7. REFERÊNCIAS

- ABED, Y. *et al.* Divergent evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes in recent influenza A:H3N2 viruses isolated in Canada. **J Med Virol**, 67, p. 589-595, 2002.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Pan American Health Organization. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals** (3rd ed.). Washington DC: PAHO HQ library, 2003,155-171.
- ACHESON, N.H. **Fundamentals of Molecular Virology**, 2007, cap.23, p.249.
- AIR, G.M.; LAVER, W.G. The neuraminidase of influenza virus. **Proteins**, v.6, p. 341–356, 1989.
- AKARSU, H. *et al.* Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export. **EMBO J**, v.22, n.18, p.4646-4655, 2003.
- ALBUQUERQUE, M.C. *et al.* Novel respiratory virus infections in children, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.15, n.5, p.806-808, 2009.
- ALEXANDER, D.J.; BROWN, I.H. Recent zoonosis caused by influenza A viruses. **Rev Sci Tech**, v.19, p. 197-225, 2000.
- ALONSO, W.J. *et al.* Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. **Am J Epidemiol**, v.165, p.1434-1442, 2007.
- ARIAS, C.F. *et al.* Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). **Arch Med Res**, v.40, p.643-654, 2009.
- ATMAR, R.L. *et al.* Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. **J Clin Microbiol**, v.34, p.2604-2606, 1996.
- BARR, I.G. *et al.* Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. **Vaccine**, v.28, n.5, p.1156-67, 2010.
- BARR, I.G. *et al.* Reassortants in recent human influenza A and B isolates from South East Asia and Oceania. **Virus Res**, v.98, p.35-44, 2003.
- BASLER, C.F. *et al.* Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.98, p.2746-2751, 2001.
- BAUDIN, F. *et al.* Structure of influenza RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. **EMBO J**, v.13, n.13, 1994.
- BEELER, J.A.; EICHELBERGER, M.C. Influenza and respiratory syncytial virus (RSV) vaccines for infants: safety, immunogenicity, and efficacy. **Microb Pathog**, v.55, p.9-15, 2013.

BERTON, M.T.; NAEVE, C.W.; WEBSTER, R.G. Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies. **J Virol**, v.52, p.919-927, 1984.

BISWAS, S.K.; NAYAK, D.P. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. **J Virol**, v.68, p.1819-1826, 1994.

BLOK, J.; AIR, G.M. Sequence variation at the 3' end of the neuraminidase gene from 39 influenza type A viruses. **Virology**, v.121, p.211-229, 1982.

BOIVIN, G. *et al.* Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. **J Clin Microbiol**, v.42, p.45-51, 2004.

BOTH, G.W. *et al.* Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. **J Virol**, v. 48, p. 52-60, 1983.

BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSERA, E. *et al.* Hemagglutinin activating host cell proteases provide promising drug targets for the treatment of influenza A and B virus infections. **Vaccine**, v.30, n.51, p.7374-7380, 2012.

BOULAN E.R.; PENDERGAST, M. Polarized distribution of viral envelope proteins in infected epithelial cells. **Cell**, v.20, p.45-54, 1980.

BOULO, S. *et al.* Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. **Virus Res**, v.124, p. 12-21, 2007.

BOUVIER, N.M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v.26, n.4, p.D49-D53, 2008.

BRAGSTAD, K.; NIELSEN, L.; FOMSGAARD, A. The evolution of human influenza A viruses from 1999 to 2006: a complete genome study. **Virol J**, v.5, n.40, p.1-19, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe técnico: campanha nacional de vacinação contra a influenza 2012**. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tecnico_campanha_influenza_2012.pdf> Acesso em: 25 jan. 2013.

BRINKHOF, M.W. *et al.* Influenza-attributable mortality among the elderly in Switzerland. **Swiss Med Wkly**, v.136, p. 302-309, 2006.

BUI, M. *et al.* Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. **J Virol**, v.74, p. 1781-1786, 2000.

BUSH, R.M. *et al.* Predicting the evolution of human influenza A. **Science**, v.286, p.1921-1925, 1999.

CARRARO, E. *et al.* Applications of a duplex reverse transcription polymerase chain reaction and direct immunofluorescence assay in comparison with virus isolation for detection of influenza A and B. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.57, n.1, p.53-57, 2007.

- CARRARO, E. *et al.* Influenza detection and subtyping by reverse transcriptase polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for laboratory surveillance in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.60, n.4, p.445-447, 2008.
- CARRAT, F.; FLAHAULT, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. **Vaccine**, v.25, p.6852-6862, 2007.
- CATON, A. *et al.* The antigenic structure of influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). **Cell**, v.31, p.417-427, 1982.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Spread of avian influenza viruses among birds. Disponível em: <www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/spread.htm>. Acesso em: 10 jan. 2013.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Introduction and Biology of Influenza. Influenza Prevention and Control Recommendations**. 2012-13 Influenza Season. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/background.htm>>. Acesso em: 16 jan. 2013.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2012a. **Guidance for clinicians on the Use of RT-PCR and other molecular assays for diagnosis of influenza virus infection**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/molecular-assays>>. Acesso em: 25 maio. 2012.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2012b. **Vaccine Information Statement. Inactivated Influenza Vaccine: What You Need to Know. 2012 – 2013**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/vis/downloads/vis-flu>. Acesso em: 30 mar. 2013.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2011. **Seasonal Influenza (Flu)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>>. Acesso em: 02 maio. 2013.
- CHEN, L.H.; WILSON, M.E. The role of the traveler in emerging infections and magnitude of travel. **Med Clin North Am**, v.92, p.1409-1432, 2008.
- CHEN, W. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. **Nat Med**, v.7, n.12, p.1306-1312, 2001.
- CHENG, P.K. *et al.* Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1). **Emerg Infect Dis**, v.15, p.966-968, 2009.
- CHIEOCHANSIN, T. *et al.* Human bocavirus (HBoV) in Thailand: clinical manifestations in a hospitalized pediatric patient and molecular virus characterization. **J Infect**, v.56, n.2, p.137-142, 2008.
- CHOPPIN, P.W.; MURPHY, J.S.; TAMM. I. Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza a2 virus strains. III. Morphological characteristics: independence of morphological and functional traits. **J Exp Med**, v.112, p.945-52, 1960.

- CIANCI, C.; TILEY, L.; KRYSTAL, M. Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. **J Virol**, v.69, p.3995-3999, 1995.
- CLAAS, E.C.J. *et al.* Human influenza virus A/HongKong/156/97 (H5N1) infection. **Vaccine**, v. 16, p. 977-978, 1998.
- COELHO, M.C. *et al.* Impact of respiratory infections by influenza viruses A and B in pediatric patients from Federal University of Paraná, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.11, n.2, p. 220-223, 2007.
- COIRAS, M.T. *et al.* Simultaneous Detection of Influenza A, B, and C Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Adenoviruses in Clinical Samples by Multiplex Reverse Transcription Nested-PCR Assay. **J Med Virol**, v.69, p.132-144, 2003.
- COLLIER, L.; OXFORD, J. Orthomyxoviruses and influenza. **Human Virology**, 3. ed. New York: Oxford University Press, 2006, p. 87-95.
- COLLIN, N.; de RADIGUES, X. Vaccine production capacity for seasonal and pandemic (H1N1) 2009 influenza. **Vaccine**, v.27, p. 5184-5186, 2009.
- COLMAN, P.M.; VARGHESE, J.N.; LAVER, W.G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. **Nature**, v.303, p.41-44, 1983.
- COMPANS, R.W. Hemagglutination-inhibition: rapid assay for neuraminic acid-containing viruses. **J Virol**, v.14, p.1307-1309, 1974.
- COMPANS, R.W.; CONTENT, J.; DUESBERG, P.H. Structure of the Ribonucleoprotein of Influenza Virus. **J Virol**, v.10, n.4, p.795-800, 1972.
- CONNOR, R.J. *et al.* Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. **Virology**, v.205, n.1, p.17-23, 1994.
- COSTA, L.F. *et al.* Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, n.3, p. 301-306, 2006.
- COUCEIRO, J.N.S.S.; ALBUQUERQUE, M.C.M. Vírus Respiratórias. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; EIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 245-289.
- COUCH, R.B. Seasonal inactivated influenza virus vaccines. **Vaccine**, v.26, n.4, p.D5-9, 2008.
- COX, N.J.; SUBBARAO, K. Global epidemiology of influenza: past and present. **Annu Rev Med**, v.51, p.407-421, 2000.
- COX, N.J.; SUBBARAO, K. Influenza. **Lancet**, v.354, n.9186, p.1277-1282, 1999.
- CROS, J.F.; PALESE, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. **Virus Res**, v.95, n.1-2, p.3-12, 2003.
- CRUZ, J.R. *et al.* Isolation of viruses from nasopharyngeal secretions. Comparison of aspiration and swabbing as means of sample collection. **J Infect Dis**, v.156, p.415-416, 1987.

- de la BARRERA, C.A.; REYES-TERAN, G. Influenza: forecast for a pandemic. **Arch. Med. Res**, v.36, p.628-636, 2005.
- de MELLO FREITAS, F.T. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000-2010. **Braz J Infect Dis**, v.17, n.1, p.62-68, 2013.
- DEEM, M.W.; PAN, K. The epitope regions of H1-subtype influenza A, with application to vaccine efficacy. **Protein Eng Des Sel**, v.22, n.9, p.543-546, 2009.
- DOUGLAS, R.G. Influenza in man. In: KILBOURNE, E.D. **The Influenza Viruses and Influenza**. New York: Academic Press, 1975, p.397-446.
- DWYER, D.E. *et al.* Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. **Med J**, v.185, n.10, p.48-53, 2006.
- EARP, L.J. *et al.* The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.285, p.25-66, 2005.
- ELLIS, J.S. *et al.* Influenza A H1N2 viruses, United Kingdom, 2001-2002 influenza season. **Emerg Infect Dis**, v.9, p.304-310, 2003.
- ELLIS, J.S.; FLEMING, D.M.; ZAMBON M.C. Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. **J Clin Microbiol**, v.35, p.2076-2082, 1997.
- ELLIS, J.S.; ZAMBON, M.C. Molecular diagnosis of influenza. **Rev Med Virol**, v. 12, p. 375-389, 2002.
- ELTON, D. *et al.* Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. **J Virol**, v.75, n.1, 408-419, 2001.
- ESPOSITO, S. *et al.* Effectiveness of influenza vaccination of children with recurrent respiratory tract infections in reducing respiratory-related morbidity within the households. **Vaccine**, v. 21, p. 3162-3168, 2003.
- FECHTER, P. *et al.* Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap-binding. **J Biol Chem**, v.278, p.20381-20388, 2003.
- FERGUSON, N.M.; GALVANI, A.P.; BUSH, R.M. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. **Nature**, v. 422, p. 428-433, 2003.
- FERRARIS, O.; LINA, B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. **J Clin Virol**, v.41, n.1, p.13-19, 2008.
- FINKELMAN, B.S. *et al.* Global patterns in seasonal activity of influenza A/H3N2, A/H1N1, and B from 1997 to 2005: viral coexistence and latitudinal gradients. **PLoS One**, v.2, p.e1296, 2007.
- FINKENSTADT, B.F.; MORTON, A.; RAND, D.A. Modelling antigenic drift in weekly flu incidence. **Statist Med**, v.24, n.22, p.3447-3461, 2005.
- FIORE, A.E. *et al.* Prevention and control, recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep**, v.57, p.1-60, 2008.

- FITCH, W.M. *et al.* Long term trends in the evolution of H(3) HA₁ human influenza type A. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p.7712-7718, 1997.
- FODOR, E. *et al.* A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. **J Virol**, v.77, p.5017-5020, 2003.
- FODOR, E.; BROWNLEE, G.G. Influenza virus replication. In: POTTER, C.W. **Influenza**, Amsterdam: Elsevier, 2002, p. 1-29.
- FORLEO-NETO, E. *et al.* Influenza. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, n.2, p.267-74, 2003.
- FOUCHIER, R.A. *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **J. Virol**, v.79, p.2814-2822, 2005.
- FRANCIS, T. Jr. A new type of virus from epidemic influenza. **Science**, v. 92, p. 405-408, 1940.
- FRY, A.M.; GUBAREVA, L.V. Understanding influenza virus resistance to antiviral agents; early warning signs for wider community circulation. **J Infect Dis**, v.206, n.2, p.145-7, 2012.
- GAMMELIN, M. *et al.* Phylogenetic analysis of nucleoproteins suggests that human influenza A viruses emerged from a 19th-century avian ancestor. **Mol Biol Evol**, v.7, p.194-200, 1990.
- GARCÍA-GARCÍA, J.; RAMOS, C. La influenza, un problema vigente de salud publica. **Salud Publica Mex**, v.48, p.244-267, 2006.
- GARTEN, W.; KLENK, H.D. Characterization of the carboxypeptidase involved in the proteolytic cleavage of the influenza hemagglutinin. **J Gen Virol**, v.64, n.10, p.2127-2137, 1983.
- GERHARD, W. *et al.* Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. **Nature**, v.290, p.713-717, 1981.
- GILBERT, L.L. *et al.* Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription-PCR panel. **J Clin Microbiol**, 34, p. 140-143, 1996.
- GLASER, L. *et al.* A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. **J Virol**, v.79, n.17, p.11533-11536, 2004.
- GLEZEN, W.P. Emerging infections: pandemic influenza. **Epidemiol Rev**, v.18, p.64,1996.
- GLEZEN, W.P. Universal influenza vaccination and live attenuated influenza vaccination of children. **Pediatr Infect Dis J**, v.27, n.10, p.104-109, 2008.
- GODDARD, N.L. *et al.* Epidemiological features of a new strain of the influenza A virus-influenza A (H1N2) circulating in England and its public health implications. **Virus Res**, v.103 p. 53-54, 2004.

- GOMEZ-PUERTAS P. *et al.* Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. **J Virol**, v.74, n.24, p.11538-11547, 2000.
- GORMAN, O.T. *et al.* Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. **J Virol**, v.64, n.4, p.1487-1497, 1990.
- GREENBERG, D.P. *et al.* Safety and immunogenicity of a quadrivalent inactivated influenza vaccine compared to licensed trivalent inactivated influenza vaccines in adults. **Vaccine**, v.31, n.5, p. 770-776, 2013.
- GREGORY, V. *et al.* Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001. **Virology**, v.300, p.1-7, 2002.
- GUAN, Y. *et al.* Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: Were they the donors of the “internal” genes of H5N1 viruses in Hong Kong? **Microbiology**, v. 96, p. 9363-9367, 1999.
- HAMPSON, A.W. Vaccines for pandemic influenza. The history of our current vaccines, their limitations and the requirements to deal with a pandemic threat. **Ann Acad Med Singapore**, v.37, p.510-517, 2008.
- HAY, A.J. *et al.* The evolution of human influenza viruses. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.356, n.1416, p.1861-70, 2001.
- HAY, A.J. *et al.* The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. **EMBO J**, v.4, p.3021-3024, 1985.
- HAYDEN, F.G. Perspectives on antiviral use during pandemic influenza. **Phil Trans R Soc London**, v.356, p.1877-1884, 2001.
- HERRMANN, B.; LARSSON, C.; ZWEYGBERG, B.W. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). **J Clin Microbiol**, v.39, n.1, p.134-138, 2001.
- HILLEMANN, M.R. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. **Vaccine**, v.20, p.3068-3087, 2002.
- HIRST, G. K. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. **Science**, v.94, p. 22-23, 1941.
- HOLMES, E.C. Molecular clocks and the puzzle of RNA virus origins. **J Virol**, v. 77, p. 3893-3897, 2003.
- HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. **Nat Rev Microbiol**, v.3, n.8, p.591-600, 2005.
- HU, J.J. *et al.* Clinical features of influenza A and B in children and association with myositis. **J Microbiol Immunol Infect**, v.37, p.95-98, 2004.
- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2012 Release (current) 2012. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>>. Acesso em: 29 abril. 2013.

- JEFFERSON, T.O. *et al.* Vaccines for preventing influenza in healthy adults. **Cochrane Database Syst Rev**, v.2, CD001269, 2007.
- JIN, H. *et al.* Two residues in the hemagglutinin of A/Fujian/411/02-like influenza viruses are responsible for antigenic drift from A/Panama/2007/99. **Virology**, v.336, p.113-119, 2005.
- KALTHOFF, D.; GLOBIG, A.; BEER, M. (Highly pathogenic) avian influenza as a zoonotic agent. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p.237-245, 2010.
- KAPLAN, M.M.; WEBSTER, R.G. The epidemiology of influenza. **Sci Am**, v.237, n.6, p.88-106, 1977.
- 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. **J Virol**, v.63, p. 4603-4608, 1989.
- KILBOURNE, E.D.; JOHANSSON, B.E.; GRAJOWER, B. Independent and disparate evolution in nature of influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.87, p. 786-790, 1990.
- KISO, M. *et al.* Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. **Lancet**, v.364, p.759-765, 2004.
- KITCHING, A. *et al.* Oseltamivir adherence and side effects among children in three London schools affected by influenza A(H1N1)v, May 2009 - an internet-based cross-sectional survey. **Eur Surveill**, v.14, p.1-4, 2009.
- KITLER, M.E.; GAVINIO, P.; LAVANCHY, D. Influenza and the work of the World Health Organization. **Vaccine**, v.20, n.2, p.S5-14, 2002.
- KLEIN, M.B. *et al.* Influenzavirus infection is a primary cause of febrile respiratory illness in HIV-infected adults, despite vaccination. **Clin Infect Dis**, v.45, p.234-240, 2007.
- KNOSSOW, M. *et al.* Mechanism of neutralization of influenza virus infectivity by antibodies. **Virology**, v.302, 294-298, 2002.
- KOCHS, G.; SASTRE, A.G.; SOBRIDO, L.M. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. **J Virol**, v.81, 7011-7021, 2007.
- KRUG, R.M. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.93, p.125-49, 1981.
- KUSZEWSKI, K.; BRYDAK, L. The epidemiology and history of influenza. **Biomed Pharmacother**, v.54, n.4, p.188-195, 2000.
- LAMB, R.A.; CHOPPIN, P.W. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.76, n.10, p.4908-4912, 1979.
- LAMB, R.A.; KRUG, R.M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p.1487-1579.

- LAMB, R.A.; KRUG, R.M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 3.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996, p.605-647.
- LAVANCHY, D.; GAVINIO, P. The importance of global influenza surveillance for the assessment of the impact of the influenza. **Int Congr Ser**, v. 1219, p. 9-11, 2001.
- LAZAROWITZ, S.G.; CHOPPIN, P.W. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. **Virology**, v.68, p.440-454, 1975.
- LI, K.S. *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. **Nature**, v. 430, p. 209-213, 2004.
- LI, M.L.; RAO, P.; KRUG, R.M. The active sites of the influenza capdependent endonuclease are on different polymerase subunits. **EMBO J**, v.20, n.8, p.2078-2086, 2001.
- LI, O.T.W. *et al.* Reliable universal RT-PCR assays for studying influenza polymerase subunit gene sequences from all 16 haemagglutinin subtypes. **J Virol Methods**, v.42, n.1-2, p. 218-222, 2007.
- LUDWIG, S. *et al.* Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy? **Trends Mol Med**, v.9, p.46-52, 2003.
- LUI, K.J.; KENDAL, A.P. Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985. **Am J Public Health**, v.77, n.6, p.712-716, 1987.
- LUK, J.; GROSS, P.; THOMPSON, W.W. Observations on Mortality during the 1918 Influenza Pandemic. **Clin Infect Dis**, v.33, n.8, p.1375-1378, 2001.
- MACKAY, W.G. *et al.* Molecular detection and typing of influenza viruses: Are we ready for an influenza pandemic? **J Clin Virol**, v. 42, p. 194-197, 2008.
- MARTIN, K.; HELENIUS, A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. **Cell**, v.67, p.117-130, 1991.
- MARTINS, N.R.S. Influenza Aviária: Uma Revisão dos Últimos Dez Anos. Rev. **Bras Cienc Avic**, v.3, n.2, p.97-140, 2001.
- MATLIN, K.S. *et al.* Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. **J Cell Biol**, v.91, n.3, p.601-613, 1981.
- MATROSOVICH, M.N. *et al.* Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.101, p.4620-4624, 2004b.
- MATROSOVICH, M.N. *et al.* Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. **J Virol**, v.78, n.22, p.12665-12667, 2004a.

- MATSUZAKIA, Y. *et al.* Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts. **J Clin Virol**, v. 54, n. 2, p. 130-134, 2012.
- MCCULLERS, J.A. *et al.* Reassortment and insertion–deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. **J Virol**, v.73, p.7343-7348, 1999.
- MELLO, W. A. *et al.* The dilemma of influenza vaccine recommendations when applied to the tropics: the Brazilian case examined under alternative scenarios. **PLoS One**, v.4, p.e5095, 2009.
- MEMARZADEH, F. Literature Review of the Effect of Temperature and Humidity on Viruses. **ASHRAE Transactions**, v.117, n.2, p.1-13, 2011.
- MILNE, B.G. *et al.* Influenza A associated morbidity and mortality in a paediatric intensive care unit. **Commun Dis Intell**, v.28, p.504-509, 2004.
- MONTO, A.S. Epidemiology and virology of influenza illness. **Am J Managed Care**, v.6, n.5, p. 255-264, 2000.
- MONTO, A.S. Epidemiology of influenza. **Vaccine**, v.26, n.4, p. D45-48, 2008.
- MONTO, A.S.; KIOUMEHR, F. The Tecumseh study of respiratory illness. IX. Occurrence of influenza in the community, 1966–1971. **Am J Epidemiol**, v.102, p.553-563, 1975.
- MOTTA, F.C. *et al.* The reappearance of Victoria lineage influenza B virus in Brazil, antigenic and molecular analysis. **J Clin Virol**, v.36, p.208-214, 2006.
- MOURA, F.E.; PERDIGÃO, A.C.; SIQUEIRA, M. M. Seasonality of influenza in the tropics: a distinct pattern in northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.81, p.180-183, 2009.
- MOURA, P.O. *et al.* Molecular epidemiology of human adenovirus isolated from children hospitalized with acute respiratory infection in Sao Paulo, Brazil. **J Med Virol**, v.79, p.174-181, 2007.
- MOYA, A.; HOLMES, E.C.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, p. 279-288, 2004.
- MURPHY B.R., WEBSTER R.G. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p.1397-1445.
- NAGATA, K.; KAWAGUCHI, A.; NAITO, T. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. **Rev Med Virol**, v.18, p.247-260, 2008.
- NAYAK, D.P.; HUI, E.K.; BARMAN, S. Assembly and budding of influenza virus. **Virus Res**, v.106, n.2, p.147-165, 2004.
- NELSON, M.I. *et al.* Phylogenetic analysis reveals the global circulation pattern of seasonal influenza A viruses. **PLoS Pathog**, v.3, p.1220-1228, 2007.

- NEROME, R. *et al.* Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. **Arch Virol**, v.143, p.1569-1583, 1998.
- NEUMANN, G. *et al.* Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.283, p.121-43, 2004.
- NEUMANN, G.; CASTRUCCI, M. R.; KAWAOKA, Y. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. **J Virol**, v.71, p.9690-9700, 1997.
- NEUZIL, K.M. *et al.* The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. **N Engl J Med**, v.342, p.225-231, 2000.
- NEUZIL, K.M.; HOHLBEIN, C.; ZHU, Y. Illness among schoolchildren during influenza season. Effect on school absenteeism, parental absenteeism from work, and secondary illness in families. **Arch Pediatr Adolesc Med**, v.156, p.986-991, 2002.
- NICHOLSON, K.G. Human influenza. In: NICHOLSON, K.G.; WEBSTER, R.G.; HAYS, A.J. **Textbook of influenza**. Oxford: Blackwell Science, 1998.
- NICHOLSON, K.G.; WOOD, J.M.; ZAMBON, M. Influenza. **Lancet**, v.362, p. 1733-1744, 2003.
- NJOUM, R. *et al.* Circulation of human influenza viruses and emergence of oseltamivir-resistant A (H1N1) viruses in Cameroon, Central Africa. **BMC Infect Dis**, v.10, n.56, p.1-5, 2010.
- OHMIT, S.E. *et al.* Prevention of antigenically drifted influenza by inactivated and live attenuated vaccines. **N Engl J Med**, v.355, p.2513-2522, 2006.
- OLIVEIRA, T.F.M. *et al.* Prevalence and clinical aspects of respiratory syncytial virus A and B groups in children seen at Hospital de Clínicas of Uberlândia, MG, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, n.5, p.417-422, 2008.
- OLIVEIRA, W.K. *et al.* Pandemic H1N1 influenza in Brazil: analysis of the first 34,506 notified cases of influenza-like illness with severe acute respiratory infection (SARI). **Eurosurveillance**, v. 14, n. 42, p.16-21, 2009.
- O'NEILL, R.E. *et al.* Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. **J Biol Chem**, v.270, p.22701-22704, 1995.
- O'RIORDAN, S. *et al.* Risk factors and outcomes among children admitted to hospital with pandemic H1N1 influenza. **CMAJ**, v.182, p.39-44, 2010.
- OSTERHAUS, A.D.M.E. *et al.* Influenza B virus in seals. **Science**, v.288, p.1051-1053, 2000.
- PAGET, W.J.; MEERHOFF, T.J.; GODDARD, N.L. Mild to moderate influenza activity in Europe and the detection of novel A(H1N2) and B viruses during the winter of 2001-02. **Eurosurveillance**, v.7, p.147-57, 2002.

- PAISLEY, J.W. *et al.* Type A2 Influenza Viral Infections in Children. **Am J Dis Child**, v.132, n.1, p.34-36, 1978.
- PAIVA, T.M. *et al.* Occurrence of influenza B/Hong Kong-like strains in Brazil, during 2002. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v.45, n.1, p. 51-52, 2003.
- PALESE, P. Influenza: old and new threats. **Nat Med**, v.10, n.12, p.S82-7, 2004.
- PALESE, P.; SHAW, M.L. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 1647-1648.
- PARIANI, E. *et al.* Molecular characterization of influenza viruses circulating in Northern Italy during two seasons (2005/2006 and 2006/2007) of low influenza activity. **J Med Virol**, v.80, n.11, p.1984-1991, 2008.
- PEBODY, R.G. *et al.* Pandemic influenza A (H1N1) 2009 and mortality in the United Kingdom: risk factors for death, April 2009 to March 2010. **Euro Surveill**, v.15, n. 20, pii. 19571, 2010.
- PELTOLA, V.; ZIEGLER, T.; RUUSKANEN, O. Influenza A and B virus infections in children. **Clin Infect Dis**, v.36, p.299-305, 2003.
- PERROTTA, D.M.; DECKER, M.; GLEZEN, W.P. Acute respiratory disease hospitalizations as a measure of impact of epidemic influenza. **Am J Epidemiol**, v.122, p.468-76, 1985.
- PETRIC, M.; COMANOR, L.; PETTI, C.A. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. **J Infect Dis**, v.194, n. 2, p.98-110, 2006.
- PHLS. Public Health Laboratory Service. **WHO announces the isolation of a new strain of influenza virus A (H1N2), and the vaccine composition for next winter.** 2002.
- PLAYFORD, E.G.; DWYER, D.E. Laboratory diagnosis of influenza virus infection. **Pathology**, v.34: p.115-125, 2002.
- PLOTKIN, J.B.; DUSHOFF, J. Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, p.7152- 7157, 2003.
- POPOVA, L. *et al.* Immunodominance of Antigenic Site B over Site A of Hemagglutinin of Recent H3N2 Influenza Viruses. **Plos One**, v.7, n.7, p.1-11, 2012.
- PRICE, D.A.; POSTLETHWAITE, R.J.; LONGSON, M. Influenzavirus A 2 infections presenting with febrile convulsions and gastrointestinal symptoms in young children. **Clin Pediatr**, v.15, p.361-367, 1976.
- PRINCIPI, N. *et al.* Socioeconomic impact of influenza on healthy children and their families. **Pediatr Infect Dis J**, v.22, n.10, p. 207-210, 2003.
- QUEIRÓZ, D.A.O. *et al.* Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.1183-1193, 2002.

- REID, A.H. *et al.* Characterization of the 1918 'Spanish' influenza virus neuraminidase gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, p.1651-1656, 2000.
- REID, A.H. *et al.* Origin and evolution of the 1918 'Spanish' influenza virus hemagglutinin gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, p.1651-1656, 1999.
- RICHARD, S.A.; VIBOUD, C.; MILLER, M.A. Evaluation of Southern Hemisphere influenza vaccine recommendations. **Vaccine**, v.28, n.15, p.2693-2699, 2010.
- ROGERS, G.N. *et al.* Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. **Nature**, v.304, p. 76-78, 1983.
- ROTA, P. *et al.* Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. **Virology**, v.175, p.59-68, 1990.
- RUIGROK, R.W. *et al.* Characterization of three highly purified influenza virus strains by electron microscopy. **J Gen Virol**, v.65, pt.4, p.799-802, 1984.
- RUSSELL, C.A. *et al.* Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. **Vaccine**, v.26, n.4, p.D31-34, 2008a.
- RUSSELL, C.A. *et al.* The Global Circulation of Seasonal Influenza A (H3N2) Viruses. **Science**, v.320, n.5874, p. 340-346, 2008b.
- SAHINI, L.; TEMPCZYK-RUSSELL, A.; AGARWAL, R. Large-Scale Sequence Analysis of Hemagglutinin of Influenza A Virus Identifies Conserved Regions Suitable for Targeting an Anti-Viral Response. **PLoS one**, v.5, n.2, p.e9268, 2010.
- SAUERBREI, A. *et al.* Seroprevalence of influenza A and B in German infants and adolescents. **Med Microbiol Immunol**, v.198, n.2, p. 93-101, 2009.
- SCALERA, N.M.; MOSSAD, S.B. The first pandemic of the 21st century: a review of the 2009 pandemic variant influenza A (H1N1) virus. **Postgrad Med**, v.121, p. 43-47, 2009.
- SCHOLTISSEK, C. Source for influenza pandemics. **Eur J Epidemiol**, v.10, p.455-58, 1994.
- SHIH, A.C. *et al.* Simultaneous amino acid substitutions at antigenic sites drive influenza A hemagglutinin evolution. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, n.15, p.6283-6288, 2007.
- SIMONSEN, L. *et al.* The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index. **Am J Public Health**, v.87, n.12, p. 1944-1950, 1997.
- SIMONSEN, L. The global impact of influenza on morbidity and mortality. **Vaccine**, v.17, n.1, p.S3-10, 1999.
- SKEHEL, J.J.; WILEY, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. **Annu Rev Biochem**, 69: 531-569, 2000.
- SMITH, D.J. *et al.* Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. **Science**, v.305, p. 371-376, 2004.

- STEGMANN, T. *et al.* Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. **Biochim Biophys Acta**, v.904, n.1, p.165-170, 1987.
- STEGMANN, T. Membrane Fusion Mechanisms: The influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. **Traffic**, v.1, n.8, p.598-604, 2000.
- STEVENS, J. *et al.* Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. **Science**, v. 303, p. 1866-1870, 2004.
- STOCKTON, J. *et al.* Multiplex PCR for typing and subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. **J Clin Microbiol**, v.36, p.2990-2995, 1998.
- STONE, B. *et al.* Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real time PCR. **J Virol Meth**, v.117, p.103-112, 2004.
- SUGAYA, N. *et al.* The impact of winter epidemics of influenza and respiratory syncytial virus on paediatric admissions to an urban general hospital. **J Med Virol**, v.60, p.102-106, 2000.
- SZUCS, T. The socio-economic burden of influenza. **J Antimicrob Chemother**, v.44, p.11-15, 1999.
- TAO, Y.J.; YE, Q. Influenza A virus nucleoprotein. In: WANG, Q.; TAO, Y.J. **Influenza: Molecular Virology**. UK: Caister Academic, 2010, p. 53-68.
- TAYLOR, R.M. A further note on 1233 ("Influenza C") virus. **Arch Virus-forsch**, v.4, p.485-500, 1951.
- THOMAZELLI, L.M. *et al.* Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. **J Pediatr**, v.83, p.422-428, 2007.
- THOMPSON W.W. *et al.* Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. **JAMA**, v.289, p.179-186, 2003.
- THOMPSON, W.W. *et al.* Influenza-associated hospitalizations in the United States. **JAMA**, v.292, n.11, p.1333-1340, 2004.
- TONG, S. *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.109, p.4269-4274, 2012.
- TREANOR, J. Influenza Vaccine — Outmaneuvering Antigenic Shift and Drift. **N Engl J Med**, v.350, p.218-220, 2004.
- TRIFONOV, V.; KHIABANIAN, H.; RABADAN, R. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. **N Engl J Med**, v.361, p.115-119, 2009.
- TSAI, H.P. *et al.* Respiratory virus infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. **J Clin Microbiol**, v.39, p.111-118, 2001.
- VAN ELDEN, L.J.R. *et al.* Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. **J Clin Microbiol**, v.39, p.196-200, 2001.

- VAN REETH, K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. **Vet Res**, v.38, n.2, p.243-60, 2007.
- VERHOEYEN, M. *et al.* Antigenic drift between the haemagglutinin of the Hong Kong influenza strains A/Aichi/2/68 and A/Victoria/3/75. **Nature**, v.286, p.771-776, 1980.
- VERHOEYEN, M. *et al.* Complete nucleotide sequence of the influenza B/Singapore/222/79 virus hemagglutinin gene and comparison with the B/ Lee/40 hemagglutinin. **Nucleic Acids Res**, v.11, p.4703-4712, 1983.
- VIBOUD, C.; ALONSO, W.J.; SIMONSEN, L. Influenza in Tropical Regions. **PLoS Med**, v.3, n.4, p. 468-71, 2006.
- VIDAL, L.R. *et al.* The epidemiology and antigenic characterization of influenza viruses isolated in Curitiba, South Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, p.180-185, 2008.
- VIESCA, T.C. **Medicina prehispánica de México**. México: Panorama Editorial, 1996, p.49-50.
- VIGERUST, D.J. *et al.* N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. **J Virol**, v.81, p.8593-8600, 2007.
- VINES, A. *et al.* The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. **J Virol**, v.72, p.7626-7631, 1998.
- WANG, G. *et al.* H5N1 avian influenza re-emergence of Lake Qinghai: phylogenetic and antigenic analyses of the newly isolated viruses and roles of migratory birds in virus circulation. **J Gen Virol**, v.89, p.697-702, 2008b.
- WANG, Q. *et al.* Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. **J Virol**, v.82, p.3011-3020, 2008a.
- WANG, Q. *et al.* Structural basis for receptor specificity of influenza B virus hemagglutinin. **PNAS**, v.104, n.43, 16874-16879, 2007.
- WEBSTER, R.G. *et al.* Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol Rev**, v.56, p.152-179, 1992.
- WEBSTER, R.G. *et al.* Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. **Virology**, v.84, n.2, p.268-78, 1978.
- WHO. World Health Organization. **Influenza**. Factsheet, n.211, 2003.
- WHO. World Health Organization. 2013a. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) reported to WHO. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/>. Acesso em: 27 abril. 2013.
- WHO. World Health Organization. 2013b. Influenza update 26 April 2013. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2013_04_26_surveillance_update_184.pdf>. Acesso em: 06 maio. 2013.

- WIDJAJA, L. *et al.* Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs. **Virology**, v.350, p.137-145, 2006.
- 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, p.373-378, 1981.
- WILKENS, M.J. *et al.* Severe morbidity and mortality associated with influenza in children and young adults—Michigan, 2003. **Morb Mort Wkly Rep**, v.52, n.35, p.837-840, 2003.
- WILSON, I.A.; COX, N.J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. **Annu Rev Immunol**, v.8, p.737-771, 1990.
- WIWANITKIT, V. Finding a new drug and vaccine for emerging swine flu: What is the concept? **Biologics**, v.3, p.377-383, 2009.
- WOOD, J.M. Selection of influenza vaccine strains and developing pandemic vaccines. **Vaccine**, v.20, n.5, p.40-44, 2002.
- WRIGHT, P. F.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Orthomyxoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p.1691-1740.
- WRIGHT, P.F.; WEBSTER, R.G. Orthomyxoviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p.1533-1579.
- WU, W.L. *et al.* The 2008–2009 H1N1 influenza virus exhibits reduced susceptibility to antibody inhibition: Implications for the prevalence of oseltamivir resistant variant viruses. **Antiviral Res**, v.93, p.144-53, 2012.
- XU, X. *et al.* Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. **Virus Res**, v.103, p.55-60, 2004.
- YAMANE, N.; ARIKAWA, J.; ODAGIRI, T. Isolation of three different influenza A viruses from an individual after probable double infection with H3N2 and H1N1 viruses. **Jpn J Med Sci Biol**, v.31, p.431-434, 1978.
- YANG, L. *et al.* Synchrony of clinical and laboratory surveillance for influenza in Hong Kong. **PLoS ONE**, v.3, p.e1399, 2008.
- YANG, S.; ROTHMAN, R.E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **Lancet Infect Dis**, v.4, p.337-348, 2004.
- YUANJI, GUO. *et al.* Isolation of Influenza C Virus from Pigs and Experimental. Infection of Pigs with Influenza C Virus. **J Gen Virol**, v.64, p.177-182, 1983.
- ZAMBON, M.C. Epidemiology and pathogenesis of influenza. **J Antimicrob Chemother**, v.44, p.3-9, 1999.

ZARAKET, H. *et al.* Molecular evolution of human influenza A viruses in a local area during eight influenza epidemics from 2000 to 2007 **Arch. Virol**, v.154, p.285-295, 2009.

ZHANG, M. *et al.* Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. **Glycobiology**, v.14, p.1229-1246, 2004.

ZIMMER, S.M.; BURKE, D.S. Historical perspective—emergence of influenza A (H1N1) viruses. **N Engl J Med**, v.361, p.279-285, 2009.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: cep@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº. 742/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO
REGISTRO CEP/UFU 326/08

Projeto Pesquisa: Pesquisa de Influenzavirus em secreção de nasofaringe de crianças com
doença respiratória aguda, atendidas em Uberlândia – MG.

Pesquisador Responsável: Divina Aparecida Oliveira Queiroz

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela
aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas da pesquisa com seres humanos,
nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da
pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de
pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e
documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento
a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do relatório parcial: agosto de 2009.
Data para entrega do relatório parcial: agosto de 2010.
Data para entrega do relatório final: dezembro de 2011.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER
INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA
MESMA.

Uberlândia, 12 de dezembro de 2008.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da
pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma
cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após
análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando
perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos
da pesquisa (Item V.3) que requeriram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item
V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha
sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu
posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do
protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o
pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao
protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no
cronograma do projeto, conforme norma.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa de vírus respiratórios e aspectos da resposta imune em espécimes clínicos obtidos de crianças de 0-5 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro, MG

Srs. Pais/Responsáveis,

O seu filho está sendo convidado para participar da pesquisa de vírus respiratórios em espécimes clínicos obtidos de crianças de 0-5 anos de idade com doença respiratória aguda, sob responsabilidade dos professores pesquisadores Dra. Divina A. O. Queiróz e Dr. Hélio L. Silveira e colaboração de Thelma F.M.S. Oliveira, Lourenço F. Costa, Nayhanne T. de Paula, Tatiany Calegari, Cynthia de Carvalho Silva e Poliana C. R. Bonati e Cecília F. Quirino.

Os vírus respiratórios são os principais agentes causadores de doença respiratória aguda em crianças. Sendo assim, a detecção do agente que pode estar causando a infecção em seu filho, além de auxiliar o médico a tratá-lo, irá fornecer informações para trabalhos sobre mecanismos de infecção e sobre a circulação dos principais vírus respiratórios em nossa região. Para isso, precisamos colher aproximadamente 1mL de secreção de nasofaringe, através da instilação de soro fisiológico na narina da criança e 2mL de sangue, por punção venosa.

Essas amostras serão coletadas pelas enfermeiras Tatiany ou Poliana, também responsáveis pela aplicação do T.C.L.E., utilizando equipamento estéril para não haver risco para a criança, e serão processadas no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o diagnóstico viral, a ser realizado pela equipe acima referida.

O preenchimento da ficha clínica será realizado pelo pediatra mediante informações obtidas dos pais ou responsáveis pela criança e da avaliação clínica. Todos os dados serão confidenciais e os resultados da pesquisa serão publicados sem a identificação do paciente. A participação na pesquisa é voluntária, sem qualquer ônus ou benefício para a criança, podendo ser encerrada a qualquer momento.

Os benefícios serão relativos à descoberta do agente causador da doença, que auxiliará o médico no tratamento e também para a obtenção conhecimento científico.

Em caso de dúvida a respeito da pesquisa, entre em contato com qualquer um dos membros da equipe do Laboratório de Virologia acima referidos.

Instituto de Ciências Biomédicas – Laboratório de Virologia

Endereço: Av. Amazonas, Bloco 4C, andar superior; C.Umuarama; Uberlândia, MG

Fone: (034) 3218-2664

Uberlândia: ___/___/___

Nome do pai/mãe ou responsável

Assinatura

Enfermeira responsável pela coleta

Profa. Dra. Divina A.O. Queiróz

Comitê de Ética em Pesquisa da UFU - (34) 3239-4531

Anexo III

FICHA CLÍNICA - PROJETO VÍRUS RESPIRATÓRIOS

Prontuário: _____

Local atendimento: ___/___/___

Data: ___/___/___

Data do nascimento: ___/___/___ Idade _____ Gênero: M ___ F ___

Duração da gestação: _____ semanas (definir se é pré-termo ou não) Cor: _____

Aleitamento materno: não ___ sim (duração: _____)

Pais fumantes: sim ___ não ___ Pais atópicos: ___ sim ___ não ___

Doença de base presente (descrever qual patologia apresenta):

Cardiopatia	sim	não
Displasia broncopulmonar	sim	não
Imunodeficiência	sim	não
Outras (definir qual)	sim	não

Descrição do quadro clínico:

- Início dos sintomas: _____ dias
- Febre: _____ dias
- Coriza: _____ dias
- Tosse: _____ dias
- Espirros: _____ dias
- Outros: _____
- Dor de garganta: não sim
- Dor no corpo: não sim
- Mal estar: não sim
- Secreção ocular: não sim
- Hiperemia ocular: não sim

Frequência respiratória: _____ irpm

Murmúrio vesicular: _____ Chiado (sibilos): não sim

Retrações torácicas (tiragens): sim não

Apnéia ao atendimento (maior que 20 seg com cianose ou bradicardia): não sim

Medicação em uso: _____

RX de tórax Hiperinsuflação não sim

Consolidação não sim

Atelectasia não sim

Gasometria arterial: pH= Pa CO2= Pa O2=
HCO3 = Sat. O2= BE=

Diagnóstico Nosológico: _____

Admissão: ___/___/___

Local: _____

Ventilação artificial: não sim (número de dias: _____)