PATRÍCIA ROSSI DO SACRAMENTO

**Diversidade genética da neuraminidase de vírus
Influenza A, isolados de crianças internadas na
cidade de São Paulo, de 1995 a 2006**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Viviane Fongaro Botosso

São Paulo
2010

RESUMO

Sacramento, PR. Diversidade genética da Neuraminidase de vírus Influenza A, isolados de crianças internadas na cidade de São Paulo, de 1995 a 2006. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A Influenza é uma das mais importantes infecções do trato respiratório em humanos, sendo responsável por 3 a 5 milhões de casos anuais e pela morte de 250.000 a 500.000 pessoas por todo o mundo. Uma característica marcante desse vírus é sua extensa variabilidade genética e antigênica, principalmente nas suas proteínas de superfície, neuraminidase (NA) e hemaglutinina (HA). Essa variabilidade pode ocorrer tanto por mutações pontuais, ocorridas no decorrer da replicação (chamadas drifts), como por rearranjos entre segmentos de RNA de vírus que acometem diferentes espécies (shifts), gerando um vírus novo para o qual a população não possui imunidade. Devido aos graves problemas médicos e sociais, grandes esforços são realizados no monitoramento das cepas circulantes, tanto para a produção de vacina eficaz, como para identificar rapidamente uma cepa emergente. O presente estudo teve como objetivos caracterizar os vírus Influenza circulantes na cidade de São Paulo e verificar a variabilidade genética do gene da neuraminidase dos *Influenzavirus A* em amostras provenientes de crianças internadas na enfermaria, UTI e na retaguarda do Hospital Universitário da USP, durante o período de 1995 a 2006. Espécimes clínicos provenientes de 3.009 crianças com idade ≤ 5 anos, internadas com sintomatologia respiratória, foram submetidas à duplex RT-PCR, para detecção e tipagem dos vírus Influenza A e B (IA e IB) e à *multiplex* RT-PCR para subtipagem dos vírus Influenza A. O gene da NA das amostras positivas para o vírus Influenza A foi amplificado e sequenciado. Das 3009 amostras analisadas, 4,4% (n = 133) foram positivas para o vírus Influenza, sendo 88,0% (n = 117) IA e 12,0% (n = 16) IB. Entre as amostras IA, 94 eram H3N2, 7 H1N1 e 16 não foram subtipadas pela *multiplex*. Um total de 74 amostras (71 H3N2 e 3 H1N1) tiveram o gene da neuraminidase sequenciado (total ou parcialmente). As sequências obtidas foram comparadas com sequências de cepas isoladas em várias regiões do mundo e com sequências das cepas vacinais recomendadas para o período. As amostras brasileiras agruparam-se nos *clusters* referentes aos anos de isolamento da amostra, demonstrando uma variação muito mais temporal que geográfica, uma vez que as cepas de diferentes localidades agruparam-se no mesmo *cluster*. Foi verificada, ainda, uma boa similaridade entre as cepas circulantes e as cepas vacinais recomendadas para o período correspondente, e, não foram encontradas mutações relacionadas com o surgimento de resistência aos antivirais inibidores de neuraminidase.

Palavras-chave: Vírus Influenza. Neuraminidase. Epidemiologia molecular. Diversidade genética. RT-PCR. Reação de sequenciamento.

ABSTRACT

Sacramento, PR. Genetic diversity of Neuraminidase of Influenza A virus, isolated from children hospitalized in São Paulo city, from 1995 to 2006. [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Influenza is one of the most important respiratory tract infections in humans, annually accounting for 3 to 5 million cases and nearly 250,000 to 500,000 deaths around the world. A striking feature of this virus is its extensive genetic and antigenic variability, especially in their surface proteins, neuraminidase (NA) and hemagglutinin (HA). This variability can happen either by point mutations that occur during replication (called drifts), as well as rearrangements of RNA segments of viruses that affect different species (shifts), generating a new virus to which the population has no immunity. Because of the serious medical and social problems, great efforts are made in the monitoring of circulating strains, both for the production of effective vaccine, and to quickly identify an emerging strain. The aim of this study was to characterize Influenza virus circulating in São Paulo city and the neuraminidase (NA) gene sequence of *Influenzavirus A* (IA) in samples from children hospitalized at Pediatric Infirmary, Nursery, and the Pediatric and Neo-natal Intensive Care Unit of the University Hospital of São Paulo, from 1995 to 2006. Clinical specimens from 3009 children aged <5 years, hospitalized with respiratory symptoms, underwent duplex RT-PCR for detection and typing of Influenza virus, followed by multiplex RT-PCR for subtyping of Influenza virus A. The NA gene of the positive samples for Influenza A virus was amplified and sequenced. Among the 3009 samples, 4.4% (n = 133) were positive for influenza virus, 88.0% (n = 116) for Influenza A and 12.0% (n = 16) for Influenza B. Among the samples of Influenza A, 94 were characterized as H3N2, 7 H1N1 and 16 were not subtyped by Multiplex RT-PCR. A total of 74 samples (71 H3N2 and 3 H1N1) had the NA gene sequenced (total or partially). The nucleotide sequences obtained were compared with nucleotide sequences of strains isolated in several regions of the world, and with sequences of vaccine strains recommended for the period. Brazilian samples were grouped in clusters with samples isolated in the same year, indicating much more a temporal variation than geographical, since the strains from different locations were in the same cluster. It was also found a good similarity between the circulating strains and vaccine strains recommended for the corresponding period, and no mutations were found related to the emergence of antiviral resistance to neuraminidase inhibitors.

Key words: Influenza viruses. Neuraminidase. Molecular epidemiology. Genetic diversity. RT-PCR. Sequencing reaction.

1 INTRODUÇÃO

A gripe é uma doença infecciosa aguda de origem viral, que acomete o trato respiratório e anualmente atinge cerca de 500 milhões de pessoas, mais de 10% da população mundial (GERDIL, 2003). A cada inverno, mais de 100 milhões de pessoas adquirem a doença (OXFORD e LAMBKIN, 1998) e, crianças, idosos e pacientes imunossuprimidos podem desenvolver complicações mais sérias como pneumonia, podendo ser fatal (MONTA, 2002).

1.1 Histórico

Há vários milênios já se descrevia uma doença com aspectos muito semelhantes à doença que hoje conhecemos como gripe. A primeira descrição científica data de 412 a.C., quando Hipócrates, médico e filósofo grego, relatou uma doença respiratória aguda que acometeu o exército ateniense (HOEHLING, 1961).

Foram descritos, na Idade Média, numerosos episódios relacionados à doença e o primeiro relato no continente Americano ocorreu em Texcoco, México, em 1552 ((KOLATA, 1999; VALDEZ, 2002; VIESCA, 1996). O termo Influenza surgiu na Itália, em 1580, para descrever que os aspectos clínicos de febre, de tosse e de calafrio de uma epidemia seriam decorrentes de “influências planetárias” (MURPHY e WEBSTER, 1996; TALAVERA, 1999; VALDEZ, 2002), mas, somente em 1933, durante uma epidemia na Inglaterra, o vírus foi isolado (SMITH, ANDREWES, LAIDLAW, 1933; WILEY, WILSON, SKEHEL, 1981).

1.2 Classificação

Os vírus Influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* (van REGENMORTEL et al., 2000) que é constituída de cinco gêneros: *Influenzavirus A* (IA), *Influenzavirus B* (IB), *Influenzavirus C* (IC), *Thogotovirus* e *Isavirus* (FAUQUET et al., 2004). Desses, somente os gêneros *Influenzavirus A*, *B* e *C* apresentam relevância clínica em humanos, sendo que o *Influenzavirus A* pode acometer um amplo espectro de hospedeiros, incluindo os homens, mamíferos aquáticos, porcos, cavalos e uma larga variedade de aves. Os gêneros *B* e *C* são restritos aos humanos com raros relatos de isolamento do gênero *B*, em focas, e do *C*, em porcos (BOON et al., 2001). O gênero *Thogotovirus* contém as espécies *Dhori virus* e *Thogo virus*, que acometem carrapatos (HAGMAIER et al., 2003) e os *Isavirus* são importantes

patógenos na aquicultura marinha do salmão (FAUQUET et al., 2004; KIBENGGE et al., 2001).

O sistema de nomenclatura da Organização Mundial de Saúde (OMS), para os vírus Influenza, especifica o gênero, o hospedeiro (para espécies animais), a localização geográfica do primeiro isolamento, o número da amostra e o ano do isolamento. A descrição antigênica da hemaglutinina (HA) e da neuraminidase (NA), glicoproteínas de superfície, é dada entre parênteses, somente para o *Influenzavirus A* [ex. A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] (RÖHM et al., 1996; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1980). Até o presente, foram descritos 16 tipos de hemaglutinina e nove tipos de neuraminidase (FOUCHIER et al., 2005) (**Figura 1 A e B**), sendo que todos são encontrados nos vírus aviários. Embora já tenham sido descritos casos humanos com H1, H2, H3, H5, H7 e H9, atualmente três tipos de hemaglutininas (H1, H2 e H3) e dois tipos de neuraminidasas (N1 e N2) estão adaptadas para infectar seres humanos (NETO et al., 2003; PODDAR, 2002).

Figura 1: Filogenia dos 16 tipos de hemaglutinina e dos 9 tipos de neuraminidase. As árvores filogenéticas de máxima verossimilhança foram geradas pela comparação de nucleotídeos (nt) das HA (**A**) e das NA (**B**). A escala das barras representa aproximadamente 10% de trocas de nucleotídeos entre os ramos próximos (PALESE e SHAW, 2006).

As partículas virais, quando adaptadas em culturas celulares, geralmente são esféricas ou ovóides, apresentando um diâmetro de 80-120 nm. Cepas recém-isoladas são pleomórficas,

podendo ter características filamentosas com comprimento de aproximadamente 300nm (MURPHY e WEBSTER, 2001).

Os *Influenzavirus A* têm uma estrutura complexa e possuem uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira. Nessa membrana estão inserida as proteínas HA, NA e M2 que se projetam da superfície do vírus. A proteína de matriz (M1) encontra-se logo abaixo da membrana lipídica e no interior da partícula viral há o complexo RNP (ribonucleoproteína), que consiste de segmentos de RNA viral, e das proteínas PB1 (polimerase básica 1), PB2 (polimerase básica 2), PA (polimerase ácida) e NP (nucleoproteína) (COMPANS, MEIER-EWERT, PALESE, 1974) (**Figura 2**). Cada partícula viral individual empacota os oito segmentos de RNA (NODA et al., 2006). As proteínas de exportação nuclear (NSP) e a não estrutural 2 (NS2) estão presentes nos purificados virais (RICHARDSON e AKKINA, 1991). Em geral, a composição total das partículas virais é de 1% de RNA, 5 a 8% de carboidratos, 20% de lipídeos e aproximadamente 70% de proteínas (PALESE e SHAW, 2006).

Figura 2: Representação esquemática da estrutura viral do *Influenzavirus A*. Fonte: Imagem alterada de Fields Virology, 4ª ed., capítulo 47.

Os *Influenzavirus B* são na maior parte indistinguíveis dos *Influenzavirus A* pela microscopia eletrônica. Esses vírus têm 4 proteínas inseridas na membrana lipídica: HA, NA, NB e BM2 (BETAKOVA, NERMUT, HAY, 1996; BRASSARD, LESER, LAMB, 1996; ODAGIRI, HONG, OHARA, 1999) e a M1 e os complexos RNP compõem o interior da partícula viral.

Os *Influenzavirus C* são conhecidos por possuírem estruturas reticulares hexagonais na superfície e por formarem raramente estruturas longas na superfície das células infectadas

(APOSTOLOV e FLEWETT, 1969; MURAKI et al., 2004; NISHIMURA et al., 1990). Os vírus Influenza C também possuem um complexo com as três polimerases e a proteína NP, as quais estão associadas aos sete segmentos de RNA. A proteína M1 dos IC parece desempenhar um papel semelhante àquele dos IA e IB. A maior glicoproteína, hemaglutinina-esterase-fusão (HEP) combina as funções da HA e NA e é por isso que os IC possuem um segmento a menos que os outros gêneros (A e B), ou seja, a proteína NA está ausente nesses vírus. A HEP está inserida dentro da membrana lipídica, juntamente com a CM2 (NAKADA et al., 1984, 1985; PEKOSZ e LAMB, 1997).

1.3 Organização genômica

O genoma viral é constituído de uma fita simples, segmentada, de RNA com polaridade negativa (-ssRNA) (CLAAS et al., 1992; ELLIS et al., 2003). Os genomas dos *Influenzavirus* A e B possuem 8 segmentos, sendo que os IA codificam pelo menos 11 proteínas, os IB codificam pelo menos 9 proteínas (CHEN et al., 2001; PALESE e SHAW, 2006; PORTELA e DIGARD, 2002) e o genoma dos *Influenzavirus* C, porém, possui 7 segmentos que codificam 9 proteínas (KENDAL, DOWDLE, NOBLE, 1985; NEUMANN, HUGHES, KAWAOKA, 2000). Cada segmento viral contém regiões não codificadoras nas extremidades 5' e 3', que flanqueiam as regiões codificadoras. Algumas dessas sequências são segmento-específico, mas as extremidades são conservadas em todos os segmentos nos vírus Influenza (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 2000; ZHEN, PALESE, GARCIA-SASTRE, 1996).

Os três primeiros segmentos dos IA codificam para as polimerases (PB2, PB1 e PA), o quarto, quinto e sexto segmentos codificam para a HA, NP e NA, respectivamente. O sétimo segmento codifica para duas proteínas, M1 e M2 e o oitavo para as proteínas NEP e NS2 (**Figura 3**).

Figura 3: Esquema representativo do genoma do vírus Influenza A/Puerto Rico/8/34. Cada um dos retângulos representa um segmento de RNA (sentido positivo) e a sua proteína codificada. Os tamanhos, em nucleotídeos e em aminoácidos (aa), respectivamente, estão representados pelos algarismos localizados nas extremidades. As linhas esquematizadas nas extremidades 5' e 3' representam as regiões não codificadoras. O segmento PB1 contém um segundo quadro de leitura aberto (ORF) que vem depois do ORF que origina a proteína PB1, resultando na proteína PB1-F2. As proteínas M2 e NEP/NS2 são codificadas por *splicing* do RNA mensageiro (RNAm) (os introns estão indicados pelas linhas com formato em V). Fonte: Imagem retirada de Fields Virology, 5ª ed., capítulo 47.

O genoma dos vírus Influenza B é similar ao IA (**Figura 4**). Novamente, oito segmentos codificam para uma ou mais proteínas virais, com os três primeiros RNAs codificando as proteínas da polimerase, o quarto RNA codifica a HA e o quinto e o sexto RNA codificam a NP e NA, respectivamente (RACANIELLO e PALESE, 1979). O gene da NA possui dois quadros de leitura abertos responsáveis pela codificação das proteínas NB e NA (SHAW, CHOPPIN, LAMB, 1983). O sétimo RNA codifica a proteína M1 (248 aa) e BM2 (109 aa). O códon de terminação (UAA) da M1 se sobrepõe ao códon de iniciação (AUG) para a proteína BM2, formando um pentanucleotídeo (UAAUG) de tradução de início e fim (HORVATH et al., 1990). O oitavo RNA codifica as proteínas NS1 e NEP/NS2, pelo mecanismo de *splicing* do RNAm. As regiões não codificadoras do genoma dos IB são maiores que às dos IA.

Figura 4: Esquema representativo do genoma do vírus Influenza B/Lee/40. Cada um dos retângulos representa um segmento de RNA (sentido positivo) e a sua proteína codificada. Os tamanhos, em nucleotídeos e em aminoácidos, respectivamente, estão representados pelos algarismos localizados nas extremidades. As linhas esquematizadas nas extremidades 5' e 3' representam as regiões não codificadoras. O segmento NA contém um quadro de leitura aberto adicional, que está localizado a 7 nucleotídeos do códon de início da NA, resultando na proteína NB. O segmento M codifica as proteínas M1 e BM2. O códon de terminação (UAA) da M1 se sobrepõe ao códon de iniciação (AUG) para a proteína BM2, em um pentanucleotídeo (UAAUG) de tradução de início e fim. O segmento NS codifica as proteínas NS1 e NEP/NS2. A NS1 é um produto traduzido de um RNAm linear, enquanto que a NEP/NS2 é um produto do *splicing* do RNAm (os introns são mostrados pelas linhas com formato em V). Os asteriscos indicam que os segmentos de RNA são do vírus B/Memphis/97/12. Fonte: Imagem retirada de Fields Virology, 5ª ed., capítulo 47.

O genoma dos IC tem somente sete segmentos de RNA (**Figura 5**). Os três primeiros codificam para as três polimerases: PB1 e PB2, homólogas às proteínas correspondentes nos IA e IB, e a terceira polimerase, nomeada P3, que não apresenta característica de carga ácida em pH neutro como a proteína correspondente PA dos IA e IB (YAMASHITA, KRYSTAL, PALESE, 1989). O quarto RNA codifica a proteína HEP, que combina as atividades de fusão, destruição de receptores e hemaglutinação (HERRLER et al., 1988). A nucleoproteína (NP) é codificada pelo quinto RNA viral. O sexto RNA codifica as proteínas CM1 e CM2, que é expressa quando ocorre o *splicing* do RNAm (PEKOSZ e LAMB, 1997; PEKOSZ, HE, LAMB, 1999; YAMASHITA, KRYSTAL, PALESE, 1988). Finalmente, o sétimo RNA codifica a proteína NS1 (246 aa) e a proteína NEP/NS2 (182 aa) quando ocorre o *splicing* do RNAm (ALAMGIR et al., 2000; HONGO et al., 1992).

Figura 5: Esquema representativo do genoma do vírus Influenza C. Cada um dos retângulos representa um segmento de RNA (sentido positivo) e a sua proteína codificada. Os tamanhos, em nucleotídeos e em aminoácidos, respectivamente, estão representados pelos algarismos localizados nas extremidades. As linhas esquematizadas nas extremidades 5' e 3' representam as regiões não codificadoras. O segmento M codifica as proteínas CM1 e CM2. A proteína CM2 é derivada de um RNAm colinear. O precursor p42 contém um peptídeo sinal (SP), que se cliva e libera a CM2. A CM1 é produto do *splicing* do RNAm, quando o códon de terminação UGA é introduzido pelo *splicing*. O segmento NS codifica as proteínas NS1, por meio do RNAm colinear, e NEP/NS2 pelo *splicing* do RNAm (os introns são mostrados pelas linhas com formato em V). (As proteínas PB2, PB1 e P3 são derivadas do vírus C/JJ/50; HEF* é derivado do vírus C/JHB/1/66; NP** e M** derivam do vírus C/AnnArbor/1/50 e NS*** é derivada do vírus C/Yamagata/1/88). Fonte: Imagem retirada de Fields Virology, 5ª ed., capítulo 47.

1.4 Estrutura do vírus

A proteína PB1, codificada pelo segmento 2, catalisa a adição sequencial de nucleotídeos durante o alongamento da cadeia de RNA e contém os motivos conservados característicos da RNA-polimerase/RNA-dependente. O sítio ativo para a atividade de polimerização é um motivo S-D-D nas posições 444 a 446 (BISWAS e NAYAK, 1994). A PB1 também é responsável pela ligação nas extremidades terminais do RNA viral (RNA_v) e do RNA complementar (RNA_c) para iniciar a transcrição e a replicação, respectivamente (GONZALEZ e ORTIN, 1999; LI, RAMIREZ, KRUG, 1998). A interação com o final 3' do RNA_v ativa a função de endonuclease da PB1 (CIANCI, TILEY, KRYSTAL, 1995; HAGEN et al., 1994; LI, RAO, KRUG, 2001), que gera o *primer* com *cap* requerido para a síntese do RNAm. O domínio catalítico para a atividade de endonuclease reside em uma região que abrange os resíduos 508 a 522 e contém três resíduos essenciais (E508, E519 e D522) (LI, RAO, KRUG, 2001).

Um peptídeo adicional, denominado PB1-F2, que é encontrado na maioria dos IA, é

gerado devido a um quadro de leitura aberto alternativo, localizado próximo ao final 5' do gene PB1. Esse peptídeo possui 87 aminoácidos e, até o momento, é considerado como uma proteína acessória, pois algumas cepas de vírus Influenza A isoladas de humanos e animais não a expressam. Assim, seu papel ainda não está completamente compreendido, porém parece causar alterações morfológicas, destruição da membrana mitocondrial da célula hospedeira seguida de morte celular (CHEN et al., 2001).

A forma com que o complexo da polimerase muda para adaptar-se a novos hospedeiros não é bem definida. No entanto, diversos autores relataram que a alteração de um único aminoácido da PB2 pode estar relacionada à adaptação de vírus aviários aos mamíferos, como verificada em um caso fatal de infecção pelo H7N7 em humanos em 2003 na Holanda e em recentes casos isolados de H5N1 humano no Vietnã e Tailândia (FOUCHIER et al., 2004; NAFFAKH et al., 2000; SHINYA et al., 2004; TAUBENBERGER et al., 2005).

A proteína PB2 desempenha um papel crítico no início da transcrição, pois é responsável pela ligação do *cap* nas moléculas de pré-RNAm (BLAAS, PATZELT, KUECHLER, 1982). Entretanto, a posição do sítio de ligação ainda não está estabelecida, sendo descrito o envolvimento dos aminoácidos 533 a 564 (LI, RAO, KRUG, 2001) e de outros dois domínios, compreendendo os resíduos 242 a 282 e 538 a 577 (HONDA, MIZUMOTO, ISHIHAMA, 1999). Além de seu papel na transcrição, a PB2 também está envolvida na replicação, porque algumas mutações nessa proteína têm demonstrado que afetam a replicação, mas não a transcrição (GASTAMINZA et al., 2003).

Nenhuma função específica tem sido atribuída à proteína PA, mas mutações que afetam tanto a transcrição quanto a replicação têm sido descritas, indicando que essa proteína possui um papel em ambos os processos (FODOR et al., 2002, 2003; HUARTE et al., 2003).

A hemaglutinina (HA) é a maior glicoproteína de superfície e é codificada pelo quarto segmento do RNA genômico, que possui 1742 a 1778 nucleotídeos. Inicialmente é sintetizada como precursor (H_0), com $PM \cong 76.000$ e com 562 a 566 resíduos de aminoácidos. O processamento após tradução envolve mecanismos de glicosilação, adição de ácidos graxos e clivagem proteolítica, que são essenciais para a função da molécula. A clivagem desse precursor resulta em duas subunidades, HA1 ($PM \cong 47.000$) e HA2 ($PM \cong 29.00$) que permanecem unidas por ligações dissulfeto (HULSE et al., 2004; LEE e CHEN, 2004; SAKAI, OHUCHI, OHUCHI, 2002). A subunidade HA1, com 319 a 326 aminoácidos, corresponde à porção animoterminal da proteína e é externa à membrana lipídica. A subunidade HA2, com 221 a 222 aminoácidos, permanece ancorada no interior da membrana lipídica. Dependendo do subtipo da hemaglutinina, o número de resíduos de aminoácidos perdidos

durante a clivagem proteolítica pode variar de 1 a 6 (LEE e CHEN, 2004; MURPHY e WEBSTER, 2001).

A análise de variantes virais possibilitou a identificação de cinco sítios antigênicos na região HA1 da hemaglutinina, denominados pelas letras A a E, envolvidos na neutralização viral pelos anticorpos. Esses *loci* são passíveis de sofrer mutações, sendo as regiões de maior variabilidade da HA. Os demais sítios de HA1 são conservados, condição necessária para manter a estrutura e função da molécula (MURPHY e WEBSTER, 2001; WILEY, WILSON, SKEHEL, 1981).

A nucleoproteína (NP) é a maior proteína estrutural, rica em arginina e é codificada pelo quinto segmento. A NP é o principal alvo de reação cruzada dos linfócitos T citotóxicos gerados após infecção por todos os subtipos de influenza e em conjunto com a RNA-polimerase/RNA-dependente atua na transcrição e replicação do genoma viral (YEWDELL E HACKETT, 1989).

A neuraminidase (NA), segunda maior glicoproteína de superfície dos *Influenzavirus A* e B, é um tetrâmero, com formato de cogumelo, que é codificada pelo sexto segmento do RNA viral. A NA é uma proteína de membrana integral tipo II, com a porção N-terminal voltada para o interior do vírus e é formada por um polipeptídeo de 469 resíduos de aminoácidos (PM $\cong$ 220.000) (LAVER, 2002; XU et al., 1996). A NA dos IA tem uma curta cauda citoplasmática altamente conservada e uma região transmembrânica hidrofóbica que fornece a âncora para a cauda e os domínios da cabeça. A estrutura da cabeça da NA subtipo 2 (N2) é um homotetrâmero, no qual cada monômero é composto de seis folhas beta, topologicamente idênticas, dispostas em formato de hélice. Os resíduos de açúcar estão ligados a quatro dos cinco sítios potenciais de glicosilação da cabeça (BURMEISTER, RUIGROK, CUSACK, 1992).

A NA é responsável pela clivagem do ácido siálico dos receptores celulares, sendo de extrema importância para a infecção viral, pois permite que os novos vírus formados consigam infectar novas células (GOTTSCALK, 1957; MOSCONA, 2005). A NA também previne que os novos virions formados liguem-se uns aos outros, assegurando que os vírus não se agreguem (COLMAN, 1999; ENGLUND, 2002; GUBAREVA, KAISER, HAYDEN, 2000; STIVER, 2003). A degradação do ácido siálico do muco extracelular e a destruição dos receptores de HA, presentes na superfície das células hospedeiras, facilitam a infecção, impedindo que as partículas virais geradas no processo de replicação fiquem imobilizadas na superfície das células infectadas (DESHPANDE et al., 1987; HULSE et al., 2004; WAGNER et al., 2000). A NA também pode desempenhar um papel no início da infecção, podendo facilitar a entrada do vírus e/ou

intensificar o tráfico tardio do endossomo/lisossomo (MATROSOVICH et al., 2004a; SUZUKI et al., 2005).

A função da NA dos IB é semelhante, mas não idêntica, à NA dos IA (GHATE e AIR, 1999; LUO, NOBUSAWA, NAKAJIMA, 2002) e os sítios ativos das NAs de ambos os gêneros são conservados, o que permite uma atividade de amplo espectro dos inibidores da NA. Nos IC, a destruição do receptor é realizada pela atividade esterase da HEF viral, facilitando a liberação e a dispersão dos vírus das células infectadas. Além disso, parece que a enzima é necessária para a entrada do vírus, sugerindo que há uma necessidade para a HEF ser liberada dos receptores celulares durante os processos de fusão e desnudamento (VLASAK et al., 1989).

Como a HA, as moléculas de NA são antigênicas e variantes são selecionadas na natureza. Juntamente com a HA, são importantes imunógenos, sendo que a proteção contra os vírus Influenza está intimamente relacionada aos níveis de anticorpos anti-HA e anti-NA (KILBOURNE et al., 2004). Os sítios antigênicos dessa proteína foram mapeados pela seleção de variantes com uso de anticorpos monoclonais. Analisando amostras de *Influenzavirus A*, durante um período de 10 anos, Webster et al. (1984) definiram quatro regiões antigênicas diferentes, sendo que a região 1, compreende o sítio ativo e apresentava-se conservada entre as cepas de *Influenzavirus A* e B, enquanto as demais (2, 3 e 4) apresentaram variações antigênicas ao longo dos anos. A frequência de substituições de nucleotídeos para o gene inteiro é estimada em 2.28×10^{-3} /sítios/ano, com 42% de mutações não silenciosas e 35% dessas substituições localizadas em importantes epítomos da proteína (XU et al., 1996).

A proteína de matriz M1 e a proteína de membrana M2 são codificadas pelo sétimo segmento do RNA viral dos *Influenzavirus A* e B. A M1 é a proteína mais abundante no virion e encontra-se logo abaixo do envelope lipídico, fazendo o contato com as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas e com as RNPs, formando uma ponte entre os componentes do interior do vírus e as proteínas de membrana (NAYAK, HUI, BARMAN, 2004; SCHMITT e LAMB, 2005). A M1 está envolvida diretamente com a exportação nuclear das RNPs (CROS e PALESE, 2003). Vários estudos têm documentado a habilidade da M1 de associar-se com membranas lipídicas (ENAMI e ENAMI, 1996; NAYAK, HUI, BARMAN, 2004; RUIGROK et al., 2000; SCHMITT e LAMB, 2005; ZHANG e LAMB, 1996) e, sendo assim, é proposto que a M1 tenha um papel fundamental na montagem dos novos vírus, recrutando os componentes virais para o local de montagem na membrana plasmática e para o brotamento do vírus (GOMEZ-PUERTAS et al., 2000; LATHAM e GALARZA, 2001).

A M2 dos IA é uma proteína tetramérica de membrana integral tipo III, que possui um

domínio externo curto, um domínio transmembrânico e um domínio interno palmitado e fosfatado (LAMB, HOLSINGER, PINTO, 1994). Acredita-se que o principal papel da M2 é conduzir prótons do endossomo acidificado para o interior do vírus para facilitar a dissociação do complexo RNP do restante dos componentes virais, finalizando, assim, o processo de desnudamento durante a replicação viral (HAY, 1992). Nos IB duas proteínas são codificadas, a M1 e a BM2 (BRIEDIS, LAMB, CHOPPIN, 1982) e nos IC o segmento 6 é responsável pela codificação da matriz proteica M1 e da proteína CM2, expressa em abundância na superfície da célula infectada (HONGO et al., 1997).

As proteínas não estruturais NS1 e NS2 são codificadas pelo oitavo segmento. A NS1 é uma proteína dímera, nuclear, altamente expressa em células infectadas (HATADA e FUKUDA, 1992; NEMEROFF, QIAN, KRUG, 1995), que está associada ao processo de tradução do RNAm (EGOROV et al., 1998), inibindo a exportação nuclear do RNAm (KAWAOKA et al., 1998). A NS2, também conhecida como NEP (*nuclear export protein*), está envolvida no direcionamento da exportação nuclear das RNPs para o citoplasma, juntamente com a M1 (CROS e PALESE, 2003).

1.5 Replicação viral

Os vírus Influenza ligam-se aos ácidos siálicos presentes na superfície das células para iniciar a infecção e a replicação viral. A interação dos vírus Influenza com uma molécula como o ácido siálico é limitada pelo fato de que as HAs desses vírus, que replicam em diferentes espécies, mostram especificidade pelos ácidos siálicos com diferentes ligações. Os vírus Influenza humanos, preferencialmente, ligam-se aos ácidos siálicos que têm o ácido N-acetilneuramínico ligado à penúltima galactose por meio da ligação α 2,6 (o carbono 6 da galactose liga-se ao carbono 2 do ácido siálico), enquanto que os vírus Influenza aviários, principalmente, preferem aqueles ácidos siálicos que fazem a ligação α 2,3 (CONNOR et al., 1994; IBRICEVIC et al., 2006; NICHOLLS et al., 2007; SHINYA et al., 2006). Em concordância com esse fato verifica-se que as células epiteliais da traqueia humana contêm principalmente ligações α 2,6, enquanto que o epitélio intestinal de patos possui ligações α 2,3 (COUCEIRO et al., 1993; ITO et al., 1998). Deve-se notar, contudo, que esta especificidade viral não é absoluta e que as células aviárias e humanas podem conter, ambas, as ligações (α 2,3 e 2,6) (MATROSOVICH et al., 2004b).

A ligação da HA aos ácidos siálicos vai induzir a entrada do vírus na célula por endocitose mediada por receptores formando um endossoma. Os endossomas vão ser

acidificados no citoplasma até $\text{pH} \cong 5.0$, provocando a clivagem do monômero da HA em dois polipeptídeos, o HA1 e o HA2 (SKEHEL e WILEY, 2000; STEGMANN, 2000). A clivagem da HA é uma exigência para a infectividade viral e a natureza do sítio de clivagem da HA é um importante determinante da virulência para os vírus Influenza. A eficiência da clivagem da HA varia de acordo com a presença de um ou vários resíduos básicos no sítio de clivagem de HA1 e HA2 e da capacidade de ligação da neuraminidase ao plasminogênio (NAYAK, HUI, BARMAN, 2004).

Com a clivagem, a HA sofre mudanças conformacionais que expõe o peptídeo de fusão na extremidade N-terminal da subunidade HA2, propiciando a fusão das membranas viral e endossomal (COLMAN e LAWRENCE, 2003). Partículas virais contendo HA não clivada, podem se ligar e ser endocitadas, mas não conseguem sofrer fusão e, assim, tornam-se não infecciosas. A acidificação do endossoma ativa o canal de íon M2, que transporta íons H^+ para a região interna do virion, desestabilizando a M1, facilitando, portanto, a liberação das RNPs virais (RNPsv) para dentro do citoplasma da célula, uma vez que desestabiliza a M1. As RNPsv livres da M1, com 10 a 20 nm de largura, são consideradas muito largas para passarem por difusão passiva para o núcleo (MARTIN-BENITO et al., 2001). Portanto, essa importação ocorre, normalmente, através dos poros nucleares, por um processo ativo envolvendo os sinais de transporte nuclear (SNL), presentes nas proteínas da RNP, e a maquinaria de importação nuclear (CROS e PALESE, 2003; NEUMANN, HUGHES, KAWAOKA, 2000; NIETO et al., 1994; WANG, PALESE, O'NEILL, 1997; WEBER et al., 1998). No entanto, são os três potenciais sinais da NP que são essenciais para a importação do RNA viral para o núcleo (CROS, GARCIA-SASTRE, PALESE, 2005; O'NEIL et al., 1995).

Uma vez no núcleo, o RNA viral de fita negativa é transcrito em RNAm por um mecanismo *primer*-dependente. Os produtos desse RNAm são cópias incompletas do molde do RNAv e sofrem adição do *cap* e da cauda de poli-A, diferentemente do RNAv. A replicação ocorre em duas etapas. Primeiramente, é feita a cópia de sentido positivo completa do RNAv, que é o RNA complementar (RNAc) que, por sua vez, é usado como molde para a síntese do RNAv genômico de fita negativa (**Figura 6**). Todas essas reações são catalisadas pelo mesmo complexo de polimerases virais, embora as funções distintas de cada subunidade sejam empregadas em diferentes passos (FODOR e BROWNLEE, 2002; NEUMANN et al., 2004).

Figura 6: Síntese do RNA do vírus Influenza. O RNA de fita negativa está mostrado no meio com as sequências conservadas nas pontas adjacentes ao segmento de nucleotídeos específicos (NNN). O sinal de poliadenilação consiste de uma poliuridina extensa no final 5' do RNAv. O RNAm possui *cap* de 10 a 13 nucleotídeos e uma cauda de poli-A. O RNAc é uma cópia exata da fita positiva do RNA do virion. A variação da posição 4 da região não codificadora do final 3' está indicado. Fonte: Imagem retirada de Fields Virology, 5ª ed., capítulo 47.

Dentro do núcleo, ocorrem os processos de transcrição (síntese do RNAm) e replicação (síntese do RNA complementar com polaridade positiva [RNAc] seguido do RNA viral [RNAv] de fita negativa e das RNPsv) (ELTON, TILEY, DIGARD, 2002; PORTELA e DIGARD, 2002). As novas RNPsv são exportadas do núcleo para o citoplasma com ajuda das proteínas M1 e NEP (CHEN e KRUG, 2000). Finalmente, as proteínas de membrana (HA, NA, M2), de matriz (M1) e as RNPsv (contendo o RNAv de fita negativa, e as proteínas NP, as 3 polimerases e a NEP) são transportadas para o local de montagem na membrana plasmática onde as partículas do vírus são construídas e liberadas para o exterior da célula. A figura 7 ilustra o ciclo de replicação dos vírus Influenza.

Figura 7: Ilustração do ciclo de replicação dos vírus Influenza. Após a ligação com a superfície da célula hospedeira, o vírus é internalizado por endocitose mediada por receptor. O baixo pH no endossoma alavanca a fusão das membranas do endossomo e do vírus, liberando as RNPs virais para o citoplasma. As RNPsv são importadas para o núcleo, onde servirão como modelo para a transcrição. As novas proteínas são sintetizadas a partir do RNAm viral. O genoma viral (RNAv) é replicado por intermédio do RNAc. Recém-sintetizadas, as RNPsv são exportadas do núcleo para o local de montagem na membrana plasmática apical, onde as novas partículas virais são formadas e liberadas. Fonte: Imagem retirada de Fields Virology, 5ª ed., capítulo 47.

1.6 Transmissão e sintomatologia

Os vírus se replicam nas células epiteliais colunares do trato respiratório, misturam-se às secreções respiratórias e geram pequenas gotículas que são espalhadas durante o ato de espirrar, tossir ou falar (HILLEMANN, 2002; NETO et al., 2003). O período de incubação é bastante curto, variando de 1 a 4 dias, e um único indivíduo infectado pode potencialmente transmitir a doença para um grande número de pessoas susceptíveis (KENDAL, DOWDLE, NOBLE, 1985; NETO et al., 2003). Os adultos começam a transmitir o vírus 24 horas antes do início dos sintomas, até sete dias após. As crianças podem transmitir o vírus por período mais prolongado, desde vários dias antes, até 10 dias após o início dos sintomas (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2006). Os sintomas mais frequentes da gripe são caracterizados por febre (38° a 40°C, com duração de aproximadamente 1 a 3 dias e pico nas primeiras 24 horas), dor de cabeça, dor de garganta, congestão nasal, mialgia, anorexia e fadiga. Com menor frequência podem ser observadas, náusea, dor abdominal, diarreia e fotofobia (GAVIN e THOMSON, 2003).

As infecções causadas pelos *Influenzavirus* A e B são caracterizadas pela degeneração das células epiteliais do trato respiratório com perda de epitélio ciliar e descamação. Os efeitos patológicos ocorrem devido aos danos causados ao epitélio respiratório combinado à resposta imune (HAYDEN e PALESE, 2002). As infecções têm geralmente um quadro clínico similar, com sintomas que variam desde infecção suave do trato respiratório inferior à pneumonia (BOON et al., 2001). A frequência de infecções graves com necessidade de internação ou com complicações fatais está mais associada com as infecções causadas pelo *Influenzavirus* A (SIMONSEN et al., 1997). O *Influenzavirus* C relaciona-se à infecções respiratórias mais brandas que acometem, principalmente, imunossuprimidos e idosos (PONTORIERO et al., 2003). Eventualmente, a influenza causa complicações mais raras como miosite, miocardite, convulsão febril, encefalite, rabdomiólise e síndrome de Reye (CDC, 2003). Em crianças, o vírus Influenza pode provocar, além dos sintomas respiratórios, complicações como a otite média aguda (HEIKKINEN, 2000).

1.7 Caracterização antigênica

Dois tipos de variações antigênicas são responsáveis pela habilidade dos vírus Influenza causarem epidemias sazonais recorrentes e pandemias ocasionais: os *drifts* e os *shifts* antigênicos (COX e SUBBARAO, 1999).

Os *drifts* antigênicos (mudanças menores) ocorrem, em média, a cada 2 ou 3 anos para os subtipos do *Influenzavirus A* e a cada 5 ou 6 para os *Influenzavirus B*, causando as epidemias anuais. As variações antigênicas são decorrentes de mutações pontuais nos segmentos do genoma viral que resultam em mudanças nos aminoácidos que compõem as glicoproteínas de superfície permitindo, muitas vezes, o escape de anticorpos neutralizantes (COX e FUKUDA, 1998; COX e SUBBARAO, 1999; SMITH et al., 2004).

Os *shifts* antigênicos (mudanças maiores), específicas dos *Influenzavirus A*, são variações geradas pelo rearranjo entre os segmentos do genoma viral que acometem diferentes espécies, durante a co-infecção de uma célula hospedeira. Esse mecanismo pode ocasionar o surgimento de novos vírus contendo proteínas diferentes, podendo ter uma nova hemaglutinina ou neuraminidase, ou ainda com as duas glicoproteínas novas, imunogenicamente diferentes das cepas circulantes (PONTORIERO et al., 2003).

A maioria da população não tem imunidade para esses novos vírus e a doença dissemina-se rapidamente, afetando indivíduos de todas as faixas etárias, ocasionando as pandemias (NETO et al., 2003; PONTORIERO et al., 2003). Como exemplo, podemos citar as pandemias do século XX: (i) a gripe espanhola em 1918, que matou aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo todo (CROSBY, 1989; JOHNSON e MUELLER, 2002; REID e TAUBENBERGER, 1999) com o surgimento de um novo subtipo, H1N1 (COX e SUBBARAO, 2000; WEBSTER et al., 1992); (ii) a gripe asiática em 1957, com o surgimento do subtipo H2N2 gerado pela incorporação dos genes codificadores da HA, NA e PB1 de vírus aviários nos vírus humanos circulantes e (iii) a pandemia de 1968, quando o subtipo H3N2, formado pela incorporação dos genes HA e PB1 de aves em vírus humanos circulantes, apareceu em Hong Kong (PONTORIERO et al., 2003; STEPHENSON e ZAMBON, 2002). Em 1977, a gripe russa foi causada pelo ressurgimento do subtipo H1N1 acometendo principalmente crianças e jovens (MURPHY e WEBSTER, 2001). Em contraste ao ocorrido em 1968, quando o novo vírus Influenza H3N2 substituiu o vírus H2N2 circulante, o vírus H3N2 não foi substituído pelo ressurgimento do H1N1, e os dois subtipos, H1N1 e H3N2, têm co-circulado na população humana juntamente com o *Influenzavirus B* (ELLIS et al., 2003).

Outro mecanismo relacionado ao surgimento de uma nova linhagem pandêmica é a transmissão direta interespecie, como ocorreu com o vírus de Influenza aviária H5N1 e, recentemente, com o vírus Influenza A H1N1.

1.8 Epidemiologia

A Influenza é uma das mais importantes infecções do trato respiratório em humanos, sendo responsável por 3 a 5 milhões de casos e pela morte de 250.000 a 500.000 pessoas no mundo todo, anualmente (WHO, 2009a). A infecção respiratória aguda causada pelos vírus Influenza atinge todos os grupos etários, e ao contrário da maioria dos vírus, pode causar infecções recorrentes. Devido à facilidade de disseminação e às altas taxas de mutação de seus antígenos de superfície, anualmente ocorrem epidemias que são responsáveis por aproximadamente 500.000 a um milhão de óbitos em todo o mundo (LAYNE et al., 2001), podendo ocorrer, com menor frequência, pandemias (NETO et al., 2003).

Nos EUA, o vírus Influenza causa aproximadamente 36 mil mortes e estima-se que, em média, seja diretamente responsável por cerca de 200 mil hospitalizações/ano, sendo as maiores taxas concentradas em populações consideradas de alto risco (idosos com mais de 65 anos, crianças menores de cinco anos, portadores de pneumopatias crônicas, hemoglobinopatias, neoplasias, diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, cardiopatia congênita, indivíduos imunossuprimidos) (SIMONSEN et al., 2000; THOMPSON et al., 2003, 2004).

Durante os surtos de influenza ocorre aumento significativo de consultas médicas nos serviços primários de saúde e nos de emergência por doença respiratória febril (NEUZIL et al., 2000a; NEUZIL, HOHLBEIN, ZHU, 2002). A infecção por vírus Influenza tem sido associada a 15 a 20% de todas as doenças respiratórias avaliadas por médico e até 40% destas ocorrem em pacientes maiores de 15 anos de idade. Além disso, a falta ao trabalho e as hospitalizações por pneumonia também aumentam durante a epidemia por vírus Influenza (ARRUDA e HAYDED, 1999; NEUZIL, HOHLBEIN, ZHU, 2002), sendo que mais de 50% das internações são de pessoas com mais de 65 anos de idade (SIMONSEN et al., 2000).

A Influenza é, também, uma das principais causas de problemas do trato respiratório em bebês e em crianças menores de 2 anos de idade, nos quais a taxa de morbidade é semelhante à observada para os grupos de risco (LEIGH, 2006; PONS-CATALANO et al., 2003). Crianças com doenças crônicas, particularmente doenças cardiopulmonares, são mais propícias a desenvolver um quadro clínico de influenza mais severo, com complicações (GLEZEN, DECKER, PERROTTA, 1987; NEUZIL et al., 2000b). No Brasil, a morbidade da infecção por vírus Influenza em crianças não tem sido sistematicamente analisada. No entanto, há vários estudos indicando que o vírus é responsável por 2 a 22% das infecções respiratórias agudas atendidas nas unidades de pronto atendimento e por 13% das

hospitalizações dos pacientes menores de cinco anos com pneumonia ou bronquiolite (ARRUDA et al., 1991; MOURA et al., 2003; NASCIMENTO et al., 1991; SOUZA et al., 2003; STRALIOTTO et al., 2002; SUTMOLLER et al., 1983). A incidência de infecções por vírus Influenza em crianças em idade escolar é alta, sendo a taxa anual de infecções estimada entre 15 e 42% (MUNOZ, 2003). Dessa forma, as crianças têm um importante papel na introdução e disseminação do vírus Influenza em suas casas e nas comunidades (GLEZEN et al., 1987).

Epidemias de influenza de gravidade variável têm ocorrido de maneira sistemática a cada 1 a 3 anos, predominantemente no inverno (NETO et al., 2003). No hemisfério norte, os picos das epidemias, geralmente, estão entre os meses de janeiro e abril, mas podem começar no início de dezembro e ir até o final de maio (CDC, 2010a). No hemisfério sul, os surtos ocorrem entre maio e setembro. Alguns autores sugerem que o clima pode ter uma influência direta na sobrevivência do vírus, por exemplo, a baixa umidade relativa observada durante os meses de inverno, que pode favorecer sua permanência em aerossóis no ambiente, influenciando, portanto, a eficiência da transmissão. Além disso, pode influenciar a susceptibilidade do hospedeiro e proporcionar a aglomeração da população. Em contrapartida, nos países de clima tropical, a epidemiologia do vírus Influenza é diferente, podendo ocorrer em qualquer época do ano, porém as epidemias tendem de acontecer após mudanças nos padrões climáticos, como por exemplo, durante a estação de chuvas (ALONSO et al., 2007; KAMPS, HOFFMANN, PREISER, 2006; WRIGHT, NEUMANN, KAWAOKA, 2006).

No Brasil, durante os anos de 1995 a 1998, a maior incidência de influenza ocorreu nas estações do outono e do inverno, com início das epidemias no mês de março. Entretanto, o vírus pode ser detectado durante todos os meses do ano, indicando uma circulação constante (PAIVA, et al., 2000).

Um estudo recente avaliou os padrões sazonais da gripe em todas as regiões do Brasil, demonstrando um fenômeno similar a uma “onda” anual, em direção ao sul, com início da circulação viral nas zonas equatoriais, estendendo-se progressivamente para as zonas tropicais e subtropicais, com um intervalo de aproximadamente três meses entre o pico das regiões norte e sul do país (ALONSO et al., 2007).

Por outro lado, as pandemias, que acometem extensos contingentes populacionais, têm ocorrido de forma irregular, geralmente com 30 a 40 anos de intervalo (COX e SUBBARAO, 2000). As principais pandemias ocorridas no último século foram a gripe espanhola, ocorrida em 1918, a gripe asiática, ocorrida em 1952 e a Hong Kong em 1968.

A pandemia de 1918 teve grande impacto em todo o mundo, com estimativa de 50%

da população mundial infectada e de 30 milhões de óbitos. A letalidade estimada na pandemia de 1918 foi maior do que 2,5%, superior à letalidade das epidemias sazonais (0,001%) ou das pandemias de 1957 e 1968 (0,01 e 0,05%, respectivamente) (BLACK e ARMSTRONG, 2006; CUNHA, MAGALHÃES, FONSECA, 1918; LUK, GROSS, THOMPSON, 2001; PATTERSON e PYLE, 1991). As pandemias de 1957 e 1968 foram responsáveis pela morte de mais de 1,5 milhão de pessoas, causando grande perda econômica mundial, devido à diminuição de produtividade e despesas com medicamentos e internações (MURPHY e WEBSTER, 2001).

Embora a cepa H5N1, circulante entre os anos de 2003 e 2005, não tenha sido responsável por uma pandemia, sua alta patogenicidade e facilidade de disseminação entre as aves domésticas e migratórias deixou em alerta as autoridades sanitárias mundiais, levando a OMS a estabelecer uma série de medidas preventivas, visando conter sua disseminação e o estabelecimento de uma pandemia.

Os primeiros casos de influenza H5N1 em humanos ocorreram em 1997, durante uma epidemia em aves domésticas em Hong Kong, nos quais foram relatados 18 casos com 6 óbitos (SUBBARAO et al., 1998). Posteriormente, em fevereiro de 2003, mais 2 casos de influenza aviária H5N1 em humanos foram registrados, causando 1 morte (FOUCHIER et al., 2004; STURM-RAMIREZ et al., 2004; WHO, 2010a). Nesses casos, o vírus Influenza aviário H5N1 foi transmitido de aves migratórias para aves domésticas, particularmente os patos, pela contaminação da água com fezes de animais infectados. Dos patos foram transmitidos às galinhas e ao homem, tornando-se altamente patogênicos, causando uma grave epidemia na Ásia entre os anos de 2003 e 2005, com elevada taxa de mortalidade e morbidade (UNGCHUSAK et al., 2005). Até janeiro de 2010, a OMS registrou 471 casos confirmados em humanos, com 282 óbitos (WHO, 2010b). Diferentemente da influenza humana sazonal, a qual afeta principalmente idosos e bebês, a influenza aviária afetou jovens e crianças. A idade média dos casos reportados era de 18 anos, com 90% dos pacientes com idade inferior a 40 anos. Embora a taxa de mortalidade seja de 63%, indivíduos entre 10 e 18 anos de idade apresentam as maiores taxas e aqueles com idade superior a 50 anos, as menores (WHO, 2010a).

Outros vírus Influenza aviários diferentes do H5N1 também foram relatados em humanos. Em 1998 e 1999, casos do vírus aviário H9N2 foram descritos no Sul da China e Hong Kong (GUO, LI, CHENG, 1999; PEIRIS et al., 1999). Os isolados foram geneticamente similares àqueles encontrados nas codornas (A/quail/Hong Kong/G1/97 [H9N2]). Entretanto, não houve evidência de transmissão humano a humano. Durante um surto do vírus Influenza

aviária H7N7 de alta patogenicidade em aves domésticas na Holanda, em fevereiro e março de 2003, 89 pessoas foram infectadas e 83 delas desenvolveram conjutivite (FOUCHIER et al., 2004). A maioria dos casos foi leve e auto-limitado, apesar de um veterinário ter desenvolvido pneumonia fatal. Em três casos, a transmissão humano a humano foi documentada e anticorpos foram detectados em 59% dos trabalhadores que tiveram contato com as aves infectadas. Em 2004, duas pessoas desenvolveram conjutivite e sintomas respiratórios leves após um surto do vírus aviário H7N3 em aves domésticas no Canadá (TWEED et al., 2004). Esses dados ressaltam o potencial do vírus H7 e H9 de infectar os humanos, embora a transmissão entre humanos, até agora, seja limitada.

A última pandemia descrita foi causada pelo vírus Influenza A H1N1, e teve início em março/abril de 2009 no México e EUA, disseminando com grande rapidez para diversos países de todos os continentes (WHO 2009b). O novo vírus foi formado pela recombinação entre uma cepa suína da Eurásia (H1N1) e uma cepa suína da América do Norte (H1N2). Nesse caso, a cepa suína da América do Norte (H1N2) havia sofrido, anteriormente, uma tripla recombinação, sendo formada pelas proteínas PB1 e NA oriundas da cepa humana H3N2, pelas proteínas PB2 e PA de uma cepa aviária e pelas proteínas HA, NP, M, NS de uma cepa suína Norte Americana H1N1 (**Figura 8**) (MORENS, TAUBENBERGER, FAUCI, 2009). O novo vírus foi formado, portanto, pelo rearranjo natural entre os vírus que acometem diferentes espécies.

Figura 8: Relação genética entre os vírus Influenza humanos e suínos, 1918-2009.

As setas amarelas refletem a exportação de um ou mais genes do pool de genes do *Influenzavirus A* aviário. A seta vermelha descontínua indica um período sem circulação. As setas vermelhas contínuas indicam os caminhos evolucionários das linhagens do vírus Influenza humano; as setas azuis contínuas indicam os caminhos evolucionários das linhagens do vírus Influenza suíno; e a seta meio azul e vermelha indica o novo vírus humano de origem suína. Todos os *Influenzavirus A* contêm oito genes que codificam as seguintes proteínas (mostradas de cima para baixo em cada um dos vírus) polimerase PB2, polimerase PB1, polimerase PA, hemaglutinina (HA), proteína nuclear (NP), neuraminidase (NA), proteínas de matriz (M) e as proteínas não estruturais (NS). Os genes das cepas humana e suína H1N1 de 1918 e dos *Influenzavirus A* H1N1 de 1979 descenderam de genes de *Influenzavirus A* aviário e alguns foram “doados” a cepa humana H1N1 pandêmica. **Fonte:** MORENS, TAUBENBERGER, FAUCI, 2009.

Em junho de 2009 a OMS elevou o nível de alerta de pandemia para 6, o que caracteriza a disseminação mundial do vírus. O novo vírus propagava-se da mesma forma que os vírus Influenza sazonais, principalmente por meio de tosse e espirros de pessoas que estão infectadas pelo vírus, ou por contato com secreções respiratórias de pessoas contaminadas. A infecção por esse novo vírus causa sintomas parecidos ao da gripe comum, os quais incluem

febre, tosse, dor de garganta, dores no corpo, dor de cabeça, calafrio e fadiga, em alguns casos náusea, vômito e/ou diarreia (CDC, 2009a).

Até 29 de janeiro de 2010, um total de 209 países e territórios notificaram casos confirmados laboratorialmente de influenza pandêmica H1N1 2009, incluindo pelo menos 14.711 óbitos (WHO, 2010c). Acredita-se que esse número esteja subestimado, devido à recomendação da OMS de não contar os casos individuais, particularmente aqueles com evolução sem intercorrências, mas sim, dedicar-se ao monitoramento ativo da progressão da pandemia por meio de suas múltiplas fontes de dados.

No Brasil, até 28 de novembro de 2009, foram confirmados laboratorialmente 30.055 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), que são caracterizados por febre, tosse e dispnéia, sendo que 93% (27.850/30.055) eram causados pela influenza pandêmica e 7% (2.205/30.055) pela sazonal. Esse padrão foi similar ao observado pela Rede Global de Vigilância da OMS, que registrou 93% de influenza pandêmica entre todos os vírus Influenza monitorados no mundo. Entre os 27.850 casos de SRAG confirmados de influenza pandêmica, 1.632 (5,8%) evoluíram para óbito. No Brasil, a taxa de incidência de SRAG por influenza pandêmica (H1N1) 2009 foi de 14,5 casos para cada 100 mil habitantes. No entanto, observa-se que a pandemia afetou com maior intensidade as regiões sul e sudeste (66,2/100.000 e 9,7/100.000 habitantes, respectivamente) (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2009).

Cabe salientar que nos países do hemisfério norte, após um pico de circulação ocorrido durante os meses de outubro e novembro de 2009, houve um declínio da circulação, embora a transmissão do vírus continue ativa em várias regiões, particularmente o Norte da África, e algumas regiões do leste e sudeste da Europa e no sul da Ásia, particularmente na Ilha de Oknawa e na República da Korea. Nas Américas do Norte e Sul a atividade viral continua em declínio ou inalterada. Na América Central e Caribe, a transmissão do vírus Influenza ainda persiste, porém em níveis baixos (WHO, 2010c).

A influenza pandêmica (H1N1) 2009 continua a ser o vírus predominante em todo o mundo, embora o vírus Influenza sazonal H3N2 e influenza B continuem circulando em baixos níveis na África, sudeste e leste da Ásia, sendo detectados esporadicamente em outros continentes.

1.9 Diagnóstico laboratorial e clínico

Doenças com sintomatologia clínica semelhante à gripe podem ser causadas por uma

variedade de patógenos virais e não virais, como o vírus Influenza, o parainfluenzavirus, adenovírus, vírus respiratório sincicial, rinovírus, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, dificultando o diagnóstico clínico específico em todas as faixas etárias (CDC, 2010b; LONG et al., 1997; MONTO, 1994).

Em adultos com síndrome gripal clássica, num período de epidemia, o diagnóstico clínico pode ter uma acurácia de 60 a 70%. Já em crianças e idosos, essa acurácia tende a ser menor (LYNCH e WALSH, 2007). Um estudo com idosos internados mostrou que a presença de tosse, febre acima de 38°C e sintomas com duração de até sete dias foram as melhores características para diagnosticar influenza, com sensibilidade de 78% e especificidade de 74% (WALSH, COX, FALSEY, 2002). Em crianças, o diagnóstico clínico é mais difícil, pois além de não existirem sinais e sintomas específicos, outras infecções respiratórias virais febris ocorrem frequentemente durante a epidemia da gripe. A sensibilidade do diagnóstico clínico pode variar entre 38 e 80%, sendo maior durante as epidemias, porém menor com a diminuição da idade do paciente (FRIEDMAN e ATTIA, 2004; PELTOLA, ZIEGLER, RUUSKANEN, 2003; PELTOLA et al., 2005).

A confirmação laboratorial de influenza e o diagnóstico precoce são instrumentos importantes para o controle da propagação da doença e para a otimização do tratamento, permitindo a utilização de terapia antiviral específica (BESSELAAR et al., 2004). As amostras de secreção nasofaríngea, obtidas por *swab* ou aspirado nasal, são as espécimes de escolha (HARMON, 1992). Essas devem ser obtidas, preferencialmente, durante as primeiras 72 horas da doença, uma vez que a quantidade de vírus eliminada diminui após este período (KAMPS, HOFFMANN, PREISER, 2006).

O método laboratorial padrão para diagnóstico do vírus Influenza é baseado no isolamento do vírus em cultura de células ou em ovos embrionados, seguido de detecção dos antígenos virais utilizando anticorpos específicos. Apresenta como vantagens a alta sensibilidade e especificidade, além de permitir o isolamento de novos vírus, porém, além de requerer infra-estrutura e pessoal especializado, é uma técnica demorada (KAMPS, HOFFMANN, PREISER, 2006; MAGNARD et al., 1999; MURPHY e WEBSTER, 2001).

Métodos alternativos de diagnóstico mais rápido são utilizados, como ensaios de imunofluorescência (IFA) e imunoenzimático (ELISA) (REINA et al., 1996), reação de hemaglutinação e de inibição de hemaglutinação e amplificação de ácidos nucleicos (HERRMANN, LARSSON, ZWEYGBERG, 2001). O isolamento do vírus em cultura de células ou em ovos embrionados, seguido de detecção dos antígenos virais utilizando anticorpos específicos, é uma metodologia sensível e específica, porém, além de requerer

infra-estrutura e pessoal especializado, é uma técnica demorada (KAMPS, HOFFMANN, PREISER, 2006; MAGNARD et al., 1999; MURPHY e WEBSTER, 2001). A reação de inibição de hemaglutinação é rotineiramente utilizada na tipagem e subtipagem dos vírus Influenza utilizando-se anticorpos específicos contra HA e NA (WRIGHT et al., 1995). A imunofluorescência é uma técnica de diagnóstico confiável e relativamente rápida, de 2 a 4 horas, embora um estudo de sensibilidade diagnóstica tenha apresentado resultados extremamente variáveis, com 40% a 100% de sensibilidade (RENNELS, MEISSNER, COMMITTEE ON INFECTION DISEASES, 2002).

A reação em cadeia pela polimerase após a transcrição reversa (RT-PCR) e suas variações, como a *multiplex* RT-PCR, são métodos alternativos, rápidos e sensíveis para a detecção do vírus, e apresentam melhor sensibilidade analítica e diagnóstica que o método padrão (ATMAR et al., 1996; CHERIAN et al., 1994; COX e ZEIGLER, 2003). A *multiplex* RT-PCR, com *primers* específicos para os genes NS, HA e/ou NA, podem ser utilizadas na detecção dos *Influenzavirus* A, B, C e na subtipagem do *Influenzavirus* A (BESSELAAR et al., 2004; CHOI et al., 2002; ELLIS, FLEMING, ZAMBON, 1997; HERRMANN, LARSSON, ZWEYGBERG, 2001; PODDAR et al., 2002; PONTORIERO et al., 2003; STOCKTON et al., 1998). A PCR em tempo real (rPCR) apresenta vantagens em relação à técnica tradicional por ser um método que apresenta maior rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e redução do risco de contaminação durante o procedimento (MACKAY, ARDEN, NITSCHKE, 2002). Porém, devido ao alto custo, esses testes podem não estar prontamente disponíveis e a liberação dos resultados pode levar de um a vários dias.

Os testes de diagnóstico rápido para influenza (RITDs) estão amplamente disponíveis e o uso comercial por laboratórios e clínicas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Alguns testes liberam resultados em até 15 minutos e, atualmente, mais de 10 testes são aprovados pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*). Os testes podem ser utilizados na triagem para a detecção e/ou identificação de IA e IB e a sensibilidade e a especificidade variam entre 50-70% e 90-95%, respectivamente, quando comparadas com o isolamento viral ou a RT-PCR (CDC, 2010c).

Os RITDs possuem sensibilidade variável (10-70%) para detecção do vírus Influenza H1N1 2009 (cepa pandêmica) quando comparado com a rRT-PCR. Dessa forma, um resultado negativo do RITD não exclui a infecção por essa cepa pandêmica (FAIX, SHERMAN, WATERMAN, 2009; HURT et al., 2009). Como nem todos os testes de amplificação de ácido nucleico podem diferenciar especificamente os IA H1N1 de 2009 dos

outros IA, é necessário realizar rRT-PCR ou o isolamento viral, seguido de identificação, quando um teste específico para os IA H1N1 2009 é exigido (CDC, 2009b).

O quadro 1 traz um resumo das principais metodologias utilizadas atualmente para o diagnóstico do vírus Influenza em espécimes respiratórios, descrevendo suas características, como sensibilidade e especificidade, disponibilidade comercial, tempo de processamento e capacidade de distinguir entre os diferentes tipos de influenza (IA e IB) e os subtipos do IA (por exemplo, H1N1 de 2009 e os vírus sazonais H1N1 e H3N2).

Quadro 1: Comparação entre os testes diagnósticos disponíveis para a influenza¹

Testes de diagnóstico para os vírus Influenza	Método ²	Disponibilidade	Tempo de processamento típico	Sensibilidade ³ ao vírus H1N1 2009	Distingue entre o vírus Influenza H1N1 2009 e os outros vírus Influenza?
Testes de diagnósticos rápidos para influenza ⁴	Detecção de antígeno	Ampla	0,5 hora	10 - 70%	Não
Métodos de imunofluorescência direta e indireta ⁵	Detecção de antígeno	Ampla	2 - 4 horas	47 - 93%	Não
Isolamento viral em cultura celular de tecido	Isolamento viral	Limitada	2 - 10 dias	-	Sim ⁶
Testes de amplificação de ácidos nucleicos (incluindo rRT-PCR) ⁷	Detecção do RNA	Limitada	48 - 96 horas (6 - 8 horas para realizar o teste)	86 - 100%	Sim

Fonte: CDC, 2009b.

1. Exame sorológico com soro pareado (dentro de 1 semana do início da doença) e em fase convalescente (coletado 2 a 3 semanas mais tarde) é limitado aos estudos epidemiológicos e de investigação e não está rotineiramente disponível nos laboratórios clínicos e podem não informar as decisões clínicas.

2. Quantidade de tempo necessário para a coleta do espécime até os resultados.

3. Em comparação com os testes rRT-PCR; os testes rRT-PCR são comparados com outras modalidade de testes, incluindo outros métodos de RT-PCR.

4. Testes de diagnóstico rápidos para influenza que são mais simples (podem ser realizados no leito do paciente) e testes que são moderadamente complexos (podem ser realizados somente em laboratório). Espécimes clínicos aprovados para RITDs variam teste a teste, e podem não incluir todos os espécimes respiratórios.

5. O desempenho desses ensaios depende muito da experiência do laboratório e exige um microscópio de fluorescência.

6. Requerer teste adicional do isolado viral.

7. A realização de ensaios do rRT-PCR específica para o vírus Influenza H1N1 2009 não foi estabelecida para o lavado bronquialveolar e aspirado traqueal. Se os testes desses espécimes para H1N1 2009 testar em paralelo com swab de nasofaringe, nasal ou de orofaringe ou um aspirado nasal.

1.10 Evolução viral

Análises filogenéticas e a constatação de que todos os vírus Influenza os quais têm os subtipos de HA e NA conhecidos e que são mantidos nas espécies aviárias, levaram à hipótese de que todos os vírus Influenza A de mamíferos são derivados do pool dos vírus Influenza aviários (WEBSTER et al., 1992) (**Figura 9**). As taxas evolucionárias de nucleotídeos e de aminoácidos são significativamente menores nos vírus Influenza aviários. Na verdade, em aves

aquáticas selvagens, os vírus Influenza parecem estar em uma estase evolucionária, sugerindo uma adaptação muito favorável desses vírus aos seus hospedeiros. Nessa situação, as substituições de aminoácidos podem não ser providas de vantagens seletivas. Assim, embora as mutações ocorram com uma frequência similar, elas podem não resultar em mudanças dos aminoácidos. Em contraste, todos os genes dos vírus de mamíferos e de aves domésticas continuam acumulando as substituições de aminoácidos (WRIGHT, NEUMANN, KAWAOKA, 2006).

Figura 9: Reservatório dos vírus Influenza A. As aves aquáticas selvagens são o principal reservatório dos IA. A transmissão viral tem sido reportada das aves aquáticas para as aves domésticas, mamíferos aquáticos, porcos, cavalos e humanos. Os vírus também podem ser transmitidos entre porcos e humanos e das aves domésticas aos humanos. Os vírus Influenza equinos têm sido transmitidos, recentemente, aos cachorros. Fonte: Imagem retirada de Fields Virology, 5ª ed., capítulo 48.

Para os vírus Influenza A humano, as taxas evolutivas diferem entre os segmentos e, provavelmente, refletem diferenças na pressão seletiva do hospedeiro. A razão da taxa de mudanças silenciosas/totais diferem significativamente entre os diferentes genes. Para o gene H3 humano, somente 57% de todas as mudanças são silenciosas, provavelmente devido à pressão seletiva do sistema imunológico do hospedeiro, enquanto que para o gene PB2 humano, as mudanças silenciosas representam mais de 90%, devido à baixa pressão seletiva e as limitações das alterações estruturais da proteína (WEBSTER et al., 1992). Os genes M1 e M2 humanos, codificados por uma ORF sobreposta no mesmo segmento, estão sob pressões seletivas diferentes. Para a proteína M1, 96% das mudanças são silenciosas, em contraste com somente 66% da proteína M2. A proteína M1 está, portanto, bem adaptada aos seus hospedeiros mamíferos, enquanto que a proteína M2 está sob forte pressão seletiva. A razão

biológica para a pressão seletiva sob a M2 é desconhecida. As duas proteínas codificadas pelo gene NS também diferem em suas taxas evolutivas (WEBSTER et al., 1992).

Diferenças significativas são encontradas nas taxas evolutivas dos vírus Influenza A, B e C. Os IB, especialmente os IC, evoluem mais lentamente do que os IA. Os IB e IC parecem estar próximos ou estão em um equilíbrio evolutivo nos seres humanos. Os IA em humanos evoluem ao longo de linhagens de um mesmo ramo, o que sugere evolução por seleção clonal (CRESCENZO-CHAIGNE, van der WERF, NAFFAKH, 2002) e co-circulação limitada das sub-linhagens, porém, a co-circulação de sub-linhagens foi demonstrada por períodos limitados. Em contraste, a evolução dos IB e IC é caracterizada pela co-circulação de linhagens distintas antigênica e geneticamente por longos períodos de tempo. Para os IB, as linhagens B/Victoria (representada por B/Victoria/2/87) e B/Yamagata (representada por B/Yamagata/16/88) têm co-circulado por cerca de 25 anos, com mudanças nos padrões de prevalência e distribuição geográfica (WRIGHT, NEUMANN, KAWAOKA, 2006).

1.11 Tratamento e profilaxia

Devido às epidemias anuais de gripe e ao risco de novas pandemias, o monitoramento epidemiológico do vírus Influenza é de fundamental importância (NETO et al., 2003). A rede de vigilância epidemiológica da gripe coordenada pela OMS foi criada em 1952 e inclui 5 Centros de Colaboração (situados na Austrália, Japão, Inglaterra e Estados Unidos - estados da Geórgia e do Tennessee), 4 Laboratórios Regulares e 131 Instituições espalhadas por 102 países, as quais são reconhecidas pela OMS como Centros Nacionais de Influenza (WHO, 2009d). No Brasil, a vigilância da Influenza é realizada por três laboratórios nacionais reconhecidos pela OMS: Instituto Adolfo Lutz (IAL), em São Paulo; Instituto Evandro Chagas (IEC), no Pará e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro.

Com base nos dados colhidos em todo o mundo, um comitê reúne-se duas vezes ao ano para formalizar a recomendação das cepas do vírus Influenza a serem incluídas na composição da vacina que será administrada na próxima temporada de gripe. Desde 1977, três cepas virais têm sido utilizadas: duas do *Influenzavirus* A, subtipos H1N1 e H3N2 e uma do *Influenzavirus* B (ELLIS et al., 2003; LEE e CHEN, 2004; WHO, 2000).

Nas epidemias anuais de influenza, estima-se que 3 a 5 milhões de pessoas sejam infectadas no mundo. A vacinação ainda permanece como a melhor forma de profilaxia para amenizar o impacto das epidemias anuais de influenza, mas as cepas vacinais precisam ser revisadas todos os anos devido à contínua evolução das proteínas virais (CARRAT e

FLAHAULT, 2007). Os tipos de vacinas mais utilizados mundialmente são a vacina de vírus atenuado e a vacina tipo *split*, composta por vírus inativado pela exposição a detergentes e purificados de forma a conter os antígenos de algumas proteínas do vírus. Os dois tipos de vacina induzem resposta imunológica semelhante (BEYER et al., 1998).

A vacina de vírus inativado pode ser administrada em pessoas com idade superior a 6 meses de vida, mesmo em pessoas grávidas ou que tenham algum problema de saúde crônico. Duas doses da vacina podem ser administradas, com intervalo de um mês entre cada aplicação, em crianças com idade entre 6 meses e 8 anos, desde que estejam sendo imunizadas pela primeira vez. Uma única dose da vacina é adequada para imunizar os indivíduos adultos saudáveis (WHO, 2009e). A vacina de vírus atenuado pode ser administrada em pessoas saudáveis com idade entre 5 e 49 anos, com exceção das mulheres grávidas. Essa vacina é administrada via spray nasal, podendo causar alguns sintomas leves sem, entretanto, desenvolver a doença (WHO, 2009e).

A recomendação oficial para a vacinação tem sido direcionada aos idosos, gestantes, portadores de doenças cardiopulmonares, pacientes com imunossupressão, profissionais de saúde e aqueles que cuidam das populações de risco (CDC, 2006a). No Brasil, desde 2000, a campanha de vacinação é direcionada aos idosos com idade igual ou superior a 60 anos (CUNHA, CAMACHO, SANTOS, 2005; TONIOLO-NETO, 2001).

Além da vacinação, existem duas classes de drogas antivirais que proporcionam uma alternativa para o tratamento e/ou para a profilaxia das infecções causadas pelo vírus Influenza: os clássicos, os inibidores dos canais M2, Amantadina (Symmetrel; Endo Pharmaceuticals, Chads Ford, PA) e Rimantadina (Flumadine; Forest Pharmaceuticals, St Louis, MO) e os de segunda geração, os inibidores de neuraminidase, Oseltamivir (Tamiflu; Roche Laboratories, Nutley, NJ) e Zanamivir (Relenza; GlaxoSmith-Kline, Research Triangle Park, NC).

Os inibidores dos canais M2 só possuem efeito contra os *Influenzavirus A*, enquanto que os inibidores de neuraminidase possuem efeito sobre os *Influenzavirus A* e B. Sendo assim, esses antivirais clássicos apresentam certas limitações, como o rápido desenvolvimento de resistência viral, o espectro de ação restrito e reações adversas no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal (CALFEE e HAYDEN, 1998; LAVER, BISCHOFBERGER, WEBSTER, 1999; OXFORD e LAMBKIN, 1998). Nos últimos anos, o vírus Influenza vem demonstrando uma resistência aos inibidores dos canais M2, no mundo todo, com um aumento da taxa de resistência de 1,9% para 12,3% (CDC, 2006b).

Por outro lado, os inibidores da neuraminidase, específicos para os vírus Influenza A e

B, são mais eficazes quando é feito um diagnóstico rápido, idealmente nas primeiras 36 horas do início das manifestações da gripe (CDC, 1999; MCKIMM-BRESCHKIN, 2005; OXFORD e LAMBKIN, 1998; TREANOR et al., 2000). Estudos clínicos, realizados com o inibidor de neuramidase, oseltamivir, reportaram uma baixa frequência de resistência à droga girando em torno de 0,5% em pacientes adultos e de 4% em crianças, após o tratamento com o medicamento (GUBAREVA e HAYDEN, 2006; GUBAREVA et al., 2001; NICHOLSON et al., 2000; WHITLEY et al., 2001). Estudos feitos no Japão, que incluíram o medicamento oseltamivir no tratamento de crianças com IA subtipos H1N1 e H3N2, reportaram taxas de resistência à droga de 16% e 18%, após tratamento, respectivamente (KISO et al., 2004; WARD et al., 2005). Também foram observados casos de resistência viral em crianças infectadas pelo *Influenzavirus B* e que foram tratadas com oseltamivir (HATAKEYAMA et al., 2007; KAWAI et al., 2007). Já estudos realizados com o inibidor de neuramidase zanamivir, quando utilizado no tratamento em crianças e adultos contra o vírus Influenza, demonstraram uma eficiência de 67% a 84% do medicamento (AMBROZAITIS et al., 2005; GRAVENSTEIN et al., 2005; HAYDEN et al., 2000; MONTANO et al., 1999, 2002).

Um terceiro inibidor de neuraminidase, peramivir, foi desenvolvido demonstrando ação sobre os nove subtipos de NA, mostrando-se tão ativo quanto o oseltamivir e zanamivir contra o vírus H5N1 *in vitro*, com a vantagem de apresentar uma maior meia-vida, permitindo a administração com frequência menor (BANTIA et al., 2006; GOVORKOVA et al., 2001, GUBAREVA, WEBSTER, HAYDEN, 2001). Uma única injeção intramuscular aplicada 24 ou 48h após a infecção mostrou-se completamente protetora em camundongos desafiados com uma dose letal de H1N1 ou H3N2 (BANTIA et al., 2006). Porém, embora as administrações oral e intranasal terem sido protetoras em camundongos e furões (CHAND et al., 2005; SWEET et al., 2002), o peramivir tem baixa biodisponibilidade oral em humanos. Assim, o medicamento foi bem tolerado quando administrado oralmente a voluntários infectados com o vírus Influenza A ou B, mas a redução dos sintomas não atingiu uma significância estatística (BABU et al., 2000; BANTIA et al., 2006). Dados da literatura também descreveram o desenvolvimento de resistência a essa droga, com aparecimento de algumas mutações pontuais características no gene da neuraminidase (GUBAREVA, 2004).

Devido aos graves problemas médicos e sociais causados pelos vírus Influenza em todo o mundo, a comunidade científica e as autoridades governamentais responsáveis mantêm uma vigilância constante, principalmente para a emergência de um novo. Portanto, grandes esforços são realizados para o monitoramento e caracterização das cepas circulantes, uma vez que, além das possíveis variações antigênicas entre os vírus que afetam o homem, há a

possibilidade de transmissão interespécie, como ocorreu recentemente com o vírus H5N1 e como ocorre atualmente com o H1N1 de origem suína.

Dessa forma, o presente trabalho estudou a circulação dos vírus Influenza em crianças internadas na enfermaria, UTI ou na retaguarda do ambulatório do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP), durante o período de 1995 a 2006 e verificou a variabilidade genética de uma glicoproteína de superfície, a neuraminidase. Para isso, foi realizada a detecção e tipagem dos *Influenzavirus* A e B, subtipagem do *Influenzavirus* A e sequenciamento do gene inteiro da neuraminidase, visando verificar a homologia entre as cepas brasileiras e as cepas vacinais utilizadas nos respectivos anos e o aparecimento de mutações que estejam relacionadas com o surgimento de resistência aos inibidores da neuraminidase.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Os vírus Influenza apresentaram baixa circulação em crianças dentro da faixa etária estudada.
- ✓ Dos 12 anos estudados, foi verificada a co-circulação dos vírus Influenza A e B nos anos de 2002, 2004 e 2006.
- ✓ Os vírus Influenza A subtipo H1N1 foi detectado apenas nos anos de 2000, 2001 e 2006, já o subtipo H3N2 foi detectado em todos os anos e foi o mais prevalente durante o período estudado.
- ✓ A maior ocorrência dos vírus Influenza foi em crianças com até seis meses de vida.
- ✓ Algumas substituições de aminoácidos no gene da neuraminidase N2 foram pontuais, outras ocorreram em todas as sequências, fixando-se no decorrer do tempo e, em alguns casos, houve reversão para o aminoácido inicial. Algumas dessas substituições de aminoácidos ocorreram em sítios antigênicos da proteína.
- ✓ No geral, as cepas brasileiras apresentaram boa similaridade em relação às cepas vacinais utilizadas para o período.
- ✓ A análise filogenética mostrou que as cepas brasileiras agruparam-se em *clusters* conforme o ano de isolamento, demonstrando uma variação muito mais temporal que geográfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIR, G. M. et al. Location of antigenic sites on the three-dimensional structure of the influenza N2 virus neuraminidase. **Virology**, v. 145, p. 237-248, 1985.

ALAMGIR, A. S. et al. Phylogenetic analysis of influenza C virus nonstructural (NS) protein genes and identification of the NS2 protein. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 1933-1940, 2000.

ALBUQUERQUE, M. C. et al. Novel Respiratory Virus Infections in Children, Brazil. **Emerging Infect. Dis.**, v. 15, n. 5, p. 806-808, 2009.

ALONSO, W. J. et al. Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. **Am. J. Epidemiol.**, v. 165, n. 12, p. 1434-1442, 2007.

AMBROZAITIS, A. et al. Inhaled zanamivir versus placebo for the prevention of influenza outbreaks in an unvaccinated long-term care population. **J. Am. Med. Dir. Assoc.**, v. 6, p. 367-74, 2005.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Influenza. In: PICKERING, L. K.; BAKER, C. J.; LONG, S. S.; MCMILLAN, J. A. (Ed.). **Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases**. 27. ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 2006. p. 401-411.

ANDERSON, R. M.; MAY, R. M. **Infectious Diseases of Humans**. New York: Oxford University Press, 1991.

APOSTOLOV, K.; FLEWETT, T. H. Further observations on the structure of influenza viruses A and C. **J. Gen. Virol.**, v.4, n. 3, p. 365-370, 1969.

ARRUDA, E. et al. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 252-258, 1991.

ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G. Influenza virus, respiratory syncytial, parainfluenza viruses, rhinovirus, and respiratory adenoviruses. In: GUERRANT, R. L.; WALKER, D. H.; WELLER, P. F. (Ed.). **Tropical infectious diseases: principles, pathogens and practice**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1999. p.1109-1121.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ATMAR, R. L. et al. Comparison of reverse transcription – PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza vírus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2604-2606, 1996.

BABU, Y. S. et al. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. **J. Med. Chem.**, v. 43, p. 3482-3486, 2000.

BANTIA, S. et al. Antiinfluenza vírus activity of peramivir in mice with single intramuscular injection. **Antivir. Res.**, v. 69, p. 39-45, 2006.

BENFICA, D. R. **Investigação da metodologia laboratorial de detecção de infecção pelo vírus Influenza**. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade Federal Paulista, São Paulo, SP, 2005.

BESSELAAR, T. G. et al. Antigenic and molecular analysis of influenza A (H3N2) virus strains isolated from a localised influenza outbreak in South Africa in 2003. **J. Med. Virol.**, v. 73, p. 71-78, 2004.

BELLEY, N. et al., Patterns of influenza infections among different risk groups in Brazil. **Bras. J. Infect. Dis.**, v. 11, p. 399-402, 2007.

BETAKOVA, T.; NERMUT, M. V.; HAY, A. J. The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 2689-2694, 1996.

BEYER, W. E. et al. The plea against annual influenza vaccination? 'The Hoskins' Paradox' revisited. **Vaccine**, v. 16, n. 20, p. 1929-1932, 1998.

BISWAS, S. K.; NAYAK, D. P. Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. **J. Virol.**, v. 68, n.3, p. 1819-1826, 1994.

BLACK, M.; ARMSTRONG, P. An Introduction to avian and pandemic influenza. **N S W Public Health Bull**, v. 17, n. 7-8, p. 99-103, 2006.

BLICK, T. J. et al. Generation and characterization of an influenza virus neuraminidase variant with decreased sensitivity to the neuraminidase specific inhibitor 4-Guanidino-Neu5Ac2en. **Virology**, v. 214, p. 475-484, 1995.

BLOCK, J.; AIR, G. M. Variation in the membrane-insertion and "stalk" sequences in eight subtypes of influenza type A virus neuraminidase **Biochemistry**, v. 21, p. 4001-4007, 1982.
BOON, A. C. et al. Detection of influenza A subtypes in community-based surveillance. **J. Med. Virol.**, v. 65, n. 1, p. 163-170, 2001.

BHARAJ, P. et al. Respiratory viral infections detected by multiplex PCR among pediatric patients with lower respiratory tract infections seen at an urban hospital in Delhi from 2005 to 2007. **Virol. J.**, v. 6, p. 89, 2009.

BLAAS, D.; PATZELT, E.; KUECHLER, E. Identification of the cap binding protein of influenza virus. **Nucleic Acids Res.**, v. 10, n. 15, p. 4803-4812, 1982.

BRAGSTAD, K.; NIELSEN, L. P.; 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.

BRASSARD, D. L.; LESER, G. P.; LAMB, R. A. Influenza B virus NB glycoprotein is a component of the virion. **Virology**, v. 220, n. 2, p. 350-360, 1996.

BRIEDIS, D. J.; LAMB, R. A.; CHOPPIN, P. W. Sequence of RNA segment 7 of the influenza B virus genome: Partial amino acid homology between the membrane proteins (M1) of influenza A and B viruses and conservation of a second open reading frame. **Virology**, v. 116, n.2, p. 581-588, 1982.

BRYCE, J. et al. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, v. 365, p. 1147-1152, 2005.

BURMEISTER, W. P.; RUIGROK, R. W.; CUSACK, S. The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. **EMBO J.**, v. 11, n. 1, p. 49-56, 1992.

CALFEE, D. P.; HAYDEN, F. G. New approaches to influenza chemotherapy-neuraminidase inhibitors. **Drugs**, v. 56, p. 537-553, 1998.

CANNELL, J. J. et al. Epidemic influenza and vitamin D. **Epidemiol. Infect.**, v. 134, p. 1129-1140, 2006.

CARRAT, F.; FLAHAULT, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. **Vaccine**, v. 25, p. 6852-6862, 2007.

CAUCHEMEZ, S. et al. Estimating the impact of school closure on influenza transmission from Sentinel data. **Nature**, v. 452, p. 750-754, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Neuraminidase inhibitors for treatment of influenza A and B infections. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 48 (RR14), p. 1-10, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Severe morbidity and mortality associated with influenza in children and young adults. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 52, p. 837-840, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevention and Control of Influenza. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 55 (RR10), 2006a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). CDC recommends against the use of amantadine and rimantadine for the treatment or prophylaxis of influenza in the United States during the 2005–06 influenza season, 2006b. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/han011406.htm>. Acesso em 14 jul. 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Novel H1N1 flu situation update, 2009a. Available from: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/update.htm>. Acesso em 14 jul. 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Interim recommendations for clinical use of influenza diagnostic tests during the 2009-10 influenza Season**, 2009b. Available from: http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidance/diagnostic_tests.htm. Acesso em 03 jan. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). The flu season, 2010a. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/about/season/flu-season.htm>. Acesso em 03 jan. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Influenza symptoms and laboratory diagnostic procedures**, 2010b. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labprocedures.htm>. Acesso em 03 jan. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Rapid diagnostic testing for influenza**, 2010c. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/rapidlab.htm>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Seasonal Influenza : the disease**, 2010d. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/about/disease/index.htm>. Acesso em 05 jan. 2010.

CHAND, P. et al. Comparison of the anti-influenza virus activity of cyclopentane derivatives with oseltamivir and zanamivir in vivo. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 4071- 4077, 2005.

CHEN, Z.; KRUG, R. M. Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. **Trends Microbiol.**, v. 8, n. 8, p. 376-383, 2000.

CHEN, W. et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. **Nat. Med.**, v. 7, p. 1306–1312, 2001.

CHERIAN, T. et al. Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 623-628, 1994.

CHOI, Y. K. et al. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. **J. Virol.**, v. 102, p. 53-59, 2002.

CIANCI, C.; TILEY, L.; KRYSTAL, M. Differential activation of the influenza virus polymerase via template RNA binding. **J. Virol.**, v. 69, n. 7, p. 3995-3999, 1995.

CINTRA, O. A. L.; ARRUDA, E. Influenza. In: FARHAT, C. K.; CARVALHO, E. S.; WECKX, L. Y.; FALLEIROS, L. H. R.; SUCCI, R. C. M. (Ed.). **Fundamentos e prática das imunizações em clínica médica e pediatria**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 450-491.

CINTRA, O. A. L. et al. Vírus Influenza: características clínicas em crianças menores de 3 anos hospitalizadas por infecção respiratória aguda durante surto. **J. Paranaense Pediatr.**, v. 6, p. 56, 2005.

CLAAS, E. C. J. et al. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, v. 39, p. 1-13, 1992.

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.

COLMAN, P.M. A novel approach to antiviral therapy for influenza. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, p. 17-22, 1999.

COLMAN, P. M.; LAWRENCE, M. C. The structural biology of type I viral membrane fusion. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 4, p. 309-319, 2003.

COMPANS, R. W.; MEIER-EWERT, H.; PALESE, P. Assembly of lipid-containing viruses. **J. Supramol. Struct.**, v. 2, n. 2-4, p. 496-511, 1974.

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.

COUCEIRO, J. N. et al. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium: the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. **Virus Res.**, v. 29, n. 2, p. 155-165, 1993.

COX, N. J.; FUKUDA, K. Influenza. **Infec. Dis. Clin. North Am.**, v. 12, p. 27-38, 1998.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Influenza. **Lancet**, v. 354, p. 1277-82, 1999.

COX, N. J.; SUBBARAO K. Global epidemiology of influenza: past and present. **Annu. Rev. Med.**, v. 51, p. 407-421, 2000.

COX, N. J.; ZEIGLER, T. Influenza viruses. In: MURRAY, P. R.; BENSON, E. J.; JORGENSEN, H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. M. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, **2003**. p. 1360-1367.

CRESCENZO-CHAIGNE, B.; van der WERF, S.; NAFFAKH, N. Differential effect of nucleotide substitutions in the 3' arm of the influenza A virus vRNA promoter on transcription/replication by avian and human polymerase complexes is related to the nature of PB2 amino acid 627. **Virology**, v. 303, p. 240-252, 2002.

CROS JF, 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.

CROS, J. F.; GARCIA-SASTRE, A.; PALESE P. An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. **Traffic**, v. 6, n. 3, p. 205-213, 2005.

CROSBY, A. **America's forgotten pandemic**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

CUNHA, A. M.; MAGALHÃES, O. C.; FONSECA, O. O. R. Estudos experimentais sobre a influenza pandêmica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.10, n 2, p. 174-191, 1918.

CUNHA, S. S.; CAMACHO, L. A. B.; SANTOS, A. C. Imunização contra influenza no Brasil: racionalidade e desafios. **Rev Saúde Pública**, v. 39, n. 1, p. 129-136, 2005.

DESHPANDE, K. L. et al. Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 36-40, 1987.

DOWELL, S. F. Seasonal variation in host susceptibility and cycles of certain infectious diseases. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 369-374, 2001.

EGOROV, A. et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. **J. Virol.**, v. 72, n. 8, p. 6437-41, 1998.

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. 2076-82, 1997.

ELLIS J. S. et al. Influenza AH1N2 viruses, United Kingdom, 2001-02 Influenza season. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, n. 3, p. 304-310, 2003.

ELTON, D.; TILEY, L.; DIGARD, P. Molecular mechanisms of influenza virus transcription. **Recent Res. Dev. Virol.**, v. 4, p. 121-146, 2002.

ENAMI, M.; ENAMI, K. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. **J. Virol.**, v. 70, n. 10, p. 6653-6657, 1996.

ENGLUND, J.A. Antiviral therapy of influenza. **Semin. Ped. Infect. Dis.**, v. 13, p. 120-128, 2002.

van ESSO ARBOLAVE, D. L. et al. Clinical and epidemiological characteristics of influenza A virus infection in children aged less than 7 years old in primary care. **An Pediatr (Barc)**, v. 65, p. 211-218, 2006.

FAIX, D. J.; SHERMAN, S. S.; WATERMAN, S. H. Rapid-Test Sensitivity for Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, n. 7, p. 728-729, 2009.

FANNING, T. G.; REID, A. H.; TAUBENBERGER, J. K. Influenza virus A neuraminidase: regions of the protein potentially involved in virus-host interactions. **Virology**, v. 276, p. 417-423, 2000.

FAUQUET C. M., et al. **Virus Taxonomy**: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier Academic Press, 2004. 1259p.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERRARIS, O; LINA, B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. **J. Clin. Virol.**, v. 41, p. 13–19, 2008.

FODOR, E.; BROWNLEE, G. G. Influenza virus replication. In: POTTER, C. W. (Ed.). **Influenza**. Amsterdam: Elsevier; 2002. p. 1-19.

FODOR, E. et al. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. **J. Virol.**, v. 76, n. 18, p. 8989-9001, 2002.

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, n. 8, p. 5017-5020, 2003.

FOUCHIER, R. A. et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 5, p. 1356-1361, 2004.

FOUCHIER, R. A. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **J. Virol.**, v. 79, n. 5, p. 2814–2822, 2005.

FRIEDMAN, M. J.; ATTIA, M. W. Clinical Predictors of Influenza in Children. **Arch Pediatr Adolesc. Med.**, v. 158, p. 391-394, 2004.

GASTAMINZA, P. et al. Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. **J. Virol.**, v. 77, n. 9, p. 5098-5108, 2003.

GAVIN, P. J.; THOMSON, R. B. J. Review of rapid diagnostic tests for influenza. **Clin. Applied Immunol. Rev.**, v. 4, p. 151-172, 2003.

GERDIL, C. The annual production cycle for influenza vaccine. Short communication. **Vaccine**, v. 21, n. 16, p. 1743-1803, 2003.

GHATE, A. A.; AIR, G. M. Influenza type B neuraminidase can replace the function of type A neuraminidase. **Virology**, v. 264, n. 2, p. 265-277, 1999.

GHEDIN, E. et al. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. **Nature**, v. 437, p. 1162-1166, 2005.

GLEZEN, W. P.; DECKER, M.; PERROTTA, D. M. Survey of underlying conditions of persons hospitalized with acute respiratory disease during influenza epidemics in Houston, 1978-1981. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p. 550-555, 1987.

GLEZEN, W. P. et al. Acute respiratory disease associated with influenza epidemics in Houston, 1981-1983. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 1119-1126, 1987.

GLEZEN, W. P. et al. Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. **JAMA**, v. 283, p. 499-505, 2000.

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.

GONZALEZ, S.; ORTIN, J. Characterization of influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. **J. Virol.**, v. 73, n. 1, p. 631-637, 1999.

GOVORKOVA, E. A. et al. Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 45, p. 2723-2732, 2001.

GOTTSCHALK, A. The specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.23, p. 645-646, 1957.

GRAVENSTEIN, S. et al. Inhaled zanamivir versus rimantadine for the control of influenza in a highly vaccinated long-term care population. **J. Am. Med. Dir. Assoc.**, v. 6, p. 359-66, 2005.

GUBAREVA, L. V. et al. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. **J. Infect. Dis.**, v. 178, p. 1257-1262, 1998.

GUBAREVA, L.V.; KAISER, L.; HAYDEN, F. G. Influenza virus neuraminidase inhibitors. **Lancet**, v. 355, p. 827-835, 2000.

GUBAREVA, L. V. et al. Selection of influenza mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 523-531, 2001.

GUBAREVA, L. V.; WEBSTER, R. G.; HAYDEN, F. G. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 3403-3408, 2001.

GUBAREVA, L. V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. **Virus Res.**, v. 103, p. 199-203, 2004.

GUBAREVA, L. V.; HAYDEN, F. G. M2 and neuraminidase inhibitors: antiinfluenza activity, mechanisms of resistance and clinical effectiveness. In: KAWAOKA, Y. (Ed.) **Influenza virology: current topics**. Wymondham, United Kingdom: Caister Press, 2006. p. 169-202.

GUO, Y.; LI, J. W.; CHENG, I. Discovery of humans infected by avian influenza A (H9N2) virus. **Chin J Exp Clin Virol**, v. 15, p. 105-108, 1999.

HAGEN, M. et al. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. **J. Virol.**, v. 68, n. 3, p. 1509-1515, 1994.

HAGMAIER, K. et al. Novel gene product of Thogoto virus segment 6 codes for an interferon antagonist. **J. Virol.**, v. 77, n. 4, p. 2747-2752, 2003.

HARMON, M. W. Influenza viruses. In: LENETTE, E. H. (Ed.). **Laboratory diagnosis of viral infections**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 515-534.

HATADA, E.; FUKUDA, R. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. **J. Gen. Virol.**, v. 73, p. 3325-3329, 1992.

HATAKEYAMA, S. et al. Emergence of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. **JAMA**, v. 297, n. 13, p. 1435-1442, 2007.

HAY, A. J. The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. **Semin. Virol.**, v. 3, p. 21-30, 1992.

HAYDEN, F. G. et al. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. Zanamivir Family Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, p. 1282–1289, 2000.

HAYDEN, F. G.; PALESE, P. Influenza virus. In: RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G. (Ed.). **Clinical Virology**. New York: Churchill Livingstone, 2002. p. 911-942.

HEIKKINEN, T. The role of respiratory viruses in otitis media. **Vaccine**, v. 1, p. 51-55, 2000.

HERRLER, G. et al. The glycoprotein of influenza C virus is the haemagglutinin, esterase and fusion factor. **J. Gen. Virol.**, v. 69, p. 839-846, 1988.

HERRMANN, B.; LARSSON, C.; ZWEYGBERG, B. W. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, 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.

HOEHLING, A. A. **The great epidemic**. Boston: Little Brown, 1961.

HOFFMANN, E. et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Arch. Virol.**, v. 146, p. 2275-2289, 2001.

HOLMES, E. C. et al. Whole-Genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. **PLoS Biology**, v. 3, p. 1579-1589, 2005.

HONDA, A.; MIZUMOTO, K.; ISHIHAMA, A. Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. **Genes Cells**, v. 4, n. 8, p. 475-485, 1999.

HONGO, S. et al. Cloning and sequencing of influenza C/Yamagata/1/88 virus NS gene. **Arch. Virol.**, v. 126, n. 1-4, p. 343-349, 1992.

HONGO, S. et al. Characterization of a second protein (CM2) encoded by RNA segment 6 of influenza C virus. **J. Virol.**, v. 71, n. 4, p. 2786-2792, 1997.

HORVATH, C. M.; WILLIAMS, M. A.; LAMB, R. A. Eukaryotic coupled translation of tandem cistrons: identification of the influenza B virus BM2 polypeptide. **EMBO J.**, v. 9, n. 8, p. 2639-2647, 1990.

HUARTE, M. et al. Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. **J. Virol.**, v. 77, n. 10, p. 6007-6013, 2003.

HULSE, D. J. et al. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. **J. Virol.**, v. 78, n. 18, p. 9954-9964, 2004.

HURT, A. C. et al. Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A (H1N1) influenza viruses. **Influenza Other Respi. Viruses**, v. 3, n. 4, p. 171-176, 2009.

IBRICEVIC, A. et al. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. **J. Virol.**, v. 80, p. 7469-7480, 2006.

IRMEN, K. T.; KELLEHER, J. J. Use of Monoclonal Antibodies for rapid Diagnosis of Respiratory Viruses in an Community Hospital. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 3, p. 396-402, 2000.

ITO, T. et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **J. Virol.**, v. 72, n. 9, p. 7367-7373, 1998.

IWANE, M. K. et al. New Vaccine Surveillance Network. Population-based surveillance for hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses among young children. **Pediatrics**, v. 113, p. 1758-1764, 2004.

JAWETZ, MELNICK, ADELBERG. "Ortomixovírus (Vírus da Influenza)", In: BUTEL, J. S.; BROOKS, G. F.; MORSE, S. A. (Ed.). **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 394-404.

JOHNSON, N. P.; MUELLER, J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 “Spanish” influenza pandemic. **Bull Hist Med**, v. 76, p. 105-115, 2002.

KAMPS, B. S.; HOFFMANN, C.; PREISER, W. **Influenza report**, 2006. Available from: <http://www.influenzareport.com/>. Acesso em 12 jan. 2010.

KAWAI, N. et al. Longer virus shedding in influenza B than in influenza A among outpatients treated with oseltamivir. **J. Infect.**, v. 55, p. 267–272, 2007.

KAWAOKA, Y. et al. Influence of host species on the evolution of the nonstructural (NS) gene of influenza A viruses. **Virus Res.**, v. 55, n. 2, p. 143–156, 1998.

KENDAL, A. P.; DOWDLE, W. R.; NOBLE, G. R. Influenza Viruses. In: KURSTAK, E.; KURSTAK, C. (Eds.). **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington, D. E.: american Society for Microbiology, 1985. p. 755-762.

KIBENGE, F. S. et al. Antigenic variation among isolates of infectious salmon anaemia virus correlates with genetic variation of the viral haemagglutinin gene. **J. Gen. Virol.**, v. 82, n. 12, p. 2869-2879, 2001.

KILBOURNE, E. D. et al. Protection of mice with recombinant influenza virus neuraminidase. **J. Infect. Dis.**, v. 189, n. 3, p. 459-461, 2004.

KISO, M. et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. **Lancet**, v. 364, p. 759–765, 2004.

KOLATA, G. **Flu: the story of the great influenza pandemic of 1918 and the search for the virus that caused it**. New York: Farrar, Straus and Giroux, 1999.

LAMB, R.; HOLSINGER, L.; PINTO, L. The influenza A virus M2 ion channel protein and its role in the influenza virus life cycle. In: WIMMER, E. (Ed.). **Receptor-mediated virus entry into cells**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1994, p. 303-321.

LATHAM, T.; GALARZA, J. M. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. **J. Virol.**, v. 75, n. 13, p. 6154-6165, 2001.

LAVER, W. G.; BISCHOFBERGER, N.; WEBSTER, R. G. Disarming flu viruses. **Sci. Am.**, v. 280, p. 78-87, 1999.

LAVER, W. G. Influenza virus surface glycoproteins, haemagglutinin and neuraminidase: A personal account. In: POTTER, C. W. (Ed.). **Influenza**. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2002, p. 31-48.

LAYNE, S. P. et al. A global lab against influenza. **Science**, v. 293, p. 1729, 2001.

LEE, M. S.; CHEN, J. S. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, n. 8, p. 1385-1390, 2004.

LEIGH, M. Influenza. In: CHERNICK, V. (Ed.). **Kendig's disorder of the respiratory tract in children**. 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2006. p. 485-490.

LI, M. L.; RAMIREZ, B. C.; KRUG, R. M. RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. **EMBO J.**, v. 17, n. 19, p. 5844-5852, 1998.

LINDSTROM, S. E. et al. Phylogenetic analysis of the entire genome of influenza A (H3N2) viruses from Japan: evidence for genetic reassortment of the six internal genes. **J. Virol.**, v. 72, n. 10, p. 8021-8031, 1998.

LI, M. L.; RAO, P.; KRUG, R. M. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. **EMBO J.**, v. 20, n.8, p. 2078-2086, 2001.

LOFGREN, E. et al. Influenza seasonality: underlying causes and modeling theories. **J. Virol.**, v. 81, n. 11, p. 5429-5436, 2007.

LONG, C. E. et al. Influenza surveillance in community-dwelling elderly compared with children. **Arch. Fam. Med.**, v. 6, n. 5, p. 459-465, 1997.

LOWEN, A. C. et al. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. **PLoS Pathog.**, v. 3, p. 1470-1476, 2007.

LOWEN, A. C. et al. High temperature (30 degrees C) blocks aerosol but not contact transmission of influenza virus. **J. Virol.**, v. 82, p. 5650-5652, 2008.

LUK, J.; GROSS, P.; THOMPSON, W. W. Observations on mortality during the 1918 influenza pandemic. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. 1375-1378, 2001.

LUO, C.; NOBUSAWA, E.; NAKAJIMA, K. Analysis of the desialidation process of the haemagglutinin protein of influenza B virus: the host-dependent desialidation step. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 1729-1734, 2002.

LUO, M. Structural biology: antiviral drugs fit for a purpose. **Nature**, v. 443, p. 37-38, 2006.

LYNCH, J. P.; WALSH, E. E. Influenza: evolving strategies in treatment and prevention. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 28, p. 144-158, 2007.

MAGNARD, C.; VALETTE, M.; AYMARD, M.; LINA, B. Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper respiratory tract infections due to influenza viruses. **J. Med. Virol.**, v. 59, n. 2, p. 215-220, 1999.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. real time PCR in virology. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MARTIN-BENITO, J. et al. Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. **EMBO Rep.**, v. 2, n. 4, p. 313-317, 2001.

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.

MATROSOVICH, M. N. et al. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 101, n. 13, p. 4620-4624, 2004b.

MELIDOU, A. et al. Molecular and Phylogenetic analysis and vaccine strain match of human influenza A(H3N2) viruses isolated in Northern Greece. **Vir. Res.**, v. 145, p. 220-226, 2009.

MCKIMM-BRESCHKIN, J. et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of Influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. 2264-2272, 2003.

MCKIMM-BRESCHKIN, J. L. Management of influenza virus infections with neuraminidase inhibitors: detection, incidence, and implications of drug resistance. **Treat. Respir. Med.**, v. 4, n. 2, p. 107-116, 2005.

MELLO, W. A. de; et al., The dilemma of influenza vaccine recommendations when applied to the tropics: the brazilian case examined under alternative scenarios. **PLoS One**, v. 4, c. 4, p. 1-6, 2009.

MOLINARI, N. A. et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. **Vaccine**, v. 25, p. 5086-5096, 2007.

MONTO, A. S. Studies of the community and family: acute respiratory illness and infection. **Epidemiol. Rev.**, v. 16, p. 351-373, 1994.

MONTO, A. S. et al. Zanamivir in the prevention of influenza among healthy adults: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 282, p. 31–5, 1999.

MONTO A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. **Am. J. Med.** 2002. v. 112 Suppl. I. P. 4-12, 2002.

MONTO, A. S. et al. Zanamivir prophylaxis: an effective strategy for the prevention of influenza types A and B within households. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1582–1588, 2002.

MONTO, A. S. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 2395-2402, 2006.

MORENS, D. M.; TAUBENBERGER, J. K.; FAUCI, A. S. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. **N. Engl. J. Med.**, v. 361;3, p. 279, 2009.

MOSCONA, A. Neuraminidase inhibitors for influenza. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 1363-1367, 2005.

MOURA, F. E. A. et al. Hospital study of acute respiratory infections in children of Northeast Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, p. 275-282, 2003.

MOURA, F. E. A.; PERDIGÃO, A. C. B.; SIQUEIRA, M. M. Seasonality of Influenza in the Tropics: a distinct pattern in northeastern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 1, p. 180–183, 2009.

MUNOZ, F. M. Influenza virus infection in infancy and early childhood. **Pediatr. Respir. Rev.**, v. 4, p. 99-104, 2003.

MURAKI, Y. et al. Identification of an amino acid residue on influenza C virus M1 protein responsible for formation of the cordlike structures of the virus. **J. Gen. Virol.**, v. 85, p. 1885-1893, 2004.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (Eds.) **Fields virology**, 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p.1397-1445.

WRIGHT, P. F.; WEBSTER, R. G. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (Eds) **Fields virology**, 4. ed. New York: Raven Press, 2001. 1533-1579

MIYAO, C. R. et al. Infecções virais em crianças internadas por doença respiratória aguda do trato respiratório inferior. **J. Pediatr.**, v. 75, p. 334-344, 1999.

NAFFAKH, N. et al. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p.1283-1291, 2000.

NAKADA, S. et al. Influenza C virus hemagglutinin: comparison with influenza A and B virus hemagglutinins. **J. Virol.**, v. 50, n. 1, p. 118-124, 1984.

NAKADA, S. et al. Influenza C virus RNA 7 codes for a nonstructural protein. **J. Virol.**, v. 56, n. 1, p. 221-226, 1985.

NASCIMENTO, J. P. et al. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 287-296, 1991.

NAYAK, D. P.; HUI, E. K.; BARMAN, S. Assembly and budding of influenza virus. **Virus Res.**, v. 106, n. 2, p. 147-165, 2004.

NEMEROFF, M. E.; QIAN, X. Y.; KRUG, R. M. The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo. **Virology**, v. 212, n. 2, p. 422-428, 1995.

NETO, E. F. et al. Influenza. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n.2, p. 267-274, 2003.

NEUMANN, G.; HUGHES, M. T.; KAWAOKA, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. **Embo J.**, v. 19, n.24, p. 6751-6758, 2000.

NEUMANN, G. et al. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 283, p. 121-143, 2004.

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, 2000a.

NEUZIL, K. M. et al. The burden of influenza illness in children with asthma and other chronic medical conditions. **J. Pediatr.**, v. 137, p. 856-64, 2000b.

NEUZIL, K. M.; HOHLBEIN, C.; ZHU, Y. Illness among schoolchildren during influenza season: effect on school absenteeism, parenteral absenteeism from work, and secondary illness in families. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, v. 156, p. 986-991, 2002.

NICHOLLS, J. M. et al. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. **Nat. Med.**, v. 13, p. 147-149, 2007.

NICHOLSON, K. G. et al. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 355, p. 1845-1850, 2000.

NICHOLSON, K. G.; WOOD, J. M.; ZAMBON, M. Influenza. **Lancet**, v. 362, p. 1733-1745, 2003..

NIETO, A. et al. Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 29-36, 1994.

NISHIMURA, H. et al. Characterization of the cordlike structures emerging from the surface of influenza C virus-infected cells. **Virology**, v.179, n. 1, p.179-188, 1990.

NODA T. et al. Architecture of ribonucleo-protein complexes in influenza A virus particles. **Nature**, v. 439, n. 7075, p. 490-492, 2006.

ODAGIRI, T.; HONG, J.; OHARA, Y. The BM2 protein of influenza B virus is synthesized in the late phase of infection and incorporated into virions as a subviral component. **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 2573-2581, 1999.

OLIVEIRA, J. F.; SÁ, J. P. O.; CRUZ, M. E. M. Identificação e monitorização do vírus Influenza A e B, na população de Maceió. **Ciência e saúde coletiva**, v. 9, n. 1, p. 241-246, 2004.

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, n. 39, p. 22701-22704, 1995.

OXFORD, J. S.; LAMBKIN, R. Targeting influenza virus neuraminidase – a new strategy for antiviral therapy. **Drug. Discov. Today**, v. 3, p. 448-456, 1998.

OXFORD, J. S. Antivirals for the treatment and prevention of epidemic and pandemic influenza. **Influenza Other. Respir. Viruses**, v. 1, p. 27-34, 2007.

PAIVA, T. M. et al. Epidemiological study of influenza vírus in Brazil from 1996-1998. **Virus Rev. Res.**, v. 5, n. 1, p. 51-63, 2000.

PAIVA, T. M. Outbreak of influenza type A (H1N1) in Iporanga, São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, p. 311-315, 2001.

PAIVA et al. Influenza virus surveillance by Institute Adolfo Lutz during 2006. In: XVII National Meeting of Virology, 2006, Campos do Jordão. **Abstracts...**São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia, 2006. p. 167-168, res. 165PP - FLU5.

PALESE, P.; SHAW, M. L. *Orthomyxoviridae*: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds). **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 1647-1689.

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, p. 1984-1991, 2008.

PATTERSON, K. D.; PYLE, G. F. The Geography and mortality of the 1918 Influenza pandemic. **Bull Hist Med**, v. 65, p. 4-21, 1991.

PEIRIS, M. et al. Human infection with influenza H9N2. **Lancet**, v. 354, p. 916-917, 1999.

PEKOSZ, A.; LAMB, R. A. The CM2 protein of influenza C virus is an oligomeric integral membrane glycoprotein structurally analogous to influenza A virus M2 and influenza B virus NB proteins. **Virology**, v. 237, n. 2, p. 439-451, 1997.

PEKOSZ, A.; H E, B.; LAMB, R. A. Reverse genetics of negative-strand RNA viruses: closing the circle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, n. 16, p. 8804-8806, 1999.

PELTOLA, V.; ZIEGLER, T.; RUUSKANEN, O. Influenza A and B virus infections in children. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 299-305, 2003.

PELTOLA, V. et al. Accuracy of clinical diagnosis of influenza in outpatient children. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, n. 8, p. 1198-1200, 2005.

PLAKOKEFALOS, E. T. et al. Molecular and phylogenetic analysis of haemagglutinin and neuraminidase sequences from recent human influenza type A (H3N2) viral isolates in Southern Greece. **Arch. Virol.**, v. 146, p. 1899-1918, 2001.

PODDAR, S. K. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube *multiplex* reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. **J. Virol. Methods**, v. 99, p. 63-70, 2002.

POEHLING, K. A. et al. The Underrecognized Burden of Influenza in Young Children. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, p. 31-40, 2006.

PONTORIERO, A. V. et al. Antigenic and genomic relation between human influenza viruses that circulated in Argentina in the period 1995-1999 and the corresponding vaccine components. **J. Clin. Virol.**, v. 28, p. 130-140, 2003.

PONS-CATALANO, C. et al. Community acquired pneumonia and influenza in children. **Arch. Pediatr.**, v. 10, p. 1056-1060, 2003.

PORTELA, A.; DIGARD, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 723-734, 2002.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

PRINCIPI, N.; ESPOSITO, S. Are we ready for universal influenza vaccination in paediatrics? **Lancet Infect. Dis.**, v. 4, p. 75-83, 2004.

RACANIELLO, V. R.; PALESE, P. Influenza B virus genome: assignment of viral polypeptides to RNA segments. **J. Virol.**, v. 29, n. 1, p. 361-373, 1979.

RAMBAUT, A.; CHARLESTON, M. Molecular evolution library university of oxford, 2001. Available from: <http://evolve.zoo.ox.ac.uk>. Acesso em 12 jan. 2010.

van REGENMORTEL, M. H. V. et al. **Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. p. 525-59,

REID, A. H.; TAUBENBERGER, J. K. The 1918 flu and other influenza pandemics: “over there” and back again. **Lab. Invest.**, v. 79, p. 95-101, 1999.

REINA, J.; ROS, M. J.; BLANCO, I.; MUNAR, M.. Evaluation of a dot-blot ELISA method, direct immunofluorescence, and shell-vial culture for the detection of influenza virus A in nasopharyngeal aspirates. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 14, n.6, p. 397-398, 1996.

RENNELS, M. B.; MEISSNER, H. C.; COMMITTEE ON INFECTION DISEASES. Technical Report: reduction of the influenza burden in children. **Pediatrics**, v. 110, n. 6, p. 1246-1252, 2002.

RICHARDSON, J. C.; AKKINA, R. K. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. **Arch. Virol.**, v.116, n.1-4, p. 69-80, 1991.

RÖHM, C. et al. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. **Virology**, v. 217, n. 2, p. 508–516, 1996.

RUIGROK, R. W. et al. Membrane interaction of influenza virus M1 protein. **Virology**, v.267, n. 2, p. 289-298, 2000.

RUSSELL, R. J. et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. **Nature**, v. 443, p. 45-49, 2006.

SAKAI, T.; OHUCHI, R.; OHUCHI, M. Fatty acids on the A/USSR/77 influenza virus hemagglutinin facilitate the transition from hemifusion to fusion pore formation. **J. Virol.**, v. 76, n. 9, p. 4603-4611, 2002.

SCHMITT, A. P.; LAMB, R. A. Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. **Adv. Virus Res.**, v. 64, p. 383-416, 2005.

SECRETARIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Influenza pandêmica (H1N1) 2009: atualização, 2009. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/RESP/nt09_influ_atualiza.pdf. Acesso em 10 jan. 2010.

SHAMAN, J.; KOHN, M. Absolutely humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. **Proc. Natl. Sci. U.S.A.**, v. 106, p. 3243-3248, 2009.

SHAW, M. W.; CHOPPIN, P. W.; LAMB, R. A. A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 80, n. 16, p. 4879-4883, 1983.

SHINYA, K.; HAMM, M.; ITO, H.; KAWAOKA, Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. **Virology**, v. 320, p. 258-266, 2004.

SHINYA, K. et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, v. 440, p. 435-436, 2006.

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. et al. Impact of influenza epidemics on hospitalizations. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 831-837, 2000.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). **Situação epidemiológica da Influenza pandêmica (H1N1) 2009 no Mundo e no Brasil, até a Semana Epidemiológica 47 de 2009**. Informe Epidemiológico Influenza Pandêmica (H1N1) 2009. Edição nº 11, Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza_se_47.pdf. Acesso em 10 jan. 2010.

SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 531-569, 2000.

SMITH W.; ANDREWES, C. H.; LAIDLAW, P. P. A virus obtained from influenza patients. **Lancet**, v. 2, p. 66-68, 1933.

SMITH, D. J. et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. **Science**, v. 305, p. 371-376, 2004.

SOUZA, L. S. et al. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. **Pediatr. Pulmonol.**, v. 35, p. 184-191, 2003.

STEGMANN, T. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. **Traffic**, v. 1, n. 8, p. 598-604, 2000.

STEPHENSON, I.; ZAMBON, M. The epidemiology of influenza. **Occup. Med**, v. 52, p. 241-247, 2002.

STIVER, G. The treatment of influenza with antiviral drugs. **CMAJ**, v. 168, p. 49-57, 2003.

STOCKTON, J. et al. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2990-2995, 1998.

STRALIOTTO, S. M. **Prevalência de vírus respiratórios em pacientes pediátricos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, 1995.

STRALIOTTO, S. M. et al. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 283-291, 2002.

STURM-RAMIREZ, K. M. et al. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. **J. Virol.**, v. 78, n. 9, p. 4892-4901, 2004.

SUBBARAO, K. et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. **Science**, v. 279, p. 393-396, 1998.

SUGAYA, N. et al. The impact of winter epidemics of influenza and respiratory syncytial virus on pediatric admissions to an urban general hospital. **J. Med. Virol.**, v. 60, p. 102-106, 2000.

SUTMOLLER, F. et al. Viral etiology of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: first two years of a longitudinal study. **Bull. World Health Organ.**, v. 61, p. 845-852, 1983.

SUZUKI, T. et al. Sialidase activity of influenza a virus in an endocytic pathway enhances viral replication. **J. Virol.**, v. 79, n. 18, p. 11705-11715, 2005.

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde – Situação epidemiológica da influenza pandêmica (H1N1) 2009 no mundo e no Brasil, até a semana epidemiológica 47 de 2009. Informe epidemiológico Influenza Pandêmica (H1N1) 2009. ed. – Dezembro de 2009.

SWEET, C. et al. Oral administration of cyclopentane neuraminidase inhibitors protects ferrets against influenza virus infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 996-1004, 2002.

SWOFFORD, D. L. **PAUP* - phylogenetic analysis using parsimony (*and others Methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, 1998.m

TAI, C. Y. et al. Characterization of human influenza virus variants selected in vitro in the presence of the neuraminidase inhibitor GS 4071. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, p. 3234-3241, 1998.

TALAVERA, G. A. Influenza: historia de una enfermedad. **Rev. Bioméd.**, v. 10, n. 1, p. 57-61, 1999.

TAUBENBERGER, J. K. et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. **Nature**, v. 437, p. 889-893, 2005.

THOMAZELLI, L. M. et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. **J Pediatr**, v. 83, n. 5, 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, p. 1333-1340, 2004.

TONIOLO-NETO, J. **Dia de vacinação do idoso e Projeto Vigigripe: conjunto de medidas interativas para a prevenção da influenza e suas complicações**. 169f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2001.

TREANOR, J. J. et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza. **JAMA**, v. 283, p. 1016-1024, 2000.

TWEED, S. A. et al. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 2196-2199, 2004.

UNGCHUSAK, K. et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 4, p. 333-340, 2005.

VALDEZ, A. R. **Pandemia de gripe Sinaloa, 1918-1919**. In: Elementos: ciencia y cultura, v. 09, n. 47, p. 37-43, 2002.

VEDOVELLO, D. **Deteção, tipagem e subtipagem dos vírus Influenza A e B em crianças de São Paulo**. 110f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

VIBOUD, C.; ALONSO, W. J.; SIMONSEN, L. Influenza in tropical regions. **PLoS Med.**, v. 3, n. 4, p. 89, 2006.

VIDAL, L. R. R. et al. The epidemiology and antigenic characterization of influenza viruses isolated in Curitiba, South Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 180-185, 2008.

VIEIRA, S. E.; STEWIEN, K. E.; DURIGON, E. L.; TOROK, T. J.; ANDERSON, L. J.; MIYAO, C. R.; HEIN, N.; BOTOSSO, V. F.; PAHL, M. M.; GILIO, A. E.; EJZENBERG, B.; OKAY, Y. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 43, p. 125-131, 2001.

VIESCA, T. C. **Medicina prehispánica de México**. México: Panorama Editorial, p. 49-50, 1996.

VLASAK, R. et al. Influenza C virus esterase: analysis of catalytic site, inhibition, and possible function. **J. Virol.**, v. 63, n. 5, p. 2056-2062, 1989.

WAGNER, R. et al. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. **J. Virol.**, v. 74, n. 14, p. 6316-6323, 2000.

WALSH, E. E.; COX, C.; FALSEY, A. R. Clinical features of influenza. A virus infection in older hospitalized persons. **J Am Geriatr Soc**, v. 50, p. 1498-1503, 2002.

WANG, P.; PALESE, P.; O'NEILL, R. E. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. **J. Virol.**, v. 71, n. 3, p. 1850-1856, 1997.

WANG, S. Q.; DU, Q. S.; CHOU, K. C. Study of drug resistance of chicken influenza A virus (H5N1) from homology-modeled 3D structures of neuraminidases. **Biochem. Biophys. Rev. Commun.**, v. 354, p. 634-640, 2007.

WARD, C. W. ELLEMAN, T. C.; AZAD, A. A. Amino acid sequence of the Pronase-released heads of neuraminidase subtype N2 from the Asian strain A/Tokyo/3/67 of influenza virus **Biochem. J.**, v. 207, p. 91-95, 1982.

WARD, C. W. et al. Chemical and antigenic characterization of the carbohydrate side chains of an Asian (N2) influenza virus neuraminidase. **Virology**, v. 126, n. 1, p. 370-375, 1983.

WARD P. et al. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. **J. Antimicro. Chemother.**, v. 55(Suppl 1), p. 5-21, 2005.

WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G. Emergence of influenza A viruses. **Phil Trans R Soc Lond B**, v. 356, p. 1817-1828, 2001.

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

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 152-179, 1992.

WEBER, F. et al. A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. **Virology**, v. 250, n. 1, p. 9-18, 1998.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Memorandum. A revised system of nomenclature for influenza viruses. **Bull. World Health Organ.**, v. 58, p. 585-591, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WER**, v. 75, p. 281-288, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world health report 2005. Available from: http://www.who.int/whr/2005/annex/annexes3-4_en.pdf. Acesso em 14 jan. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Influenza (Seasonal), 2009a. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>. Acesso em 02 jul. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Pandemic (H1N1) 2009, update 58**, 2009b. Available from: http://www.who.int/csr/don/2009_07_06/en/index.html. Acesso em 14 jul. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus vaccine – conclusions and recommendations from the October 2009 meeting of the immunization Strategic Advisory Group of Experts. *WER*, v. 84, n. 49, p. 505-516, 2009c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Global Influenza Surveillance Network, 2009d. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/surveillance/en/>. Acesso em 30 nov. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Seasonal influenza vaccination, 2009e. Available from: http://www.euro.who.int/influenza/20080618_12?language=french. Acesso em 24 jul. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). H5N1 avian influenza: timeline of major events. **Geneva: World Health Organization**, 2010a. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_10_01_04.pdf. Acesso em 24 jul. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) Reported to WHO**, 2010b. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_01_28/en/index.html. Acesso em 29 jan. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global alert and response**, 2010c. Available from: http://www.who.int/csr/don/2010_01_29/en/index.html. Acesso em 02 fev. 2010.

WRIGHT, K. E. et al. Typing and sbtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1180- 1184, 1995.

WRIGHT, P. F.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. **Orthomyxoviruses**. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (Eds.): **Fields Virology**, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p.1692-1740.

XU, X et al. Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses. **Virology**, v. 224, p. 175-183, 1996.

YAMASHITA, M.; KRYSTAL, M.; PALESE, P. Evidence that the matrix protein of influenza C virus is coded for by a spliced mRNA. **J. Virol.**, v. 62, n. 9, p. 3348-3355, 1988.

YAMASHITA, M.; KRYSTAL, M.; PALESE, P. Comparison of the three large polymerase proteins of influenza A, B, and C viruses. **Virology**, v. 171, n. 2, p. 458-466, 1989.

YEWDELL, J. W.; HACKETT, C. J. Specificity and function of T lymphocytes induced by influenza A viruses. In: KRUG, R.M. (Ed.). **The influenza viruses**. New York: Plenum, 1989. p. 361-429.

ZHANG, J.; LAMB, R. A. Characterization of the membrane association of the influenza virus matrix protein in living cells. **Virology**, v. 225, n. 2, p. 255-266, 1996.

ZHENG, H.; PALESE, P.; GARCIA-SASTRE, A. Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication. **Virology**, v. 217, n. 1, p. 242-251, 1996.

ZÜRCHER, T.; et al. Mutations conferring zanamivir resistance in human influenza virus N2 neuraminidases compromise virus fitness and are not stably maintained in vitro. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, n. 4, p. 723-732, 2006.