

LUINE ROSELE RENAUD VIDAL TSUCHIYA

**INCIDÊNCIA, SAZONALIDADE E CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DE
AMOSTRAS DE VÍRUS INFLUENZA ISOLADAS NA CIDADE DE CURITIBA NO
PERÍODO DE 2000 A 2003**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Dr.^a Libera Maria Dalla Costa

Co-orientadora: Dr.^a Marilda Mendonça de Siqueira

CURITIBA


2004

TERMO DE APROVAÇÃO

LUINE ROSELE RENAUD VIDAL TSUCHIYA

"Incidência, sazonalidade e caracterização antigênica de amostras de vírus influenza isoladas na cidade de Curitiba, no período de 2000 a 2003"

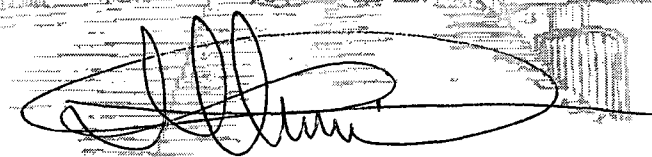
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:



Dra. Libera Maria Dalla Costa (orientadora)
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof.ª Dr.ª Iara José Taborda de Messias-Reason
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 27 de fevereiro de 2004

Luine Rosele Renaud Vidal Tsuchiya

Farmacêutica Bioquímica, graduada pela
Universidade Federal do Paraná, em
novembro de 1984.

Dedico este trabalho às pessoas que me fizeram acreditar que sou capaz e que compreenderam os momentos em que necessitei suprimir-lhes a convivência:

Aos meus queridos pais,

Luiz Carlos Borges Vidal

Arlene Renaud Vidal

Ao meu marido,

George Takashi Tsuchiya

Aos meus filhos, razão da minha existência,

Luiz Senji,

Fernando Minoru e

Felipe Kooji.

AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento deste trabalho, contamos com a valorosa colaboração de uma equipe de elevada capacidade técnica e de incomensurável espírito humano. Rendo a todos minha homenagem e meus sinceros agradecimentos:

Às orientadoras - Dr^a Libera Maria Dalla Costa e Dr^a Marilda Mendonça de Siqueira – Pelas requisições em horários impróprios, sempre atendidas de forma cortês e eficiente.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Prof. Dr. Cid Aimberé de Moraes Santos – Pela dedicação ao estudo científico e preocupação com o aprimoramento contínuo do curso de pós-graduação.

Aos Corpos Docente e Discente do Curso de Pós-Graduação, em especial colegas, Carmen Antonia Sanches Ito, Renato Mitsunori Nishihara e Waldemar de Paula Júnior – Pelos valiosos conselhos e companheirismo que me fizeram superar os momentos mais difíceis, levando-me à conclusão do trabalho.

Aos Colegas do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em especial Dr^a Meri Bordignon Nogueira e Dr^a Sonia Mara Raboni – Pelo apoio incondicional, tanto profissional como pessoal.

Aos Colegas do Laboratório de Vírus Respiratórios da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, em especial ao colega Fernando C. Motta – Pela assessoria à distância de profissionalismo e eficiência.

Aos Pacientes – Pelo rico material fornecido e pela compreensão de que estavam a serviço da ciência.

A minha família – Em especial a Mirian Renaud dos Passos, minha tia, pelo carinho e apoio incansáveis.

A DEUS – Porque esteve do meu lado em todos os momentos.

*N*ão é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira *com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes. Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas só nos obriga a sermos conscientes.*

Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditamos no nosso sonho, nada é por acaso.

(Autor Desconhecido)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 HISTÓRICO	20
2.2 CLASSIFICAÇÃO	22
2.3 VARIABILIDADE ANTIGÊNICA	27
2.4 NOMENCLATURA	31
2.5 TRANSMISSÃO E INFECÇÃO	31
2.6 IMUNOLOGIA	36
2.7 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	37
2.8 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS	39
2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	43
2.9.1 Cultivo Celular	43
2.9.2 Imunofluorescência	45
2.9.3 Técnicas de Biologia Molecular para Caracterização do Vírus Influenza	46
2.9.4 Inibição de Hemaglutinação	47
2.10 PREVENÇÃO E CONTROLE	48
2.11 OUTROS VÍRUS COMO AGENTES ETIOLÓGICOS NAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS	49
3 OBJETIVOS	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 CASUÍSTICA E AMOSTRAS	52
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	54
4.3 DETECÇÃO DE ANTÍGENOS VIRAIS POR IMUNOFLOURESCÊNCIA ..	56

4.4 ISOLAMENTO DOS VÍRUS POR CULTURA CELULAR	58
4.5 ANÁLISE MOLECULAR	60
4.5.1 Extração de RNA	61
4.5.2 Transcrição Reversa	61
4.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase	62
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5 RESULTADOS	65
5.1 PACIENTES AMBULATORIAIS	67
5.1.1 Incidência	67
5.1.2 Sazonalidade	72
5.1.3 Características Clínicas e Demográficas	73
5.2 PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS	75
5.2.1 Incidência	75
5.2.2 Sazonalidade	78
5.2.3 Características Demográficas	81
5.3 PACIENTES HOSPITALIZADOS	81
5.3.1 Incidência	81
5.3.2 Sazonalidade	83
5.3.3 Características Clínicas e Demográficas	85
5.4 SUBTIPAGEM POR RT-PCR	88
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ANEXOS	114

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VÍRUS INFLUENZA	24
FIGURA 2	FORMAS FILAMENTOSAS DO VÍRUS INFLUENZA EM CULTURA CELULAR INICIAL, VISUALIZADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA	26
FIGURA 3	FORMAS ESFÉRICAS DO VÍRUS INFLUENZA, CULTURA CELULAR, APÓS VÁRIOS SUBCULTIVOS, VISUALIZADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA	26
FIGURA 4	DISTRIBUIÇÃO DAS HEMAGLUTININAS E NEURAMINIDASES DO VÍRUS INFLUENZA A NA NATUREZA	29
FIGURA 5	VARIABILIDADE DO VÍRUS INFLUENZA	30
FIGURA 6	INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA, LIGAÇÃO COM O ÁCIDO SIÁLICO	33
FIGURA 7	INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA, BOMBA DE PRÓTON (M2)	34
FIGURA 8	INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA, LIBERAÇÃO DO vRNP PARA O CITOSOL	34
FIGURA 9	INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA, “SNATCHED CAP”	35
FIGURA 10	FASE PRECOCE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA: TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS FORMADORAS DO NUCLEOCAPSIDE	35
FIGURA 11	FASE TARDIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA: FORMAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA SUPERFÍCIE VIRAL	36
FIGURA 12	COLETA DO ASPIRADO DE NASOFARINGE	54
FIGURA 13	DIAGRAMA DO PROCESSAMENTO DA AMOSTRA	55
FIGURA 14	TUBOS DE CULTURA CELULAR “SHELL VIAL”	59
FIGURA 15	TUBOS DE CULTURA CELULAR CONVENCIONAL	60
FIGURA 16	DIAGRAMA REPRESENTATIVO DOS RESULTADOS	65

FIGURA 17 –	INCIDÊNCIA DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B EM RELAÇÃO AOS OUTROS VÍRUS ESTUDADOS	66
FIGURA 18	IMUNOFLUORESCÊNCIA POSITIVA DA AMOSTRA Nº 180 PARA VÍRUS INFLUENZA B EM CÉLULAS DE ASPIRADO DE NASOFARINGE	69
FIGURA 19	IMUNOFLUORESCÊNCIA POSITIVA DA AMOSTRA Nº 36 PARA VÍRUS INFLUENZA A EM CÉLULAS DE CULTURA CELULAR - MDCK.....	69
FIGURA 20	IMUNOFLUORESCÊNCIA NEGATIVA – CONTROLE NEGATIVO, CULTURA DE CÉLULAS MDCK.....	70
FIGURA 22	TAMANHO DOS PRODUTOS OBTIDOS PARA OS DIFERENTES TIPOS DE VÍRUS INFLUENZA POR RT-PCR	89
FIGURA 23	SUBTIPAGEM POR RT-PCR DE ALGUMAS AMOSTRAS SELECIONADAS	90
FIGURA 24	SUBTIPAGEM POR RT-PCR DE ALGUMAS AMOSTRAS SELECIONADAS	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	SEGMENTOS DE RNA GENÔMICOS DOS VÍRUS INFLUENZA A E B E SUAS PROTEÍNAS CODIFICADAS	25
TABELA 2	COMPARAÇÃO GRIPE X RESFRIADO	38
TABELA 3	PANDEMIAS CAUSADAS PELOS VÍRUS INFLUENZA NO SÉCULO XX	42
TABELA 4	INCIDENTES LIMITADOS CAUSADOS PELOS VÍRUS INFLUENZA NO SÉCULO XX	42
TABELA 5	COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA	44
TABELA 6	PROPRIEDADE DOS PRIMERS USADOS PARA VIRUS INFLUENZA PCR-MULTIPLEX	64
TABELA 7	INCIDÊNCIA DOS VÍRUS INFLUENZA EM RELAÇÃO AOS OUTROS VÍRUS E AMOSTRAS NEGATIVAS, PACIENTES AMBULATORIAIS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003	71
TABELA 8	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES AMBULATORIAIS, PERÍODO DE 2000 A 2003 .	74
TABELA 9	NÚMERO DE PACIENTES AMBULATORIAIS VACINADOS x PACIENTES AMBULATORIAIS INFLUENZA POSITIVO PERÍODO 2000-2003	74
TABELA 10	INCIDÊNCIA DOS VÍRUS INFLUENZA EM RELAÇÃO AOS OUTROS VÍRUS E AMOSTRAS NEGATIVAS, PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003	78
TABELA 11	INCIDÊNCIA DOS VÍRUS INFLUENZA EM RELAÇÃO AOS OUTROS VÍRUS E AMOSTRAS NEGATIVAS, DE PACIENTES HOSPITALIZADOS, NO PERÍODO DE 2000 a 2003	83
TABELA 12	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES HOSPITALIZADOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003	86
TABELA 13	NÚMERO DE AMOSTRAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS INTERNADOS AGRUPADOS POR CLÍNICA E RESULTADOS POSITIVOS PARA VÍRUS INFLUENZA	88

TABELA 14	SUBTIPAGEM DOS VÍRUS INFLUENZA DE ALGUMAS AMOSTRAS POSITIVAS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003	89
-----------	---	----

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS E NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS, PACIENTES AMBULATORIAIS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003	70
GRÁFICO 2	NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS E NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA VÍRUS INFLUENZA, PACIENTES AMBULATORIAIS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003	71
GRÁFICO 3	INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS, PACIENTES AMBULATORIAIS, NOS ANOS DE 2000 A 2003	72
GRÁFICO 4	INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS MÉDIAS ANUAIS, PACIENTES AMBULATORIAIS, NOS ANOS DE 2000 A 2002	73
GRÁFICO 5	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS E VÍRUS INFLUENZA DETECTADOS, POR FAIXA ETÁRIA NOS PACIENTES AMBULATORIAS, PERÍODO 2000 A 2003	75
GRÁFICO 6	NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS E NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS NOS PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003	77
GRÁFICO 7	NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS E NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA VÍRUS INFLUENZA NOS PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, NO PERÍODO 2000 A 2003	77
GRÁFICO 8	INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS COLETADAS NOS PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, ANOS DE 2000 A 2003	79
GRÁFICO 9	INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS, PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, NOS ANOS DE 2000 A 2002 EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS MÉDIAS ANUAIS	80
GRÁFICO 10	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS E VÍRUS INFLUENZA DETECTADOS, POR FAIXA ETÁRIA, PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, PERÍODO 2000 A 2003	80

GRÁFICO 11	NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS E NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS, PACIENTES HOSPITALIZADOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003	82
GRÁFICO 12	NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS E NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA VÍRUS INFLUENZA, PACIENTES HOSPITALIZADOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003	83
GRÁFICO 13	INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS, PACIENTES HOSPITALIZADOS, NOS ANOS DE 2000 A 2003	84
GRÁFICO 14	INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS MÉDIAS ANUAIS, PACIENTES HOSPITALIZADOS, NOS ANOS DE 2000 A 2002	85
GRÁFICO 15	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS E VÍRUS INFLUENZA DETECTADOS, POR FAIXA ETÁRIA, PACIENTES HOSPITALIZADOS, PERÍODO 2000 A 2003	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

a.C.	- Antes de Cristo
ADENO	- Adenovírus
ANF	- Aspirado de Nasofaringe
AMV	- “Avian Myeloblastosis Virus”
°C	- Grau Celsius
cDNA	- DNA complementar
CDC	- “Center for Disease Control”
CLT	- Linfócito T citotóxico
dNTPs	- dideóxido nucleotídeos
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetracético
EIA	- Enzimaimunoensaio
EUA	- Estados Unidos da América
FLUA	- Vírus Influenza Tipo A
FLUB	- Vírus Influenza Tipo B
FUNASA/MS	- Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde
g	- grama
GuSCN	- Tiocianato de Guanidina
HA	- Hemaglutinina
HCN	- Ácido Cianídrico
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HEF	- Hemaglutinina Esterase de Fusão
HEp-2	- Linhagem Celular de Carcinoma Laríngeo Humano
HCl	- Ácido Clorídrico
IFI	- Imunofluorescência Indireta
IgA	- Imunoglobulina A
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IL	- Interleucina
KCl	- Cloreto de Potássio
M1/M2	- Matrix
µg	- Micrograma
MDCK	- Madin Darby Canine Kidney
ml	- Mililitro
mM	- Milimolar
mRNA	- RNA mensageiro
MS	- Ministério da Saúde
NA	- Neuraminidase
NaOH	- Hidróxido de Sódio
NB	- Proteína não estrutural para Influenza B
nm	- Nanômetro
NP	- Nucleoproteína
NS	- Proteína não estrutural
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PA/PB	- Proteína com função de polimerase
PBS	- Tampão Salina Fosfatada

pH	- Potencial Hidrogeniônico
PIV	- Vírus Parainfluenza
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
Pmol	- Picomol
RNA	- Ácido Ribonucléico
RSV	- Vírus Sincicial Respiratório
RT	- Transcrição Reversa
Taq	- Termus Aquaticus
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UI	- Unidade Internacional
vRNP	- Ribonucleoproteína Viral

RESUMO

O vírus influenza é um dos principais agentes etiológicos das doenças respiratórias, sendo responsável, por altas taxas de mortalidade e morbidade em todo o mundo, em indivíduos de todas as faixas etárias. São poucos os dados da prevalência das infecções por vírus influenza em pacientes pediátricos, imunossuprimidos e ambulatoriais em nosso país. Recentemente tem se procurado estabelecer uma vigilância destas infecções em nossa comunidade pelo sistema de informação de vigilância epidemiológica do vírus influenza no Brasil. Com o objetivo de avaliar a incidência e subtipar os vírus influenza, na cidade de Curitiba, realizou-se o presente estudo. Foram analisadas amostras de aspirados de nasofaringe ou lavado broncoalveolar, no período de 2000 a 2003, de pacientes ambulatoriais, das unidades de saúde, imunossuprimidos da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, e hospitalizados em outras unidades. O isolamento do vírus foi realizado pela metodologia de Shell Vial (SV), a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para a tipagem, e a subtipagem foi realizada pela técnica de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Avaliou-se um total de 1621 amostras, com uma positividade de 8,3% para o vírus influenza, por "Shell Vial" e/ou imunofluorescência indireta, sendo 76,3% para o tipo A e 23,7% para o tipo B. Observou-se que, neste período circularam os subtipos H1, H3 do tipo A e também, o tipo B, utilizando-se as técnicas de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase. Os resultados obtidos possibilitaram avaliar dados de incidência, sazonalidade, perfis demográficos e clínicos relacionados ao vírus influenza na cidade de Curitiba.

ABSTRACT

Influenza virus is one of the important agents in the etiology of respiratory infections, they are responsible for high rates of morbidity and mortality all over the world, in persons of all ages. There are few data about the incidence of influenza virus in pediatrics, immunosuppressed and out patients in our country. Recently, local health community is trying to establish a surveillance programme about the virus in our region. In order to measure the incidence, seasonality and subtype the influenza virus in Curitiba city, the present study was performed. It was analyzed nasopharyngeal aspirates and bronchoalveolar lavage, in the period of 2000 to 2003, from outpatients, from health unit, immunosuppressed patients from Bone Marrow Transplant Unit from General Hospital from Federal University and hospitalized ones from others units. The virus isolation were made by Shell Vial (SV) methodology, the indirect immunofluorescence (IFI) to type the virus, and to subtype the virus it was performed the reverse transcription and polymerase chain reaction methodologies. A total of 1621 samples were analyzed, with 8,3% of positive samples for influenza virus, from that 76,3% for type A and 23,7% for type B. It was observed that in this period, subtypes H1 and H3 for type A and type B virus were circulated, using the transcriptase reverse and polymerase chain reaction. The results permit to establish incidence, seasonality, demographic and clinical data related with influenza virus infections in Curitiba city.

1 INTRODUÇÃO

A gripe é uma doença respiratória aguda causada pelo vírus influenza e na sua forma epidêmica, não reconhece limites territoriais, se dissemina muito rapidamente, de país para país. A doença ocorreu em epidemias, sendo a "praga", como foi chamada, descrita em 412 a.C. por Hipócrates e 427-430 a.C. por Tucídides (COUCH; KASEL, 1995, p. 431).

A mais devastadora epidemia ocorreu em 1918, vitimando aproximadamente 20 milhões de pessoas, sendo que, a metade das mortes aconteceu nos Estados Unidos da América (EUA). Desde este episódio foram registradas pandemias, menos severas, em 1957, 1968 e 1977 (KOLATA, 2002, p. 17).

O vírus influenza vem causando esporádicas epidemias e pandemias com significantes taxas de mortalidade e morbidade, onde as populações mais atingidas são as crianças e idosos, porém, relata-se o envolvimento do vírus em todas as faixas etárias, e crianças em idade escolar podem ser os principais transmissores. (SUBBARAO, 1999, p. 352-355; ZAMBON, 1999, p. 3-5).

Devido ao grande impacto, no contexto da saúde pública e das grandes perdas no âmbito sócio econômico, causado pelas epidemias por influenza, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma grande rede de vigilância, contribuindo amplamente para o entendimento da epidemiologia e na formulação das vacinas para influenza, a partir de 1968, estão sendo realizados levantamentos das cepas que circulam no mundo e a seleção anual de vacinas. O desenvolvimento de uma agenda global para o vírus influenza tem como conteúdo o agrupamento de atividades prioritárias para reduzir a morbidade e mortalidade, nas epidemias e dispõe de uma série de considerações a fim de preparar a comunidade científica para a próxima pandemia (EUA, WHO Global Influenza Programme, 2002).

Conforme estudos realizados nos EUA, há relatos de epidemias, pelo vírus influenza, que ocorrem no inverno, todos os anos, e são responsáveis por aproximadamente 114.000 hospitalizações e 20.000 mortes por ano (BRAMMER *et al.*, 2003, p. 14-15).

No Brasil, de acordo com levantamentos realizados pelo Ministério da Saúde (MS), observou-se que de 1993 a 1996, houve uma média anual de 203.358 internações por gripe e pneumonia. A distribuição geográfica dessas internações

ocorreu em regiões mais populosas e que coincidentemente são as regiões mais frias, fator importante para a presença do vírus. Na distribuição por faixas etárias, nos anos de 1996 e 1997, observou-se que 35% das internações ocorreram em indivíduos entre 15 e 49 anos, ou seja, a faixa etária mais produtiva da população e também a mais numerosa (BRASIL, FUNASA-MS, 1999, P. 9-12).

Visando monitorar o impacto das infecções pelo vírus influenza em nosso ambiente, o MS propôs um sistema de vigilância nacional do vírus. O programa tem como objetivos, a discussão dos dados epidemiológicos e o estabelecimento de uma rede de diagnóstico laboratorial a fim de caracterizar o agente etiológico fornecendo subsídios para o conhecimento básico da epidemiologia molecular para a produção de vacinas eficazes (BRASIL, FUNASA-MS, 1999, p. 13).

Três centros brasileiros fazem parte da rede mundial de laboratórios de Vigilância de Influenza, coordenados pela OMS, são eles, Instituto Evandro Chagas no Pará, Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro e Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, fazendo parte desta rede, o laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e o Laboratório Central do Estado do Paraná, referências no Paraná, que são gerenciados pelo Instituto Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro.

De acordo com levantamentos da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Paraná, tem-se uma média anual de 14.425 pacientes internados, nas unidades de saúde de Curitiba, por doenças do aparelho respiratório, em diferentes faixas etárias, sendo a pneumonia com causa desconhecida, a doença de maior incidência. A porcentagem anual de mortalidade proporcional foi de 11,5%, dados levantados de 1996 a 2001 (BRASIL, Sistema de Informações em Saúde, 2002).

Esses dados conferem a relevância desse estudo para a compreensão dos mecanismos evolutivos do vírus, os quais são, a base para o seu controle, por meio de imunização e no apoio ao diagnóstico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A gripe é uma doença respiratória aguda causada pelo vírus influenza. O termo influenza teve origem nos séculos XIV a XV, quando na região de Florença, Itália, acreditava-se que as “influências” das conjunções planetárias, pouco usuais, atuavam na gênese dos períodos de endemias com febre, tosse, calafrios, de início súbito, de rápida disseminação, atingindo crianças, jovens e idosos (CABRAL *et al*, 1994, p. 110). Esta crença persistiu durante alguns séculos, até que em 1933 o vírus foi isolado (SMITH; ANDREWS; LAIDLAN, 1933, p. 66-68), recebendo o nome de vírus influenza.

Há relatos, de que a gripe tenha existido desde o começo da história da medicina, sendo descrita por Hippocrates em 412 a.C. e Thucydides em 427–431 a.C. (COUCH; KASEL, 1995, p. 431). Thucydides, em 431 a.C., descreve algumas características da enfermidade, relatando que, “... pessoas fortes e sadias seriam afligidas com calores violentos na cabeça e os olhos vermelhos inflamados, as partes internas, como a garganta ou a língua sangrando e exalando um hálito fétido e estranho” (KOLATA, 2002, p. 49).

Outro relato histórico denominado como, a mortal “enfermidade sudoral”, ocorrida na Inglaterra no século XV, pode ter sido influenza, aparecendo primeiro em 1485, com surtos epidêmicos, para desaparecer em 1552. Na França este mesmo quadro foi denominado de “a gripe” (LAVAL, 1999, p. 70).

Em 1918, com a Primeira Guerra Mundial (1914-1918), a devastadora “Gripe Espanhola”, causou o maior número de mortes por influenza. Mais de 500.000 pessoas morreram nos EUA, e 20-50 milhões de pessoas morreram no mundo (CROSBY, 1989). Muitas pessoas morreram nos primeiros dias da infecção e outras logo após, por complicações. Na gripe espanhola, metade das pessoas que morreram eram jovens, e adultos saudáveis, indicando a alta virulência da subespécie circulante. O RNA do vírus da gripe de 1918 foi recentemente recuperado, e suas proteínas, hemaglutinina e neuraminidase, seqüenciadas, na

tentativa de encontrar fatores que expliquem a alta patogenicidade do vírus de 1918 (REID *et al.*, 2000; TUMPEY *et al.*, 2002, p. 13849).

Posteriormente entre 1957 e 1958, ocorreu a gripe Asiática causando aproximadamente 70.000 mortes nos EUA. A gripe foi identificada, no final de fevereiro em 1957 na China e disseminou-se para os EUA por volta de junho de 1957. Em 1968 e 1969, ocorreu a gripe de Hong Kong, esta pandemia foi detectada em Hong Kong no início de 1968 e disseminou-se para os EUA no final do ano, ocasionando aproximadamente 34.000 mortes nos EUA. Os relatos que se seguem são exemplos de novos vírus da gripe, porém, não foram responsáveis por pandemias. Em 1976, ocorreu a gripe suína e soldados foram infectados em “New Jersey”, EUA, porém não se disseminou, devido a ações profiláticas imediatas, com a vacinação de 40 milhões de americanos. Em 1997, relatou-se a gripe aviária em Hong Kong, onde seis pessoas morreram, dezoito foram hospitalizadas devido à infecção de um novo subtipo de vírus, previamente isolado de aves. Os oficiais de Hong Kong ordenaram o extermínio de todas as aves da área. Desde então, não foi detectada nenhuma nova infecção por este tipo viral. Em 1999, também em Hong Kong, foi isolado um tipo de vírus influenza em 2 crianças, com idade de um e quatro anos. Este tipo viral, ainda não havia sido encontrado em humanos, somente em pássaros. Não se sabe como as crianças foram infectadas, mas após hospitalização se recuperaram totalmente (KOLATA, 2002, p. 108-283; COX; SUBBARAO, 2000, p. 413-414).

Desde 1977, dois subtipos de vírus influenza do tipo A têm circulado, e em fevereiro, do ano de 2002 a OMS e a “Public Health Laboratory Service” na Inglaterra, reportaram a identificação de uma nova cepa do vírus do tipo A, isolada de humanos na Inglaterra, Israel e Egito. Este novo subtipo parece ter se originado de um rearranjo genético entre as duas cepas que estavam predominando. Este mesmo subtipo foi anteriormente identificado, em dezembro de 1988 e março de 1989, em 6 cidades na China, porém o vírus não se disseminou (MAROZIN *et al.*, 2002; CHOI; GOYAL; JOO, 2002; SCHRADER, 2003).

Em 1977, identificou-se um subtipo aviário do vírus influenza e em 2003, na China, esse subtipo acometeu uma família que desenvolveu sinais e sintomas respiratórios causando dois óbitos, no entanto, as informações obtidas foram

insuficientes para esclarecer o modo de transmissão da doença (HIROMOTO, 2000; CDC, CDC Health Advisory, 2004).

Em fevereiro de 2003 na Holanda, foi reportada uma epidemia de um subtipo de influenza aviário altamente patogênico, que acometeu aves domésticas em várias fazendas. Mais recentemente houve relatos do mesmo subtipo em suínos e humanos na Inglaterra, e entre pássaros na Bélgica e Alemanha. Embora seja rara a transmissão direta do vírus influenza de aves para humanos, infecção esporádica tem acontecido, o que alerta a comunidade científica, pois, a população não está preparada imunologicamente para entrar em contato com esta nova cepa podendo causar pandemias (CDC, Health Alert Network Update, 2004).

Ao final do mês de janeiro de 2003, o “Department of Community Health”, em Michigan, relatou casos de doença respiratória associada ao vírus influenza, com complicações, incluindo problemas neurológicos, descrevendo-se altas taxas de mortalidade e morbidade. Esta acometeu crianças e jovens até 21 anos, para maiores esclarecimentos, estudos mais detalhados estão sendo realizados, porém os achados indicam uma alta freqüência de complicações por influenza em crianças e jovens saudáveis (WILKINS *et al.*, 2003 p. 837-840).

Atualmente o mundo se prepara para a próxima pandemia de influenza humana, e a comunidade científica procura por indicadores da eminência do evento. Teremos uma nova pandemia por influenza? Quando acontecerá? Esta é a grande incerteza. Cogita-se que o vírus terá origem de reservatórios de pássaros aquáticos da Eurásia, e envolverá um rearranjo nos suínos, resultando em um híbrido de cepas humanas e aviárias (WEBSTER, 1997, S14).

2.2 CLASSIFICAÇÃO

Os vírus influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae*, os genomas compreendem 10 genes distribuídos em sete a oito segmentos de RNA – fita simples, com polaridade negativa, são envelopados e de simetria helicoidal (Figura 1). Todos os segmentos de RNA dos vírus influenza A foram seqüenciados e suas funções definidas, como demonstrado na tabela 1 (COUCH; KASEL, 1995, p.433-435).

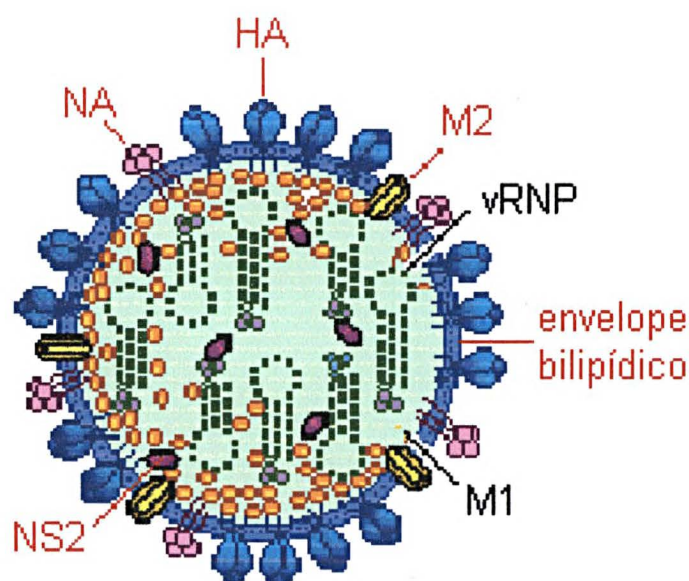
Podem ser classificados em três tipos: A, B e C. Os tipos A e B são morfologicamente indistinguíveis, o tipo C é distinguido pela organização das moléculas glicoproteicas de superfície que se apresentam como raios na forma hexagonal. Os vírus podem ser tipados pelos seus antígenos de superfície denominados hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) e hemaglutinina-esterase-proteína de fusão (HEF), especificamente para o vírus tipo C. Adicionalmente, os vírus influenza do tipo A podem ser subtipados de acordo com as proteínas, hemaglutininas e neuraminidasas, presentes no envelope viral. Até o momento, quinze subtipos de hemaglutininas e 9 subtipos de neuraminidasas foram descritos (ZOU, 1997, p. 2623; ZAMBON, 1999, p. 3).

Os três tipos podem também ser biologicamente diferenciados, de acordo com outros achados. Primeiro, os vírus influenza do tipo A têm sido isolados de várias espécies animais, incluindo humanos. No entanto, os tipos B e C são exclusivamente patógenos da espécie humana. Segundo, as proteínas de superfície do vírus do tipo A exibem uma taxa de variabilidade maior que seus homólogos tipos B e C. Por último, achados relacionados à morfologia e a estrutura molecular dos tipos A e B demonstram uma homologia muito maior que o tipo C (KINGSBURY, 1991, p. 527-529).

Os vírus Influenza dos tipos A e B, são pleomórficos. A forma filamentosa é a mais freqüente, particularmente em isolados de cultura celular recente (Figura 2), também se encontra, a forma esférica (Figura 3), em passagens seriadas em cultura celular ou ovos embrionados. A forma esférica tem aproximadamente 80-120 nm, contém 70-75% de proteínas, 20% de lipídios e 1% de RNA. O "core" viral contém o material genético e três proteínas com funções de polimerases, PB1, PB2 e PA, que estão ligadas ou fortemente associadas a nucleoproteínas (NP), o complexo tem forma helicoidal. O envelope é composto por proteínas da matrix (M_1) que cobre a camada interna do envelope originado da camada bilipídica da célula do hospedeiro. A superfície externa do virion influenza possui três proteínas integrais de membrana: a hemaglutinina homotrimérica triangular, a tetramérica neuraminidase, em forma de cogumelo, e a proteína homotetramérica M_2 . O virion RNA também codifica para proteínas não estruturais, encontradas somente em células infectadas: NS_1 e NS_2 para Influenza A e B e a proteína chamada NB para Influenza B (COUCH; KASEL, 1995, p. 433-435; COUCEIRO, 2002, p. 120).

O vírus influenza do tipo C tem homologias com os tipos A e B, com uma diferença significativa na proteína designada como hemaglutinina esterase de fusão (HEF) responsável pela interação do vírus com a célula hospedeira, induzindo a fusão e liberando o material genético para a replicação levando finalmente a destruição da mesma (COUCH; KASEL, 1995, p. 435).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VÍRUS INFLUENZA



FONTE: Adaptado de WILLIAMS, 1997

Legenda: HA, Hemaglutinina;
M1/M2, Matrix;
NA, Neuraminidase
NS, Proteína não estrutural,
vRNP, Ribonucleoproteína viral

TABELA 1 - SEGMENTOS DE RNA GENÔMICOS DOS VÍRUS INFLUENZA A E B E SUAS PROTEÍNAS CODIFICADAS

Segmento RNA	Proteína Codificada	Função da Proteína
1	PB2	Ligação ao RNA da célula hospedeira, transcrição de componentes do RNA.
2	PB1	Iniciação da transcrição, componente da transcriptase, possível endonuclease.
3	PA	Componente da transcriptase, alongamento do mRNA.
4	HA	Ligação do vírus à célula, glicoproteína de superfícies, trîmero, principal componente antigênico, antígeno alvo para CLT.
5	NP	Complexo componente da nucleoproteína, associado com cada segmento de RNA, componente da transcriptase, expresso sobre a superfície celular, antígeno alvo da CLT.
6	NA	Atividade neuraminidase, glicoproteína de superfície, tetrâmero.
7	M1	Proteína localizada sob a camada lipídica do envoltório.
	M2	Proteína não estrutural, antígeno alvo para CLT.
	M3	Pequeno polipetideo.
8	NS1	Proteína não estrutural, função desconhecida.
	NS2	Proteína não estrutural, função desconhecida.

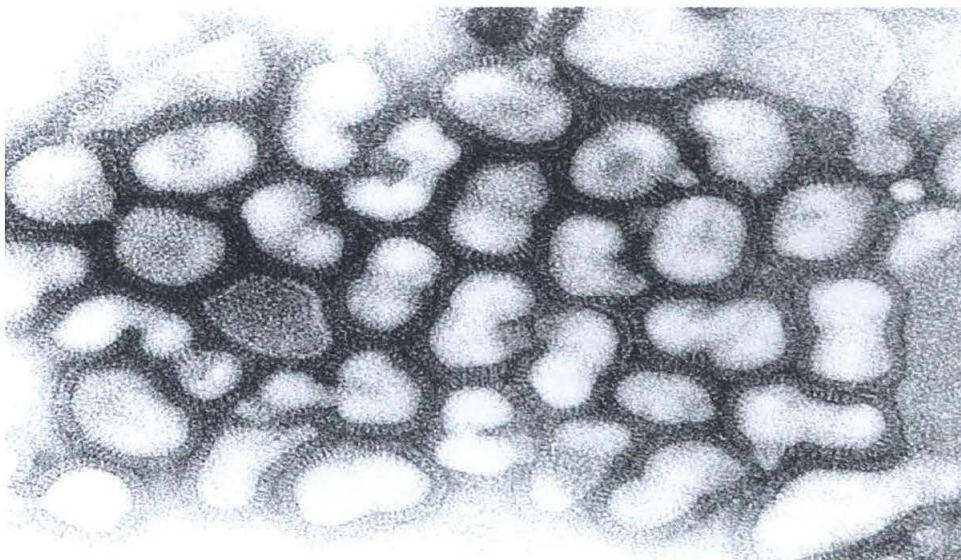
FONTE: CABRAL *et al.*, 1994.

FIGURA 2 – FORMAS FILAMENTOSAS DO VÍRUS INFLUENZA EM CULTURA CELULAR INICIAL, VISUALIZADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA



FONTE: CDC, www.vaccineinformation.org/photos/flu_cdc001.jpg

FIGURA 3 - FORMAS ESFÉRICAS DO VÍRUS INFLUENZA, CULTURA CELULAR, APÓS VÁRIOS SUBCULTIVOS, VISUALIZADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA



FONTE: CDC, www.vaccineinformation.org/photos/flu_cdc001.jpg

2.3 VARIABILIDADE ANTIGÊNICA

O principal objetivo de um micróbio não é ser replicado em seu hospedeiro tanto quanto possível, mas assegurar a perpetuação da sua progênie, por anos, décadas ou até centenas de anos. O grande obstáculo para estabelecer esta perpetuação é a dificuldade do escape a resposta imunológica do indivíduo. Com o objetivo de estabelecer sua sobrevivência, o vírus influenza utiliza diferentes estratégias de heterogeneidade antigênica (JONG *et al.*, 2000, p. 218).

Os vírus influenza caracterizam-se por sua habilidade em sofrer alterações antigênicas, que vão se acumulando ao longo do tempo. Estas variações são puntiformes, espontâneas e ocorrem na proporção de 1:104 a 1:103, por geração (CABRAL *et al.*, 1994).

A mais drástica mudança refere-se a uma alteração completa das glicoproteínas de superfície (HA, NA), por outro subtipo de vírus influenza,stando na introdução de um novo subtipo em uma população não protegida (SMIRNOV *et al.*, 1999, p.237-238).

A variabilidade antigênica do vírus influenza ocorre de duas formas: tendência antigênica ("antigenic drift") e mudança antigênica ("antigenic shift"), como exemplificado na figura 5. Mutações no genoma do vírus acontecem constantemente como resultado da baixa fidelidade da RNA polimerase RNA - dependente (replicase). Nestas mutações há a produção de muitos genótipos atenuados ou inviáveis, porém, se uma nova variante emergir possuindo alguma vantagem, sobreviverá e sua população se expandirá. A variação menor, tendência antigênica ("antigenic drift"), ocorre, quando o gene que codifica para antígenos da superfície viral, a NA e a HA, sofre mutações gradativas, na ocasião da replicação viral, e que se acumulam ao longo do tempo. Eventualmente as proteínas da partícula viral, tornam-se suficientemente diferentes e os anticorpos não são capazes de neutralizar os vírus, resultando em uma variante capaz de causar doença. A variação maior, mudança antigênica ("antigenic shift"), é menos freqüente e se caracteriza quando dois vírus diferentes, de duas espécies distintas, coinfectam um mesmo hospedeiro. Por rearranjo dos segmentos genômicos um novo vírus é criado contendo elementos dos vírus originais. Neste processo a patogenicidade do novo vírus torna-se imprevisível, pois, o mesmo, poderá não ter fatores de virulência ou ser altamente

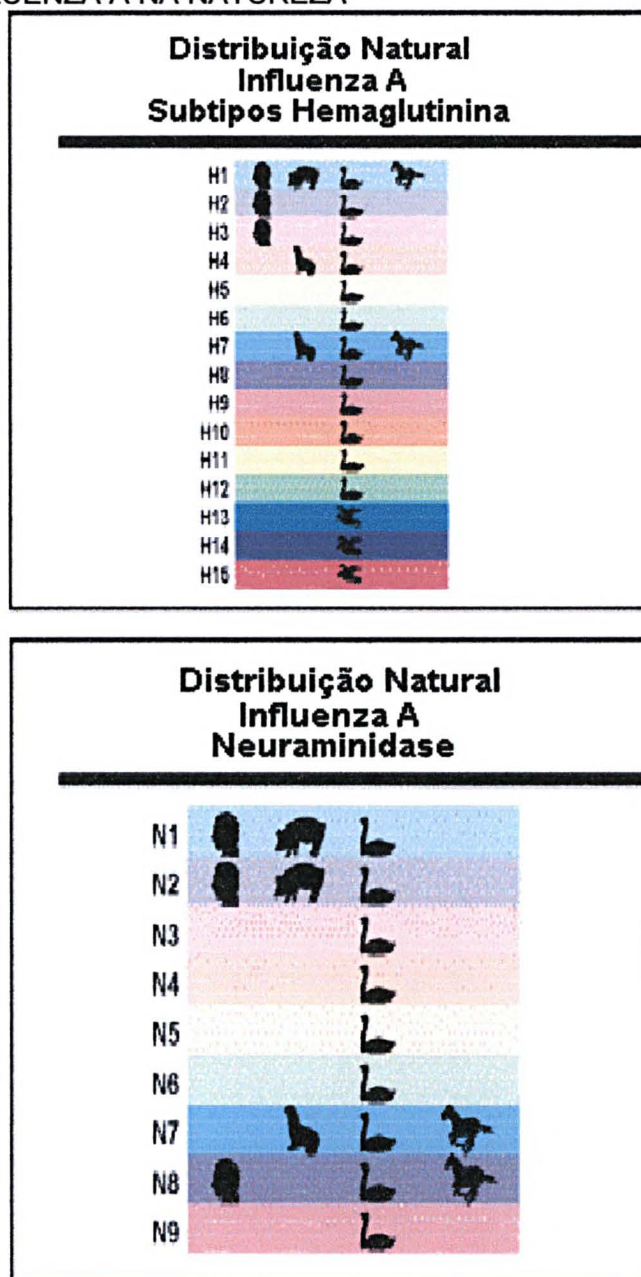
virulento. Este poderá ser responsável por nova pandemia (CABRAL, p.112, 1994; COUCH; KASEL, 1995; ZAMBON, 1999, p. 4; JONG, 2000).

Pássaros aquáticos são reservatórios naturais de todos os 15 subtipos do vírus influenza tipo A. Na figura 4 pode-se observar a ocorrência na natureza dos vários subtipos de acordo com seus hospedeiros. Até o momento foram identificadas 15 hemaglutininas e 9 neuraminidases de subtipos diferentes. Todos os subtipos foram isolados em aves, mas somente os subtipos H1N1, H2N2 e H3N2 estiveram associados com epidemias em humanos. Até o momento, não foram identificados subtipos de influenza B (COX; SUBBARAO, 2000, p. 407-408).

Estudos ecológicos levaram a hipótese de que, todos os vírus influenza de mamíferos derivaram de amostras aviárias de vírus influenza. Estas teorias têm suporte nas análises filogenéticas de seqüências de ácidos nucléicos dos vírus influenza do tipo A, em uma série de hospedeiros, de diferentes regiões geográficas e subtipos viral. Patos selvagens são os reservatórios naturais do vírus, estes são replicados preferencialmente em células do trato intestinal, não causando doença, sendo excretados em grande concentração nas fezes. Vírus influenza de aves já foram isolados de material fecal em águas de lagos, indicando que um grande número de patos jovens, infecta as águas através das fezes, especialmente nos períodos de migração. A natureza avirulenta da infecção por influenza aviária em patos, resulta em uma adaptação do vírus ao seu hospedeiro, por centenas de anos, criando-se assim um reservatório que assegura a perpetuação do vírus (WEBSTER, 1998, p. 436-437).

O ácido siálico, abundante nas células do trato respiratório é o receptor para os vírus influenza, especificamente pela ligação da hemaglutinina à cadeia lateral de oligossacarídeo nas células hospedeiras, que se apresenta, na posição α -2,3 em aviários, e α -2,6 em humanos. Os suínos podem ser infectados simultaneamente por cepas de vírus influenza aviárias e humanas, por possuírem receptores NeuA α 2,3 Gal e NeuAc α 2,6 Gal nas células do epitélio traqueal. Os suínos são desta forma considerados os reservatórios intermediários do vírus, onde ocorre o rearranjo genético originando um novo subtipo do vírus influenza A sendo potencialmente pandêmico (COUCEIRO; BAUM, 1994; COX; SUBBARAO, 2000; JONG *et al.*, p. 218-219; WAGNER; MATRSOVICH; KLENK, P. 160-161, 2002).

FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE HEMAGLUTININAS E NEURAMINIDASES DO VÍRUS INFLUENZA A NA NATUREZA



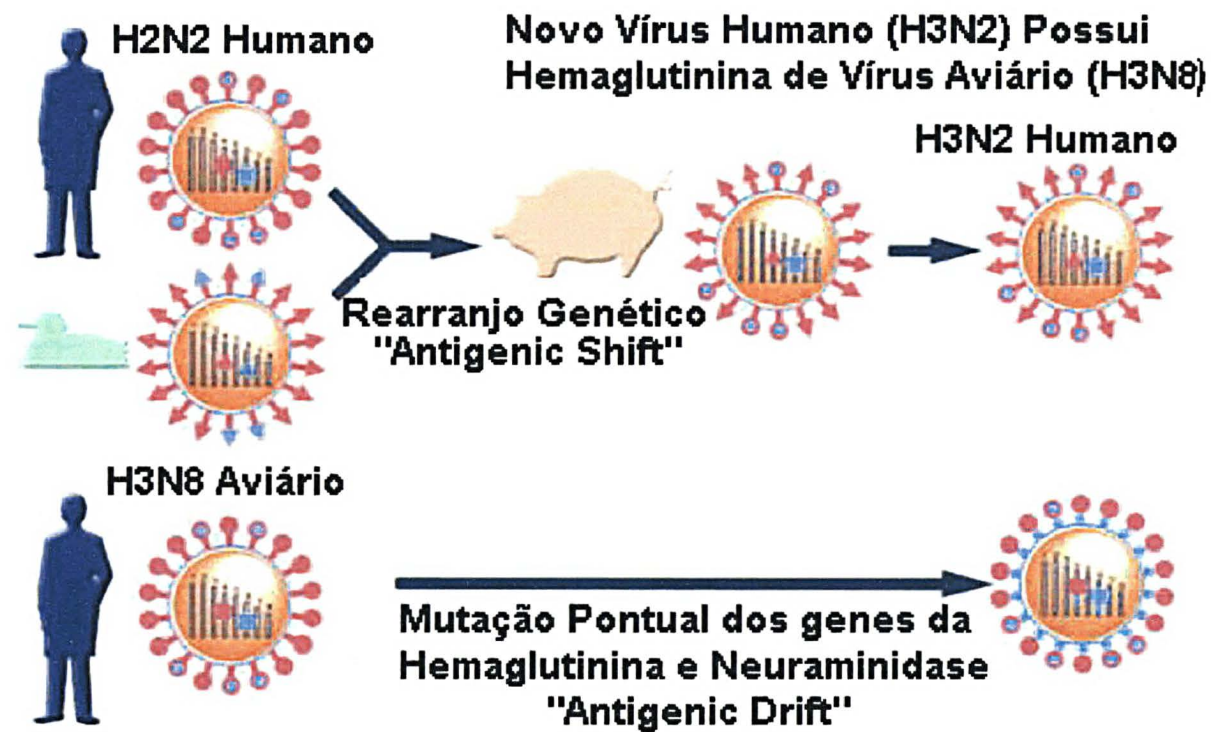
FONTE: Adaptado de: <www.glycoforum.gr.jp/science/world/gif0009/gd_a06e.jpg>

Legenda:

-  Humanos
-  Suínos
-  Pássaros Aquáticos
-  Focas
-  Eqüinos

FIGURA 5 - VARIABILIDADE DO VÍRUS INFLUENZA

Variação Vírus Influenza



FONTE: Adaptado de: www.glycoforum.gr.jp/science/world/gif0009/gd_a06e.jpg

2.4 NOMENCLATURA

De acordo com a OMS, a nomenclatura dos vírus influenza inclui o tipo antigênico A, B ou C, o hospedeiro de origem (exceto para isolados humanos), origem geográfica, número da linhagem, ano do isolamento, e para influenza A, os subtipos H e N. Como exemplo tem-se o isolado humano, A/Hong Kong/1/68 (H3N2) e o isolado de ave A/ganso/Ontário/6118/68 (H8N4) (CABRAL *et al.*, 1994, p. 110-111).

2.5 TRANSMISSÃO E INFECÇÃO

A transmissão ocorre através de secreções respiratórias, transportadas ao meio ambiente pela tosse ou espirros e transferidas para um novo hospedeiro. A infecção inicia-se nas células do epitélio traqueo-bronquial, onde se dá o primeiro ciclo de replicação viral em 4-6 horas. Alta viremia pode ser observada durante este período da infecção. O vestíbulo do nariz é delineado por células do epitélio escamoso e a nasofaringe por um epitélio composto por vários tipos celulares. Posteriormente tem-se uma zona estreita, composta de um epitélio de transição, seguida de uma zona de epitélio ciliado com numerosas células produtoras de muco (células globet). No nariz encontra-se um epitélio especializado, que permite conexão direta com o sistema nervoso e trato respiratório, sendo um caminho em potencial para a entrada do vírus naquele sistema (WRIGHT, 1997, p. 703-704; KAWAOKA *et al.*, 1989, p. 4603-4604; ZAMBON *et al.*, 1999, p. 5).

Fujimoto e colaboradores (1998), relatam encefalopatia aguda ou encefalite associada ao vírus influenza em um estudo multicêntrico, e seus resultados demonstram a presença de parte do genoma do vírus no sistema nervoso central.

O vírus penetra na célula por interação com os receptores da superfície da célula hospedeira e o material genético é internalizado. Os genes virais são transcritos e traduzidos pelas enzimas e ribossomos do hospedeiro. Assim o vírus tem a produção de todos os componentes da sua partícula, utilizando a maquinaria da célula hospedeira. O vírus reconstruído é eliminado da célula por brotamento levando uma porção da membrana da célula hospedeira. A patogenicidade da

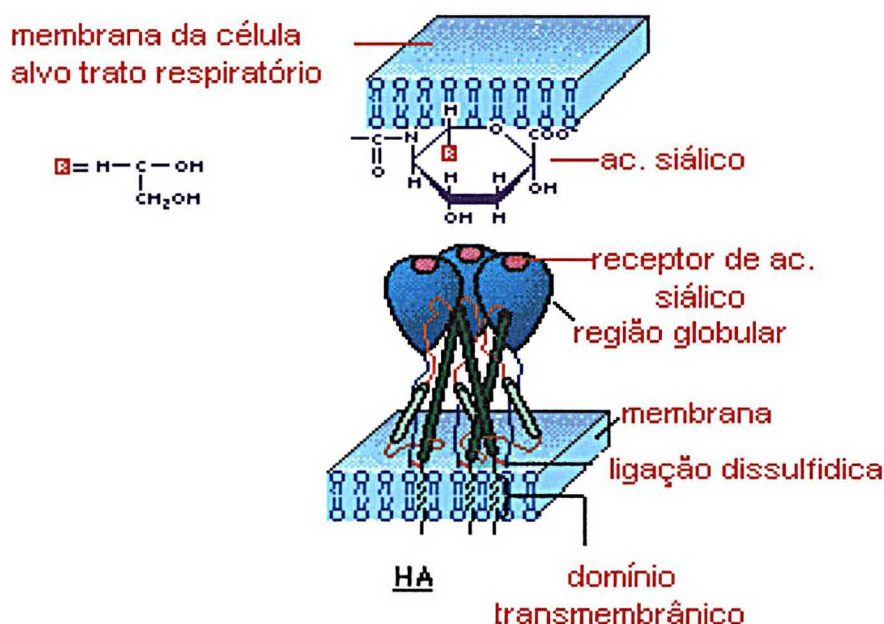
infecção pelo vírus em humanos não é completamente estabelecida e embora se conheça o determinante molecular de virulência, a questão, do porque um vírus é mais virulento que o outro, ainda é uma incógnita (KAWAOKA *et al.*, 1989, p. 4603-4604; WRIGHT, 1997, p. 703-704; ZAMBON *et al.*, 1999, p. 4-5; WILLIANS, 1997; COX; SUBBARAO, 2000, p. 407-408; JULKUNEN *et al.*, 2001, p. S33).

Na figura 6 está demonstrada a ligação entre o domínio globular da espícula de HA e o resíduo de ácido siálico. O vírus entra na célula em um mecanismo mediado por receptor e é capturado no endossoma. A bomba de prótons (Figura 7) no envelope (proteína M2) e na membrana do endossoma, é ativada, como resultado, o pH no interior do endossoma se aproxima de 5,0, este, tem dois efeitos. Primeiro, o canal de transporte de cátion, é ativado de maneira que os prótons movem-se para dentro do vírus, o que causa a liberação da vRNP para sua entrada no núcleo (Figuras 7, 8 e 9). O segundo evento acontece após a ativação da espícula proteica e mudança conformacional da HA, e para que ocorra é necessário na clivagem anterior da HA em HA1 e HA2, que contém, além do sítio de ligação, uma região peptídica que catalisa a fusão entre a membrana viral e do endossoma. Os três peptídios, com o domínio transmembrânico assumem configuração alternada, que move a terminação amina hidrofóbica de cada peptídeo de fusão do interior da espícula de HA e são projetadas para fora. O peptídeo de fusão é uma seqüência hidrofóbica encontrada na terminação amina de cada três peptídios transmembrânicos, que forma parte da estrutura do complexo da espícula de HA. A fusão entre o envelope viral e a membrana do endossoma resulta em uma conexão direta entre o interior da partícula viral e do citosol. Como resultado o ácido nucléico viral escapa para o citosol (Figura 8) (WILLIANS, 1997; COX; SUBBARAO, 2000, p. 407-408; JULKUNEN *et al.*, 2001, p. S33).

As vRNPs separam-se da proteína da matriz M1 e são transportados do endossomo para o núcleo da célula, durante a passagem pela vesícula endossomal, a estrutura com tamanho aproximado de 10-20nm, alcança aproximadamente 23 nm, sendo transportada através dos poros nucleares, para o núcleo. Os segmentos de RNA são fitas com senso negativo e não servem diretamente como mRNAs. Assim cada vRNP carrega um complexo trimérico de polimerase PA, PB1 e PB2 associado com a extremidade 5' terminal RNA (Figura 8). A cadeia simples de RNA, negativa, age como molde durante a replicação do RNA para a produção do mRNA,

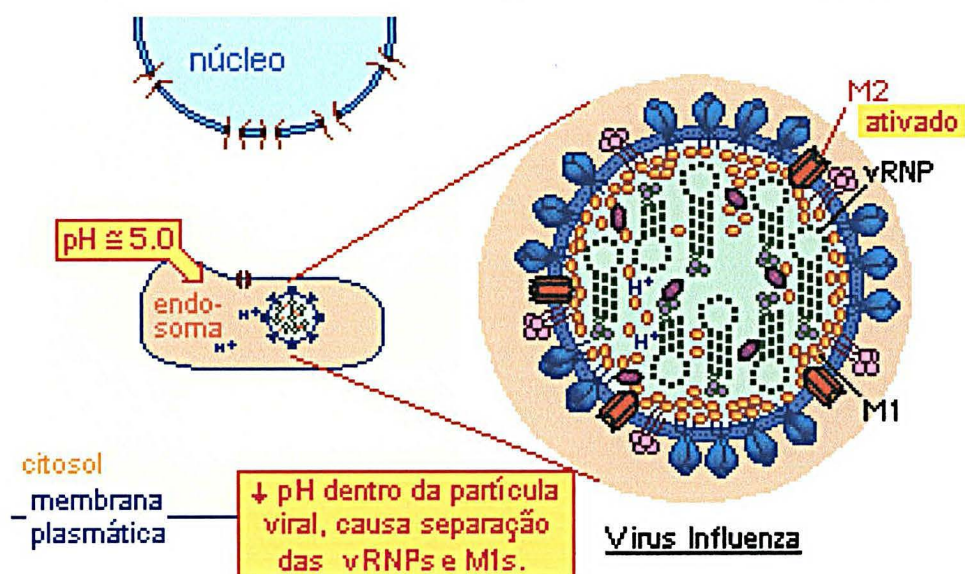
utilizando a RNA replicase. No núcleo da célula hospedeira, a polimerase viral cliva de 12 a 15 nucleotídeos, da extremidade 5' terminal de um mRNA ou pré-mRNA celular, através de um mecanismo de "snatched cap" (Figura 9), o oligonucleotídeo gerado será o iniciador para o alongamento e elaboração do mRNA viral. A síntese da proteína viral ocorre em dois estágios. Durante as primeiras 2-3 horas após a infecção, os mRNAs da nucleoproteína, que fazem parte da estrutura da ribonucleoproteína viral, as três polimerases e outras proteínas são exportadas do núcleo para o citosol por ribossomos livres, caracterizando uma infecção precoce (Figura 10). Estas voltam ao núcleo para a síntese de HA, NA, M1, M2 e NS2. Após a síntese de todas as proteínas no retículo endoplasmático, como oligômeros de dois ou mais polipeptídios, as mesmas são transportadas pelo complexo de Golgi até a membrana plasmática. Depois da formação da estrutura trimérica da HA, como outras proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático, estas proteínas do envelope, migram para a membrana celular, por meio de mecanismos de sinalização. As ribonucleoproteínas virais que acabam de ser elaboradas no núcleo são transportadas para a membrana plasmática a fim de formar as partículas virais, que são liberadas por brotamento, levando a membrana plasmática, para o exterior da célula (Figura 11) (KINGSBURY, 1991, p. 531-538; WILLIAMS, 1997).

FIGURA 6 - INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA, LIGAÇÃO COM O ÁCIDO SIÁLICO



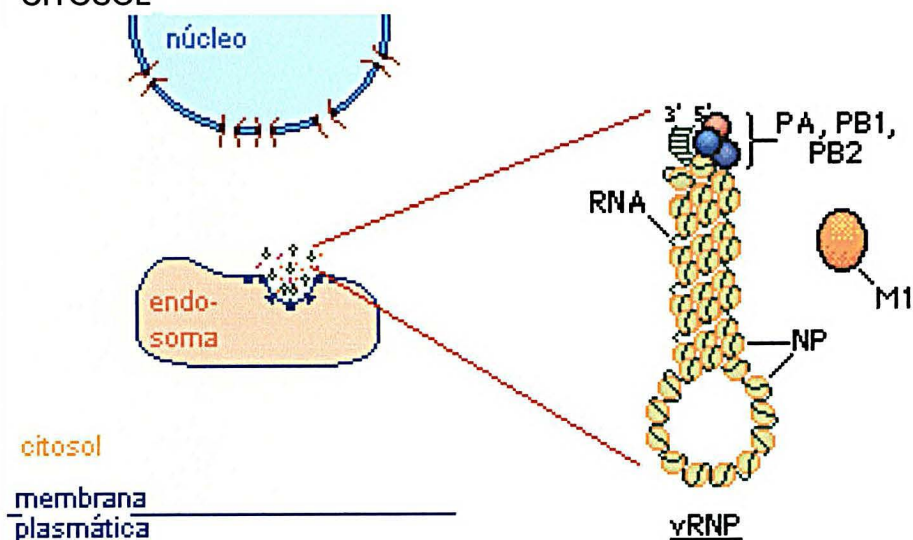
FONTE: Adaptado de WILLIAMS, 1997

FIGURA 7 - INFECCÃO PELO VÍRUS INFLUENZA, BOMBA DE PRÓTON (M2)



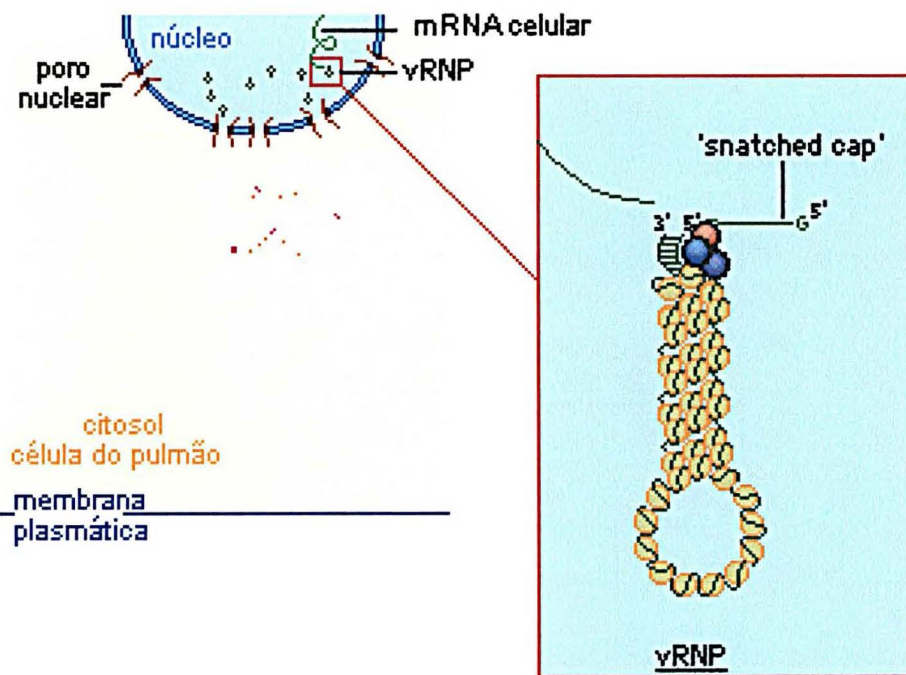
FONTE: Adaptado de WILLIANS, 1997

FIGURA 8 - INFECCÃO PELO VÍRUS INFLUENZA, LIBERAÇÃO DA vRNP PARA O CITOSOL



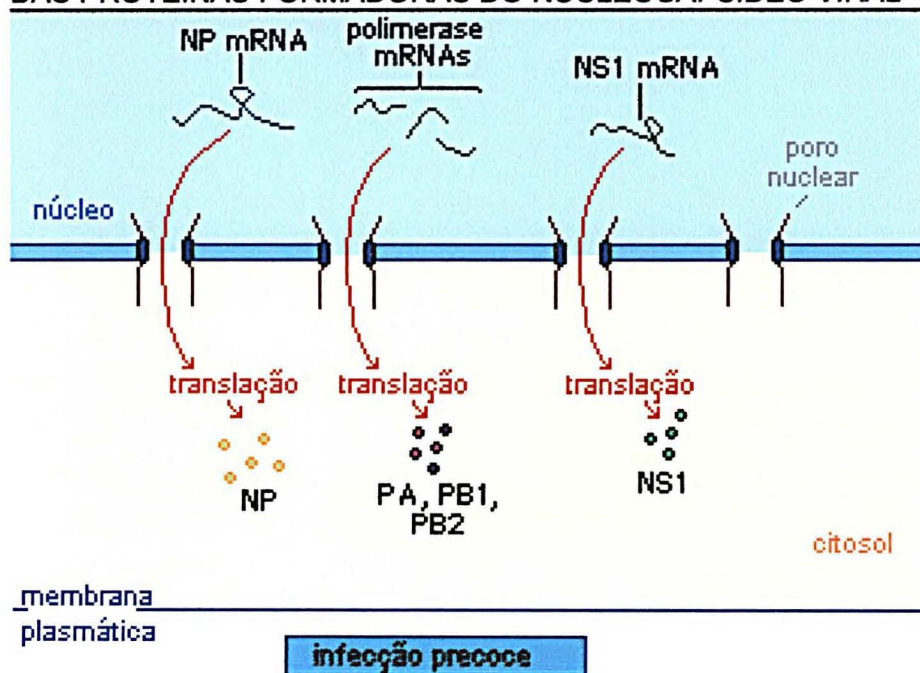
FONTE: Adaptado de WILLIANS, 1997

FIGURA 9 - INFEÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA, "snatched cap"



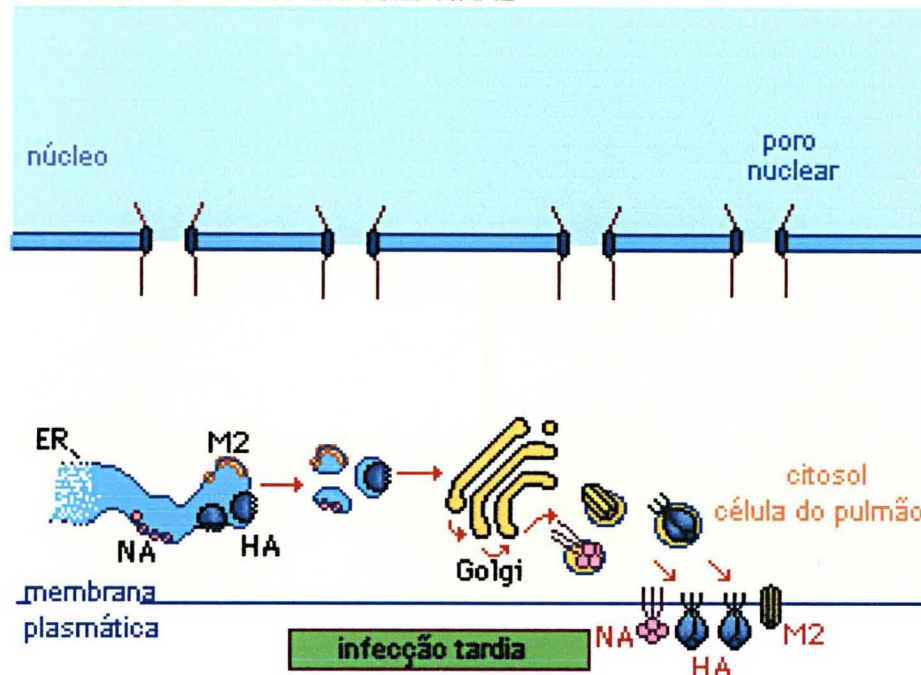
FONTE: Adaptado de WILLIAMS, 1997

FIGURA 10 – FASE PRECOZE DA INFEÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA: TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS FORMADORAS DO NUCLEOCAPSIDO VIRAL



FONTE: Adaptado de WILLIAMS, 1997

FIGURA 11 – FASE TARDIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA: FORMAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE VIRAL



FONTE: Adaptado de WILLIAMS, 1997

2.6 IMUNOLOGIA

A infecção natural ou a vacinação com o vírus influenza produz uma resposta imune humoral e secretória primária, das quais participam em forma seqüencial as imunoglobulinas IgM, IgG e IgA. As respostas destes anticorpos a cada um dos antígenos de superfície HA e NA e aos antígenos internos são eventos independentes. A resposta nos adultos é mais complexa, devido às reinfecções com os diferentes subtipos circulantes e pelo fenômeno da doutrina do pecado antigênico original, isto é, a resposta anamnésica de anticorpos, é superior àquela gerada durante a primeira exposição (KNEZ, 1991, p. 118-119). Os anticorpos anti-HA são neutralizantes e específicos da cepa, protegem contra sucessivas infecções com o mesmo vírus, prevenindo a enfermidade e a imunidade é duradoura. Os anticorpos anti-NA não são neutralizantes, são menos protetores e atuam diminuindo a transmissão da infecção, devido à função da NA, que está relacionada com o brotamento de novas partículas virais. Os anticorpos não previnem a infecção inicial (REID *et al.*, 2000, p. 6785).

Nas formas graves da infecção, anticorpos do tipo IgA são encontrados no soro e secreções nasofaríngeas, estes se mantêm durante 4-8 meses nas infecções moderadas e mais de 8 meses nos quadros graves e complicações por pneumonias (KNEZ, 1991, p. 118-119).

A infecção produtiva pelo vírus em células epiteliais leva a destruição de pré-mRNAs, inibindo as etapas translacionais dos mRNAs e morte das células hospedeiras, por mecanismos citolíticos ou apoptóticos. No entanto, durante a infecção, as células respondem de várias maneiras, tentando restringir o espalhamento do vírus. Vários fatores transcricionais são ativados, com produção de citocinas e quimiocinas. As quimiocinas, moléculas secretoras, possuem receptores em diferentes subpopulações de leucócitos e são produzidas de acordo com o tipo celular e estímulo. As quimiocinas produzidas na infecção pelo vírus influenza, preferencialmente favorecem o recrutamento de células inflamatórias ao sítio da infecção. As citocinas ativam um sistema de defesa antiviral, pela liberação de interferon α e β , ou citocinas proinflamatórias, como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), pelos macrófagos e células dendríticas (JULKUNEN *et al.*, 2001, S33-S35).

2.7 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Para o diagnóstico clínico da gripe, comumente, se utiliza uma série de sinais e sintomas, porém infecções por influenza ou outros vírus respiratórios e bactérias podem causar sinais e sintomas similares quando atingem o trato respiratório superior e a intensidade, gravidade e frequência dos sintomas podem variar. Padrões de influenza e resfriado comum são comparados na tabela 2.

O primeiro sinal de gripe é o início abrupto com febre, de 37,7 – 40,0 °C, seguido de tosse seca. A temperatura declina gradualmente, mas a febre persiste por mais de uma semana. Outros sintomas incluem calafrio, anorexia, cefaléia generalizada ou frontal, mialgia e artralgia severas, fraqueza e fadiga. Os sintomas podem predominar com odinofagia e tosse persistente não produtiva, com ou sem dor torácica substernal ou pleurítica. Os pacientes podem apresentar conjuntivites, dor ao movimentar os olhos, fotofobia e faringite não exudativa. A contagem de

leucócitos pode estar normal ou abaixo do normal. A radiografia do tórax revela infiltrados não agudos (MONTALTO, 2003, p. 111-112).

Crianças freqüentemente apresentam otite média, conjuntivite, faringite, produção de catarro e sintomas mais graves de infecção do trato respiratório superior, como crupe durante a fase aguda da infecção. A mais severa complicação é a pneumonia que se desenvolve em 1 – 2 dias e pode resultar em insuficiência respiratória e morte. Pacientes com doenças de base como doenças cardiovasculares, bronquite crônica, doença pulmonar obstrutiva ou asma tem grande risco de desenvolver gripe associada à infecção bacteriana. Pneumonia por bactérias usualmente inicia-se vários dias após o início dos sintomas e está associada com *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* ou *Estreptococos β hemíticos*. Por outro lado, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *Moraxella catarrhalis* são os patógenos comumente envolvidos nas otites média (JULKUNEN, 2001, S32).

TABELA 2 - COMPARAÇÃO GRIPE X RESFRIADO

APRESENTAÇÃO	GRIPE	RESFRIADO
QUADRO CLÍNICO	Sistêmico	Localizado (nariz/garganta)
INICIO DOS SINTOMAS	Abrupto	Gradual
FEBRE	Usualmente alta	Ausente/baixa
SINTOMAS	Calafrio, mialgia, queda do estado geral, tosse, dor de garganta.	Coriza, congestão nasal.
GRAU DE EXAUSTÃO	Importante	Leve ou moderado
EVOLUÇÃO	1 ou 2 semanas: comumente evolui com tosse, podendo estender-se	Rápida recuperação
COMPLICAÇÕES	Graves: ex: pneumonia	Leves/moderadas
OCORRÊNCIA	Sazonal: outono/inverno	Todo o ano

FONTE: Adaptado de MONTALTO, 2003.

2.8 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Em 1947, logo que foi instituída, a OMS criou um sistema de controle de âmbito internacional para fornecer um alerta assim que se detectasse uma epidemia de gripe (KOLATA, 2002, p. 109). Assim, se estabeleceu uma rede de vigilância que muito contribuiu para entender a epidemiologia do vírus e forneceu dados regulares para a formulação da vacina. Posteriormente foi elaborado o “WHO Global Influenza Programme”, que compila atividades prioritárias para reduzir a morbidade e mortalidade das epidemias anuais pelo vírus influenza, bem como, elabora um plano de contingência para a próxima pandemia. Estabelece ações para vigilância e controle no âmbito nacional e internacional. O Center of Disease Control (CDC) mantém informações semanais sobre a ocorrência dos vírus no mundo. Nas tabelas 3 e 4, descreve-se a ocorrência do vírus influenza no século XX (EUA, WHO Global Influenza Programme, 2002; EUA, CDC Weekly Report).

No Brasil, alguns estudos têm sido realizados, demonstrando a incidência e importância do impacto das viroses respiratórias na nossa população.

A devastadora, “gripe espanhola”, de 1918, também acometeu o Brasil, sendo chamada de “La dansarina”. Chegou ao Brasil em Recife, trazida pelo navio Demerara, que viera do continente Europeu, expandindo-se para o restante do país. O impacto da gripe espanhola foi igualmente devastador como no restante do mundo, sendo descrito por Brito, (1977), “... a cidade foi progressivamente paralisando até ganhar um ar sepulcral”.

No período de 1980-1981 foi realizado um estudo virológico e sorológico no Rio de Janeiro, onde, se analisou 592 espécimes clínicos, sendo encontradas 8 amostras positivas para o subtipo H3N2, 7 em crianças abaixo de 5 anos e 1 adulto. No mesmo estudo, o vírus do tipo B foi isolado no ano de 1981 (NASCIMENTO *et al.*, 1984).

Outro estudo também realizado no Rio de Janeiro, em um período de quatro anos, relata a incidência do vírus influenza do tipo A e B, em crianças com idade abaixo de 5 anos, demonstrando uma incidência variável de ano para ano de 1-11% (NASCIMENTO *et al.*, 1991).

Um inquérito soropidemiológico, para detectar a prevalência de anticorpos para os sorotipos do vírus influenza foi realizado em Belém, Estado do Pará, no período de 1992-1993. Foram detectadas altas taxas de prevalência de anticorpos aos subtipos de influenza tipo A H1N1, H3N2 e B, em todas as faixas etárias (SANTOS; CARDIAS; MELLO, 1997).

Em Fortaleza, Estado do Ceará, observou-se uma incidência de 5,7% para os vírus influenza em um estudo com 63 famílias da zona urbana, onde analisaram-se cento e setenta e cinco crianças (ARRUDA *et al.*, 1991).

Realizou-se no Rio de Janeiro uma análise sorológica para o vírus influenza tipo C, por meio da metodologia de inibição de hemaglutinação, registrando-se um percentual significativo de 56,7% de indivíduos que apresentaram anticorpos contra o vírus (MOTTA; LUIZ; COUCEIRO, 2000).

Foi registrado na cidade de Iporanga, estado de São Paulo, um surto de doença respiratória aguda, no período de junho e julho de 1999, onde foram notificados 324 casos, sendo que o vírus influenza, subtipo H1N1, foi isolado em 57,1% deles. Este surto acometeu indivíduos de todas as faixas etárias, porém entre 50-60 anos, foi identificado somente um paciente de 52 anos, não vacinado, concluindo-se que houve uma cobertura vacinal eficaz nessa faixa etária (PAIVA *et al.*, 2001).

Um outro estudo foi realizado no estado do Rio Grande do Sul, com o objetivo de demonstrar etiologia viral, nas doenças respiratórias agudas, em crianças atendidas nos serviços de emergência, ambulatório e crianças hospitalizadas. Os autores demonstraram que o vírus influenza estava envolvido em 1,7% daquelas infecções (STRALIOTTO *et al.*, 2002).

No ano de 2003, foi registrada no Brasil, nas regiões sudeste e centro oeste a circulação de uma variante da B/Victoria/2/87 a B/Hong Kong/330/2001. Observou-se uma alta incidência dessa variante em crianças menores de 4 anos, porém, esta foi menor entre os pacientes maiores de 60 anos, atribuindo-se este fato a uma proteção adquirida pela circulação da estirpe B/Victoria/2/87 que circulou nas Américas em 1990-1991. Explicando-se desta forma a incidência mais elevada em crianças menores de dez anos, que não desenvolveram anticorpos à estirpe que circulou em 1990-1991 (PAIVA *et al.*, 2003).

Em estudo desenvolvido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, envolvendo pacientes transplantados de medula óssea, no período de março de 1993 a agosto de 1999, relatou-se um envolvimento de agentes virais em 17% dos pacientes, com sinais e sintomas de infecção respiratória aguda. Sendo que os vírus influenza foram responsáveis por 38% das infecções. A taxa de mortalidade foi de 37%, sendo maior nos pacientes infectados pelo vírus influenza do tipo A e adenovirus (RABONI *et al.*, 2003).

Um estudo longitudinal e prospectivo, em crianças menores de 2 anos que apresentavam infecção respiratória aguda alta, foi realizado em Salvador, estado da Bahia. O estudo teve como objetivo determinar a frequência, sazonalidade e alguns padrões clínicos da infecção. Observou-se nesse estudo, uma incidência de 6% para os vírus influenza e uma sazonalidade que coincidiu com os meses de maior índice pluviométrico (SOUZA *et al.*, 2003, p.184-191).

Todos esses achados demonstram a grande importância de se determinar os padrões de incidência, sazonalidade e de clínica associados às taxas de morbidade e mortalidade, devidas às infecções pelos vírus respiratórios na nossa população.

TABELA 3 - PANDEMIAS CAUSADAS PELOS VÍRUS INFLUENZA NO SÉCULO XX

ANO	NOME /SUBTIPO	FONTE	IMPACTO
1918	Gripe Espanhola (Vírus H1N1 semelhante a suíno)	Possivelmente emergiu hospedeiro suíno ou aviário de um H1N1 mutante	Pandemia mundial com >20 milhões de mortes
1957	Gripe Asiática (H2N2)	Possivelmente rearranjo de H1N1 animal com humano e cepa aviária da Ásia	Pandemia, desaparecimento de H1N1
1968	Gripe de Hong Kong (H3N2)	Provavelmente rearranjo de cepa animal com humano H2N2 e aviária H3Nx da Ásia	Pandemia, desaparecimento de H2N2
1977	Gripe da Rússia (H1N1)	Desconhecida. Cepa idêntica à humana de 1950. Reparecimento da cepa China e Sibéria	Pandemia benigna, primeiro envolveu pessoas nascidas depois de 1950 H1N1, cocirculação com H3N2 em humanos desde 1977.

FONTE: Adaptado de: www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no2/snacken.htm2.10

TABELA 4 - INCIDENTES LIMITADOS CAUSADOS PELOS VÍRUS INFLUENZA NO SÉCULO XX

ANO	NOME /SUBTIPO	FONTE	IMPACTO
1976	Gripe suína	EUA/New Jersey. Vírus suíno	Localizada em campo militar, com 1 morte.
1986	H1N1	Holanda. Vírus suíno derivado de fonte aviária.	Paciente com pneumonia grave
1988	Gripe suína	EUA/Wiscosin. Gripe suína	Mulher grávida morre após exposição a animal doente
1993	H3N2	Holanda. Rearranjo entre cepa humana antiga H3N2 (1973/75-like) e aviária H1N1	2 crianças com doença grave. Pais acham ter transmitido aos filhos após exposição com suínos.

FONTE: Adaptado de: www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no2/snacken.htm2.10

2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os métodos rotineiros para a detecção dos vírus influenza humano incluem o isolamento viral, detecção de antígenos por imunofluorescência, sorologia e mais recentemente métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (FOUCHIER *et al.*, 2000, p. 4100).

A infecção pelo vírus influenza, na maioria das vezes, apresenta-se de uma maneira branda e que se resolve em uma ou duas semanas, porém pode estar associado a complicações do trato respiratório alto ou baixo, especialmente em idosos e indivíduos com doenças crônicas, podendo ser fatal. O diagnóstico clínico realizado pelo médico é difícil e diferentes patógenos podem produzir doenças respiratórias com os mesmos sintomas. Conseqüentemente, existe a necessidade de técnicas diagnósticas sensíveis para a confirmação do diagnóstico clínico. Na tabela 5, apresentam-se várias metodologias laboratoriais, que atualmente estão disponíveis para o diagnóstico, entretanto e cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens (ELLIS; ZAMBON, 2002, p. 375).

2.9.1 Cultivo Celular

Madin Darby Canine Kidney (MDCK) são células epiteliais protótipo para o crescimento do vírus influenza (HERRMANN, *et al.*, 2001, p. 134). Tradicionalmente, o isolamento dos vírus respiratórios, tem sido realizado, utilizando-se várias linhagens celulares em tubos de cultura convencionais. Este método é considerado “padrão ouro” para o diagnóstico de infecções do trato respiratório. Tipicamente, os tubos de cultura são conservados por 14 dias, e monitorados para a presença de replicação viral por hemadsorção e hemaglutinação. As desvantagens da técnica incluem o longo período de incubação, trabalho árduo durante a manutenção dos tubos e a exigência de um profissional treinado (OLSEN *et al.*, 1993, p. 422; COVALCIUK; WEB; CARLSON, 1999, p. 3971; MITNAUL *et al.*, 2000, p. 6015; NOYOLA *et al.*, 2000, p. 1161).

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA

Método	Tipo de Amostra	Custo Por teste (£)	Rapidez ^a	Número de amostras ^b	Vantagens	Desvantagens
Cultura (CC e SV)	ANF BAL Swab Nasal	£10-£20	3-7 dias	Baixo	Avaliação da partícula viral inteira Recuperação do vírus	Tempo Requer viabilidade viral
IFI	ANF BAL Swab Nasal	£10	2h – 1dia	Médio	Rapidez Não requer viabilidade viral	Requer células intactas Não recupera partícula viral Requer equipamento especial
EIA	ANF BAL Swab Nasal	£5-£30	15 min. -1 dia	Alto	Rapidez	Custo Não recupera partícula viral
RT-PCR	ANF BAL Swab Nasal Material pós-mortem	£30-£50	1-2 dias	Alto	Sensível Permite análises moleculares avançadas	Custo Não recupera partícula viral Equipamento especial
Sorologia HI/CFT ^c	Soro	£5	2 dias	Alto	Sensível específico	Necessita de análise de 2 amostras pareadas

FONTE: Adaptado de ELLIS; ZAMBON, 2002.

LEGENDA: ANF: Aspirado de Nasofaringe; BAL: Lavado Bronco Alveolar, CC: Cultura Convencional; EIA: Enzimaimunoensaio; IFI: Imunofluorescência; HI: Inibição de Hemaglutinação; CFT: Fixação de Complemento, RT-PCR: Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase; SV: Shell Vial.

NOTAS: ^aTempo de análise da amostra desde a coleta.

^bTotal de amostra incluídas em um teste.

Atualmente, padronizou-se a técnica de cultura celular por centrifugação rápida, comumente chamada de "shell vial" (SV). A utilização do SV, minimiza as desvantagens do cultivo convencional. A técnica consiste na conservação das linhagens celulares que formam a monocamada de células confluentes, em lamínulas, as quais estão introduzidas em tubos com tampa de rosca e possíveis de serem centrifugados. A amostra é inoculada no referido tubo, este é centrifugado e após 24 a 48 horas de incubação já se obtém o resultado da replicação viral. O método de SV está sendo amplamente utilizado, apresentando uma boa sensibilidade, quando comparado com os cultivos celulares convencionais. As vantagens descritas são o tempo utilizado para a obtenção do resultado, bem como, a facilidade na aplicação da metodologia (OLSEN *et al.*, 1993, p. 422-425; NAVARRO-MARI *et al.*, 1999, p. 2346-2347; MEQDAM; NASRALLAH, 2000, p. 518-523; MAITREYI, *et al.*, 2000, p. 41-47; MEQDAM; NASRALLAH; AL-SHURMAN 2001, p. 59-65).

2.9.2 Imunofluorescência

Consiste na utilização de anticorpos monoclonais e conjugados específicos, resultando em uma avaliação rápida, que permite identificar vírus diretamente na amostra clínica e cultura celular (MAGNARD *et al.*, 1999, p. 215-220; NOYOLA *et al.*, 2000, p.1161-1165; IRMEN, *et al.*, 2000, p.396-403).

Um número significativo das doenças respiratórias é devido a infecções virais. A decisão de usar antibióticos ou agentes antivirais, se baseia não somente no diagnóstico clínico, mas também no diagnóstico laboratorial rápido. A sensibilidade e especificidade do procedimento de imunofluorescência, comparado com cultura por SV são de aproximadamente 85% e 87%, respectivamente; se comparado à cultura convencional é de 69% e 97% respectivamente. O teste é prático e eficiente para a identificação dos diferentes vírus respiratórios em células de aspirado de nasofaringe (ANF) (UEDA *et al.*, 1998, p. 343-344; IRMEN *et al.*, 2000, p.396-403).

2.9.3 Técnicas de Biologia Molecular para Caracterização dos Vírus Influenza

Técnicas de PCR têm sido desenvolvidas para a detecção específica e subtipagem do vírus influenza. São técnicas de alta sensibilidade e especificidade, porém são metodologias difíceis de implementar na rotina dos laboratórios (van ELDEN *et al.*, 2001, p. 199-200; SCHWEIGER *et al.*, 2000, p. 1552). Diferentes metodologias moleculares foram padronizadas para a aplicação na investigação do vírus influenza (COOPER; SUBBARAO, 2000; FUJIMOTO *et al.*, 1998; HERRMAN; LARSSON; ZWEYGBERG, 2001).

A metodologia de transcrição reversa multiplex por PCR, que envolve a amplificação simultânea de mais de uma seqüência alvo, em um único tubo de reação, utilizando mais de um iniciador, combina sensibilidade e rapidez. A técnica permite identificar cepas circulantes, podendo estabelecer rapidamente importantes informações às autoridades de saúde, o que facilita uma apropriada vacinação e tratamentos profiláticos em pacientes de risco (ELLIS; FLEMING; ZAMBON, 1997, p. 2076-2082; GRONDAHL *et al.*, 1999, p. 1-7).

Aves migratórias e águas contaminadas pelas fezes desses animais são os reservatórios naturais do vírus influenza. Pensava-se que os vírus influenza de origem aviária só eram transmitidos ao homem por coinfeções ou rearranjos genéticos de aves e suínos, porém, o evento zoonótico acontecido em Hong Kong, pela combinação dos subtipos H5N9 e H9N2, sugere que os vírus influenza aviários estão sendo transmitidos diretamente ao homem. O fenótipo e a heterogeneidade do vírus aviário ou suíno podem resultar em um exame falso negativo, pelas técnicas usuais. A metodologia de PCR utilizando como alvo, genes da “matrix”, conferem sensibilidade, especificidade e são aplicáveis a todas variantes genéticas do vírus influenza A (FOUCHIER; BESTEBROER; HERFST, 2000, p. 4096-4101). A metodologia, que utiliza enzimas de restrição, pode também ser utilizada para avaliar e distinguir as seqüências genômicas dos vírus influenza, tanto em humanos quanto em aves (COOPER; SUBBARAO, 2000, p. 2579-2583).

A técnica diagnóstica alternativa, padronizada recentemente é a PCR em tempo real, ensaio rápido que permite a detecção simultânea de subtipos diferentes do vírus em amostras clínicas. O método gera resultados em 4 a 5 horas e não requer nenhum procedimento pós-PCR, com a vantagem de medir o número de

cópias virais. A metodologia consiste na utilização de iniciadores e sondas do vírus influenza, selecionada pelo “software Primer Express” (PE Applied Biosystems), baseados em regiões conservadas de vários subtipos e genótipos do vírus influenza A (gene da proteína da matrix) e vírus influenza B (gene segmento da hemaglutinina). A amplificação e detecção dos produtos são realizadas com equipamento automatizado, durante a amplificação ocorre um monitoramento quantitativo da amplificação por PCR através de emissões de compostos fluorescentes. A quantificação por PCR em tempo real auxilia no manejo clínico e avaliação da terapia antiviral (van ELDEN *et al.*, 2001).

A tecnologia de “microchip arrays” revolucionou o estudo da expressão gênica em diversos organismos, sua aplicação é uma ferramenta diagnóstica promissora, visto que permite a detecção simultânea de centenas, milhares de seqüências de ácidos nucléicos, porém, os altos custos ainda são fatores limitantes para o desenvolvimento e aplicação desta tecnologia (LI; CHEN; EVANS, 2001, p. 696-704).

2.9.4 Inibição de Hemaglutinação

O princípio do teste, inibição de hemaglutinação (HI) é medir por diluição seriada, o nível de anticorpos que inibem ou podem prevenir a hemaglutinação pelas hemaglutininas virais que se ligam aos receptores dos eritrócitos susceptíveis. O teste é realizado em placas de plástico para microtitulação com fundo em “V” ou “U”, de acordo com a origem do eritrócito utilizado (CHERNESKY, 1996)

Os métodos diagnósticos para o vírus influenza requerem sensibilidade e rapidez. Diferentes amostras podem ser utilizadas, porém a sensibilidade do teste depende da amostra coletada, bem como, transporte, adequados. Em cada laboratório, a escolha da técnica para o diagnóstico do vírus influenza, deve ser avaliada de acordo com os equipamentos disponíveis, o custo de reagente, o número de técnicos habilitados, a sensibilidade do teste, as prioridades do laboratório e o objetivo da pesquisa (COVALCIUC; WEBB; CARLSON, 1999, p. 3973; MAGNARD, 1999, p. 219).

2.10 PREVENÇÃO E CONTROLE

Nos períodos de circulação, do vírus influenza, observam-se altas taxas de morbidade e mortalidade, com relatos de complicações em todo o mundo. A doença acomete pacientes de todas as faixas etárias, porém os indivíduos entre as idades extremas, crianças e idosos maiores de 60 anos, apresentam maiores taxas de complicações (BRIDGES *et al.*, 2003).

A utilização da vacina tríplice viral é o método mais eficaz para prevenção e controle da infecção e suas complicações. A vacinação está associada a uma diminuição das taxas de visitas aos sistemas de saúde, ausência ao trabalho e risco de crianças desenvolver otite média, bem como, das taxas de morbidade e mortalidade entre os grupos de maior risco de desenvolver complicações pelo vírus (BRIDGES, 2000; COX; SUBBARAO, 2000; BRIDGES, 2003; NEUZIL, GRIFFIN; SCHAFFNER, 2001).

O “Advisory Committee on Immunization Practices”, é o órgão que preconiza e recomenda a utilização anual da vacina. Segundo o comitê, os grupos primariamente eleitos para a utilização da vacina são aqueles pacientes, com risco de desenvolver complicações, ou seja, 1) pessoas com mais de 65 anos ou de qualquer idade que apresentam doenças de base, como doenças crônicas pulmonares, cardiopatias; 2) indivíduos com idade entre 50-64 anos, que geralmente apresentam doenças crônicas; 3) pessoas que convivem com pacientes de alto risco, que são potenciais transmissores e 4) profissionais da área da saúde. Algumas recomendações para o período de 2003-2004 incluem, o estabelecimento da data ótima para vacinação e todos os esforços devem ser voltados para a vacinação daqueles pacientes de alto risco, para evitar o desenvolvimento de complicações. Deve-se encorajar a utilização da vacina, em crianças saudáveis de 6-23 meses de idade e aquelas de grupo de risco, uma vez que, estas estão sujeitas a desenvolver complicações. A vacina tríplice de vírus inativado para o período de 2003-2004 para o hemisfério Sul, é composta pelas cepas A/Moscow/1099 H3N2-like, A/New Caledonia/20/99 [H1N1]-like e B/Hong Kong/330/2001-like antígenos. O limite de timerosal foi reduzido, incluindo 0,25 mL para cada dose (BRIDGES, 2001).

A composição da vacina é avaliada anualmente de acordo com os subtipos que circulam a cada estação de influenza. Historicamente a vacina foi padronizada

nos EUA utilizando-se como unidade o título de aglutinação com hemáceas de galinha. Desde 1980-1981 a unidade utilizada é de microgramas de HA, e a dose recomendada é de 15µg de cada HA por 0,5 mL. A vacina pode conter toda a partícula viral ou um subvirion, o que resulta em uma diminuição do efeito colateral, esta é indicada para uso em crianças (BRIDGES, 2003; CDC, Vaccine Information for the Public and Health Professionals, 2003).

A eficácia da vacina é variável de acordo com a faixa etária e a similaridade das cepas utilizadas na vacina com a que está circulando. Relata-se que para adultos jovens, quando há similaridade entre as cepas, a eficácia é de 70-90% (BRIDGES, 2003).

2.11 OUTROS VÍRUS COMO AGENTES ETIOLÓGICOS EM INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS

Os vírus são classificados como os agentes mais freqüentes nas infecções respiratórias em crianças, em países desenvolvidos. Para pacientes imunossuprimidos, as viroses respiratórias são as principais causas de complicações. Adicionalmente, esses vírus em adultos, são responsáveis, por uma porcentagem de visitas a consultórios médicos, dias de ausência ao trabalho utilização de serviços de emergência e eventualmente, hospitalizações. Os vírus que comumente circulam nessas populações incluem o vírus sincicial respiratório, vírus parainfluenza, adenovirus (IRMEN; KELLEHER, 2000; KIM; LEE; LEE, 2000; GREENBERG, 2002; ISON; HAYDEN, 2002).

Os surtos, de vírus sincicial respiratório (RSV), são coincidentes com as estações do vírus influenza, porém, ocorrem precocemente, com picos de incidência no inverno e primavera nas regiões temperadas, sendo o agente etiológico mais freqüentemente envolvido nas pneumonias e bronquiolites em crianças. O vírus também é descrito como a maior causa no aumento das taxas de morbidade e mortalidade em transplantados (GILCHRIST *et al* 1994 ; BOYCE *et al.*, 2000; ISON; HAYDEN, 2002)

Os vírus parainfluenza podem causar resfriados, crupe, bronquiolites e pneumonia viral. Há relatos de que os vírus parainfluenza (PIV) são responsáveis

anualmente por um terço das infecções respiratórias em crianças com menos de 5 anos. Pode acometer indivíduos imunossuprimidos em uma proporção de 2 a 5 % causando complicações graves e em casos de receptores de órgãos sólidos pode levar a rejeição. Em um estudo relata-se que o PIV em transplantados de medula óssea foi responsável por 46% das pneumonias e a taxa de mortalidade nestes pacientes foi de 37% (RABELLA *et al*, 1998; KIM; LEE; LEE, 2000; ISON; HAYDEN, 2002).

Os adenovirus apresentam um genoma composto por ácido desoxiribonucleico (DNA), produz três tipos de infecção a nível celular: infecção lítica, infecção latente em células linfóides e transformação oncogênica. O vírus apresenta-se em vários tipos e pode infectar diferentes tipos celulares. Os adenovirus podem produzir doenças respiratórias do trato inferior em todas as estações do ano, porém observa-se aumento incidência no inverno. A taxa de incidência em pacientes transplantados de medula óssea pode variar de 3 – 29%, e em pacientes receptores de órgãos sólidos a taxa é de 5 – 10%. Nesses pacientes a mortalidade está associada com pneumonia viral e doença disseminada (RABELLA *et al*, 1998; KIM; LEE; LEE, 2000; ISON; HAYDEN, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar antigenicamente cepas dos vírus influenza circulantes na cidade de Curitiba.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a incidência do vírus influenza em pacientes com “influenza like illness” na Cidade de Curitiba, no período de 2000 a 2003.
2. Determinar a sazonalidade do vírus influenza na cidade de Curitiba.
3. Identificar as variantes antigênicas do vírus influenza, no período do estudo e a cada ano.
4. Avaliar e divulgar dados epidemiológicos, para que sirvam de base na adoção de medidas preventivas e terapêuticas no controle da doença, pelos serviços de saúde.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA E AMOSTRAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexo 1).

O material utilizado foi aspirado de nasofaringe (ANF) ou lavado bronco alveolar (BAL) em alguns casos. A amostra, para ser incluída no estudo, deveria apresentar uma quantidade de 1 mL., para conter um número de células adequadas para as pesquisas, por apresentarem volume insuficiente, sessenta e seis amostras foram excluídas do estudo.

Foram coletadas 1348 amostras de 971 pacientes do Hospital de Clínicas da UFPR. Esses foram agrupados em: imunossuprimidos, dos quais, coletou-se 666 amostras, de 372 pacientes atendidos no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e hospitalizados, dos quais, coletou-se 682 amostras, de 599 pacientes essencialmente dos serviços de pediatria como, infectologia, emergência e unidade de terapia intensiva, e os pacientes apresentavam sinais clínicos compatíveis com infecções respiratórias. As amostras foram coletadas de indivíduos de todas as faixas etárias e sem restrição de sexo.

Duzentas e setenta e seis amostras, foram coletadas de pacientes ambulatoriais atendidos nas unidades de saúde, da rede do Serviço de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba. Para estes, foi utilizada a Ficha Clínica Viroológica (Anexo 2) para a coleta dos dados epidemiológicos e de vacinação elaborada pelo Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica do Vírus Influenza, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Para a avaliação clínica, a presença da sintomatologia “*flu-like*” (febre, coriza, obstrução nasal, odinofagia, otalgia, mialgia e artralgia), foi o critério de seleção, sendo que, o paciente deveria apresentar pelo menos, febre, um sinal respiratório e um sistêmico. Não houve restrição de sexo e idade para estes pacientes (BRASIL, Projeto Vigilância Epidemiológica da Influenza no Brasil, 1999).

Para efeito da análise dos resultados foi considerada a densidade de incidência de amostras, visto que, no grupo de pacientes imunossuprimidos e hospitalizados foram coletadas mais de uma amostra por paciente seguindo os critérios de inclusão, entretanto, para os pacientes ambulatoriais o número de pacientes foi igual ao número de amostras.

O ANF foi obtido com a utilização de sonda de aspiração traqueal número 6 ou 8, ou sonda nasogástrica curta número 8. A sonda foi conectada a um equipo de macrogotas de infusão de soro, acoplados a um aspirador portátil ou de parede (vácuo).

A sonda foi introduzida alternadamente nas duas narinas até a nasofaringe, como demonstrado na figura 12, aproximadamente 15 cm, aspirando-se mais de 1 ml de secreção. Nas situações em que havia secreção espessa ou escassa, foram instiladas 1 a 2 gotas de solução salina isotônica estéril, com a finalidade de fluidificar a secreção e facilitar a aspiração (GARDNER; McQUILLIN, 1968, p. 340-341).

O material coletado foi acondicionado no próprio equipo, bem vedado para proteger o material de contaminação, bem como do operador. A amostra foi identificada e transportada imediatamente em isopor com gelo ao Laboratório de Virologia do HC-UFPR. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C e foram processadas num período máximo de 4 horas após a coleta (COVALCIUCK; WEB; CARLSON, 1999).

As amostras de lavado broncoalveolar foram coletadas nas clínicas de internamento.

FIGURA 12 - COLETA DO ASPIRADO DE NASOFARINGE



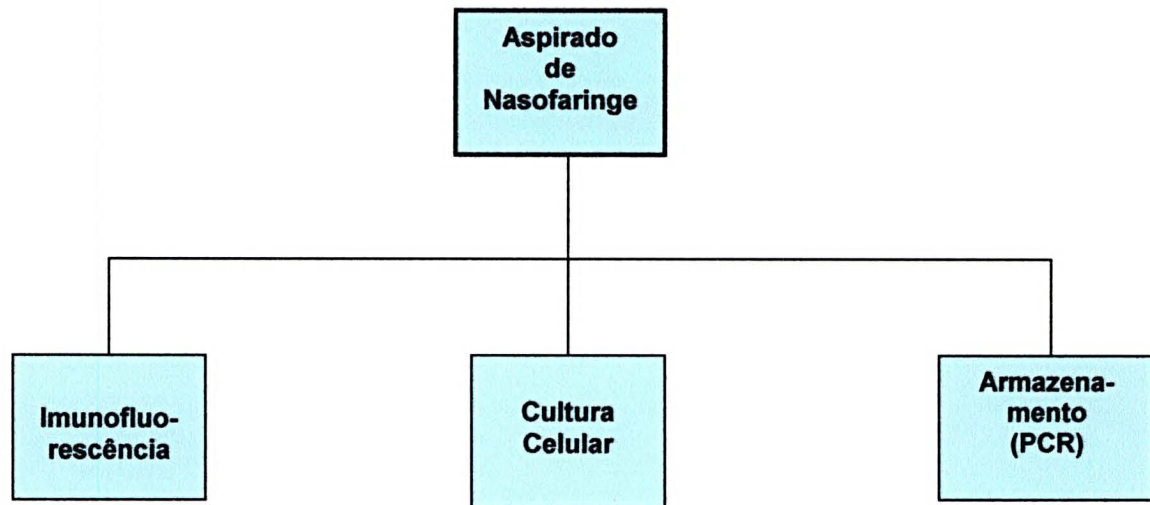
FONTE: FUNASA, Normas para coleta de Aspirado de Nasofaringe

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram processadas de acordo com a técnica descrita por COUCH e KASEL (1995, p. 438), com o objetivo de prepará-las para a pesquisa dos antígenos virais ou genoma viral utilizando-se as metodologias de cultivo celular (CC), imunofluorescência indireta (IFI) e reação em cadeia da polimerase (PCR). O espécime foi dividido em 3 alíquotas, como demonstrado na figura 13.

A quantidade mínima de ANF ou BAL aceita para o processamento foi de 1ml, e espécimes com excesso de hemácias ou muco, foram tratados previamente utilizando-se solução mucolítica e/ou hemolítica (SPECTER; JEFFRIES, 1996, p. 315-319).

FIGURA 13 - DIAGRAMA DO PROCESSAMENTO DA AMOSTRA



A amostra contida no equipo foi transferida para tubo cônico novo de polipropileno, cuidado necessário para a reação de PCR, com 2 mL de meio de transporte contendo, solução salina de Hank's, com 0,5% de gelatina (pH 7,2). Depois de homogeneizado em agitador tipo "Vortex", o tubo foi centrifugado 1000 x g por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi fracionado em 2 alíquotas de 1 mL. A alíquota de 1 mL para cultura celular foi tratada com uma mistura de antibióticos: 50 U/mL de penicilina, 0,2 mg/mL de estreptomicina e 10 µg de anfotericina B, para prevenir contaminação bacteriana e fúngica. Depois de transcorridos 30 minutos para a ação dos antibióticos, a amostra foi inoculada nas linhagens celulares susceptíveis ao crescimento dos diferentes vírus respiratórios ou armazenados à temperatura de -70°C, até sua inoculação (MAGNARD *et al.*, 1999, p. 215-220).

A segunda alíquota do material em meio de transporte foi acondicionada em microtubo com capacidade para 2 mL e conservado à temperatura de -70°C até a realização da pesquisa por PCR.

O sedimento obtido após o fracionamento do sobrenadante, foi ressuspensão em tampão salina fosfatada (PBS, pH 7,2) e centrifugado 1000 x g por 10 minutos, este procedimento foi realizado no máximo por 3 vezes. O sedimento final foi ressuspensão em aproximadamente 500 µL de PBS, 20 µL da suspensão das células do ANF, foram transferidos para uma lâmina apropriada, contendo 10 demarcações

em forma circular de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, para a pesquisa dos diferentes antígenos dos vírus respiratórios, por IFI. As lâminas foram secas em estufa a 37 °C, fixadas com acetona para análise (PA) por 10 minutos à temperatura de 2-8°C e armazenadas à temperatura de -20 °C até a coloração (UEDA *et al.*, 1998, p. 340-344).

Se a amostra, apresentava excesso de muco, era tratada com solução mucolítica, (FLUIMUCIL®) ou ditioneitol a 0,1%. Primeiro, o sedimento foi ressuspenso uma vez com PBS, centrifugado, o sobrenadante foi desprezado e ressuspenso com 300 µL de solução mucolítica. Após tratamento com a solução mucolítica por 5 minutos à temperatura ambiente, o muco se apresentou em forma de grumos, que foram desprendidos com uma leve batida no fundo do tubo e desprezado, o restante do material foi ressuspenso com PBS (pH 7,2), centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. O sedimento obtido foi processado como descrito acima, para a confecção da lâmina.

Se a amostra apresentava grande quantidade de hemácias, utilizou-se solução hemolítica contendo, cloreto de amônia 8,39 g, bicarbonato de potássio 1,0 g, EDTA(Na) 0,04 g e água destilada quantidade suficiente para um litro, pH 7,4, para lise dos eritrócitos. Homogeneizou-se o sedimento com aproximadamente 2 ml da solução hemolítica, à temperatura ambiente por 2 minutos, posteriormente, foi adicionado PBS (pH 7,2), centrifugou-se por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e com o sedimento procedeu-se à confecção das lâminas como descrito acima.

4.3 DETECÇÃO DE ANTÍGENOS VIRAIS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

A metodologia consiste, na detecção dos antígenos virais utilizando-se a metodologia de IFI nas células do ANF, BAL ou nas células das linhagens da cultura celular para monitoramento da replicação viral. Foram pesquisados os antígenos para os vírus mais freqüentemente envolvidos nas infecções respiratórias que continham anticorpos monoclonais para: antígeno de Fusão (F0/F1), da nucleoproteína (NP) e da Hemaglutinina (H) do adenovírus (ADENO), possibilitando a detecção de 41 sorotipos; o anticorpo monoclonal para a nucleoproteína do vírus

influenza A (FLUA), nucleoproteína e hemaglutinina do vírus Influenza B (FLUB), proteína de Fusão (F0/F1), nucleoproteína (NP) e da Hemaglutinina (H) do vírus parainfluenza (PIV). Também foram incluídos na pesquisa os anticorpos da proteína G do vírus sincicial respiratório (RSV).

Os anticorpos monoclonais primários e secundários utilizados no estudo foram da marca Chemicon International Inc., Temecula, CA, EUA, recebidos na forma concentrada e titulados de acordo com as orientações do fabricante, utilizando-se lâminas positivas para os diferentes vírus. Após descongelamento da lâmina contendo as células do paciente, foi adicionada, em cada orifício, a diluição adequada do anticorpo monoclonal (anticorpo primário), correspondente ao vírus a ser detectado, diluído com solução de albumina em PBS na concentração de 2% (pH 7,2). A lâmina foi incubada em câmara úmida na temperatura de 37° C por 30 minutos, favorecendo a ligação do anticorpo ao antígeno. Após este período a lâmina foi lavada, por 3 vezes de 5 minutos com PBS (pH 7,2), sob agitação. A segunda incubação consistiu na adição do anticorpo secundário conjugado, de antiimunoglobulina de coelho e fluoresceína, na diluição adequada com o objetivo de revelar a reação antígeno-anticorpo. A diluição do anticorpo foi realizada com solução de albumina em PBS na concentração de 2% (pH 7,2), contendo azul de Evans a 0,005% para coloração de fundo, contrastando a coloração pela imunofluorescência. Após incubação à 37° C por 30 minutos em câmara úmida a lâmina foi lavada como descrito acima. Depois de lavada e retirado o excesso de PBS colocou-se 1 gota de glicerol tamponado (pH 8,2) e lamínula para ser examinada no microscópio de epifluorescência. A leitura foi realizada por dois técnicos para confirmação dos resultados de acordo com o protocolo de IFI, anexo 3. Na presença de reação inespecífica, a coloração foi repetida realizando-se um bloqueio prévio com solução de PBS contendo 2% de albumina por 10 minutos à temperatura ambiente (HORTAL, 1985; FERNÁNDEZ *et al.*, 1998, p. 36-41; UEDA *et al.*, 1998, p.340-344). O protocolo de técnicas utilizado para a realização da metodologia está detalhado no anexo 3.

4.4 ISOLAMENTO DOS VÍRUS POR CULTURA CELULAR

As amostras em meio de transporte foram inoculadas em linhagem de células, pré-estabelecidas, susceptíveis ao crescimento e isolamento dos vírus pesquisados (OLSEN *et al.*, 1993), utilizando-se a técnica de centrifugação rápida SV, cultura convencional e posterior identificação por IFI, como descrito acima, ou hemaglutinação, utilizando-se hemácias de galinha (OLSEN, 1993; COUCH; KASEL, 1995). As amostras foram inoculadas em duas linhagens celulares:

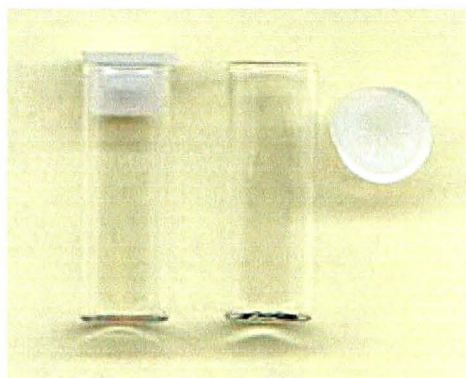
- MDCK (Linhagem Madin Darbi Canine Kidney) para o isolamento de Influenza Tipo A e B e Parainfluenza (COUCH; KASEL, 1995).
- HEp-2 (Linhagem de carcinoma laríngeo humano) para o isolamento de adenovirus, vírus sincicial respiratório e parainfluenza (MAGNARD *et al.*, 1999).

A metodologia consiste no descongelamento, manutenção e amplificação com posterior inoculação da amostra em linhagens celulares susceptíveis aos vírus em pesquisa, na análise do efeito citopático e identificação do isolado viral. As linhagens, mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e transferidas para garrafas de cultura celulares, suplementadas com meio mínimo essencial Eagle-Earle (MEM), SIGMA - EUA, contendo soro bovino fetal (SBF). Na fase de crescimento celular confluyente, tripsinizou-se a monocamada, ressuspenderam-se as células em MEM aliquotando-as para os tubos de SV (Figura 14) ou tubos de cultura convencionais (Figura 15), suplementados com MEM e SBF, após 24 horas de incubação foi possível à inoculação das amostras.

Para o preparo dos tubos, o meio de cultura de uma garrafa pequena foi desprezado, em seguida foi adicionado PBS (pH 7,2) esterilizado, para lavar a monocamada. Posteriormente, adicionou-se aproximadamente 2 mL de solução de tripsina 0,25% até o desprendimento total das células. A solução foi transferida para tubo cônico, que foi centrifugado por 10 minutos, 1000 x g à temperatura ambiente. O sobrenadante obtido foi desprezado e o sedimento obtido foi ressuspensão em MEM, suplementado com SBF, solução a 3%, suficiente para a quantidade de tubos necessários, transferiu-se 1mL da solução para cada tubo após intensa homogeneização para evitar formação de grumos. Os tubos foram incubados à 33° C (+/-2°C) por aproximadamente 24 horas até a inoculação das amostras. Para cada

tubo foram inoculados 200µL da amostra em meio de transporte. Para a técnica de SV, desprezou-se o meio de cultura, adicionou-se PBS (pH 7,2) esterilizado para lavar a monocamada inoculou-se a amostra, centrifugando-a por 40 minutos 700 x g. Após 48 horas de incubação a 33°C as células foram desprendidas das monocamadas, lavadas uma vez com PBS e transferidas para lâmina demarcada para a pesquisa dos agentes virais em replicação por IF como descrito. Para o tubo convencional a amostra foi inoculada como descrito, porém monitorou-se a replicação viral observando-se o aparecimento do efeito citopático, até vinte e um dias após a inoculação para a linhagem HEP-2. Para a linhagem MDCK utilizou-se a técnica de hemaglutinação com hemáceas de galinha, o procedimento foi realizado no 3º e 7º dia após a inoculação. Em placa de microtitulação, realizou-se diluição seriada do sobrenadante de cultura, com PBS (pH 7,2), para um volume final de 50µL, posteriormente distribuiu-se 50µL da solução de hemáceas de galinha a 0,75% em PBS e após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente, observou-se a ausência ou presença da aglutinação anotando-se os títulos hemaglutinantes obtidos (AL-JABRI; WIGG; OXFORD, 1996, p. 306-307).

FIGURA 14 – TUBOS DE CULTURA CELULAR “SHELL VIAL”



FONTE: www.ourworld.compuserve.com/.../milleranalytical/sanlebot.htm

FIGURA 15 – TUBOS DE CULTURA CELULAR CONVENCIONAL



FONTE: www.bdbiosciences.com/.../cell_culture_tubes/htm

Com a dificuldade de se obter títulos suficientemente altos por cultura celular, não foi possível aplicar a técnica de inibição de hemaglutinação, com o objetivo de selecionar amostras para a análise molecular. A estratégia utilizada, em nosso estudo, foi de randomizar amostras do início, meio e fim do ciclo do surto para o vírus influenza. Além disso, analisamos um número maior de amostras por RT-PCR. As amostras selecionadas para a análise molecular foram escolhidas dentre àquelas positivas para vírus influenza tipo A e tipo B, por se tratar do objetivo do estudo

4.5 ANÁLISE MOLECULAR

Com o objetivo de subtipar o vírus influenza, utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração do RNA das amostras foi realizada, de acordo com o protocolo descrito por Boom e colaboradores, 1990 e realizou-se a transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação do sítio alvo, segundo Ellis e colaboradores (1999). O material amplificado foi visualizado após eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etideo. Os protocolos utilizados no desenvolvimento das metodologias estão no anexo 4.

4.5.1 Extração do RNA

O RNA foi extraído, utilizando-se o método descrito por BOOM e colaboradores, em 1990, que consiste na ligação com o tiocianato de guanidina-sílica (BOOM *et al.*, 1990, p. 495-503).

Em tubo com capacidade para 1,5 mL adicionou-se: 10 μ L da sílica e 840 μ L do tampão L6 – tampão de lise que continha, 120g de GuSCN (tiocianato de Guanidina) em 100 mL de 0,1M Tris HCL, pH 6,4, 22 mL de 0,2M EDTA pH 8,0 ajustado com NaOH e Triton X- 100 e 150 μ L da amostra. A sílica foi preparada anteriormente e estocada à temperatura ambiente. O tubo foi homogeneizado imediatamente e mantido sob agitação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após, microcentrifugado por 15 segundos a 12.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Posteriormente, o sedimento de sílica foi lavado 2 vezes com 0,5 mL de tampão L2 – tampão de lavagem, composto de 120 g de GuSCN em 100 mL de 0,1M tris-HCl, pH 6,4, após a homogeneização rápida e microcentrifugação de 15 segundos, 12.000 rpm o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado como acima descrito. O sedimento obtido foi lavado mais uma vez com acetona e após centrifugação o tubo foi mantido aberto a 56°C durante 10 minutos para evaporação total da acetona.

4.5.2 Transcrição Reversa

O sedimento contendo a sílica e o RNA, obtido pela extração, foi ressuspenso em 31 μ L de uma solução contendo, 30 μ L de água ultrapura previamente tratada com dipiromcarbonato, e RNAsin 40 U/ μ L (Invitrogen, EUA), com o objetivo de eliminar as RNAses, prevenindo a degradação do RNA extraído. Depois de homogeneizados os tubos fechados foram incubados à 56° C por 10 minutos, novamente homogeneizados e centrifugados por 6 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante, contendo o RNA extraído foi utilizado para a transcrição reversa e obtenção do DNA complementar. A mistura dos reagentes para obtenção do cDNA

foi preparada de acordo com o número de amostras, e continha tampão PCR concentrado 10 vezes (Perkin Elmer), $MgCl_2$ 50 mM, dideoxinucleotídeos trifosfatos 10 mM (dNTPs), e a enzima AMV-RT (Life Technologies), que utiliza uma fita simples de RNA ou DNA em presença de iniciadores para sintetizar a fita complementar do DNA. Foi adicionado a 22,2 μ L do produto extraído, 17,8 μ L da mistura de tampões. Após 10 minutos de repouso à temperatura ambiente, o tubo foi submetido a um programa de 60 minutos a 37°C, 5 minutos a 100°C e em seguida resfriado em gelo, para a reação de PCR. Neste processo foi incluído um controle negativo, utilizando-se água pura (ELLIS; FLEMING; ZAMBON, 1997; STOCKON *et al.*, 1998).

4.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase

Utilizou-se a técnica de PCR Multiplex, método padronizado para subtipar os vírus influenza em amostras clínicas ou isoladas.

Após extração do RNA a partir de 150 μ L do espécime, pelo método de BOOM, como descrito e obtenção do cDNA, o produto obtido foi submetido a amplificações utilizando a reação em cadeia da polimerase. A seqüência dos iniciadores, utilizados no estudo, bem como suas propriedades, estão descritas na tabela 6, a detecção se baseia na porção HA1 do gene da hemaglutinina dos vírus influenza A e B. Cada par de iniciadores foram utilizados em uma concentração de 5 pmol, na primeira amplificação e 25 pmol, na segunda amplificação.

Para o primeiro PCR foi realizada a mistura de reação, que continha 10 mM Tris-HCL (pH 8.8), 3,5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM KCl e 1,5 U de Taq polimerase e 1 μ l de cada um dos iniciadores externos ajustando-se o volume com água ultrapura. Em seguida foi adicionado a 80 μ L da mistura, 20 μ L do cDNA, gerado na reação de RT-PCR. A amplificação com o termociclador da Perkin Elmer (9600 Termocycler) consistiu em 1 ciclo à 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto, em seguida o tubo foi mantido a 15°C.

Dois microlitros do produto da primeira amplificação foram transferidos para 48 μ L da mistura de reação para a segunda amplificação como acima descrito, mais cada dNTPs na concentração de 0,2 mM. As amostras foram incubadas por 1 ciclo

de 94°C por 2 minutos e então 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Os amplicons foram visualizados retirando 15 µL do produto final da reação, adicionando-se 2 µL do tampão de aplicação concentrado 10 vezes, do gel composto de, 1 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0), (100 mM EDTA), 2,5 mL de glicerol (50%), 0,025g de azul de bromofenol (0,5%). Realizou-se a eletroforese em gel de agarose concentração de 1,5 % em solução TBE diluído uma vez, contendo 108 g de Tris Base (890 mM), 55 g de ácido bórico (890 mM), 40 mL de EDTA 0,5M pH 8,0 (20 mM) por 60 minutos a uma voltagem de 100 Volts. Após a corrida o gel foi incubado em solução de brometo de etideo na concentração de 1mg/mL por 5-10 minutos, o gel foi lavado com água destilada para retirar o excesso de brometo e este foi observado em transiluminador de UV ondas curtas. O tamanho esperado das bandas em pares de base (pb) foi de 944 pb para o tipo do vírus influenza A, subtipo H1, 591 pb para tipo A, subtipo H3 e 767 pb para o vírus tipo B (ELLIS; FLEMING; ZAMBON, 1997; STOCKON *et al.*, 1998).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram avaliados com o uso da planilha eletrônica "Excel Microsoft". Para se obter as respostas desejadas, utilizaram-se a análise de Regressão Logística e de Coeficiente de Correlação. A Regressão Logística tem se constituído em um dos principais métodos de modelagem estatística de dados. É apropriada para respostas variáveis categóricas e descreve a relação entre a resposta variável e um conjunto de variáveis explanatórias. Significâncias estatísticas, utilizando-se esse método, foram consideradas quando $p < 0,5$. O Coeficiente de Correlação mede a possível relação linear existente entre as variáveis aleatórias de maneira que; o coeficiente é sempre um valor entre -1, 0 e +1; quanto maior a tendência de uma relação linear positiva, tanto mais o coeficiente está próximo de +1; quanto maior a tendência de uma relação linear negativa, tanto mais o coeficiente tem valor mais próximo de -1, por outro lado, quando o coeficiente está próximo de zero não existe correlação linear (McCULLAGH; NELDER, 1983; LINDSEY, 1997; PAULA, 1997; SOARES, 1995; JEKEL; ELMORE; KATZ, 1999).

TABELA 6 - PROPRIEDADE DOS INICIADORES USADOS PARA VÍRUS INFLUENZA PCR-MULTIPLEX

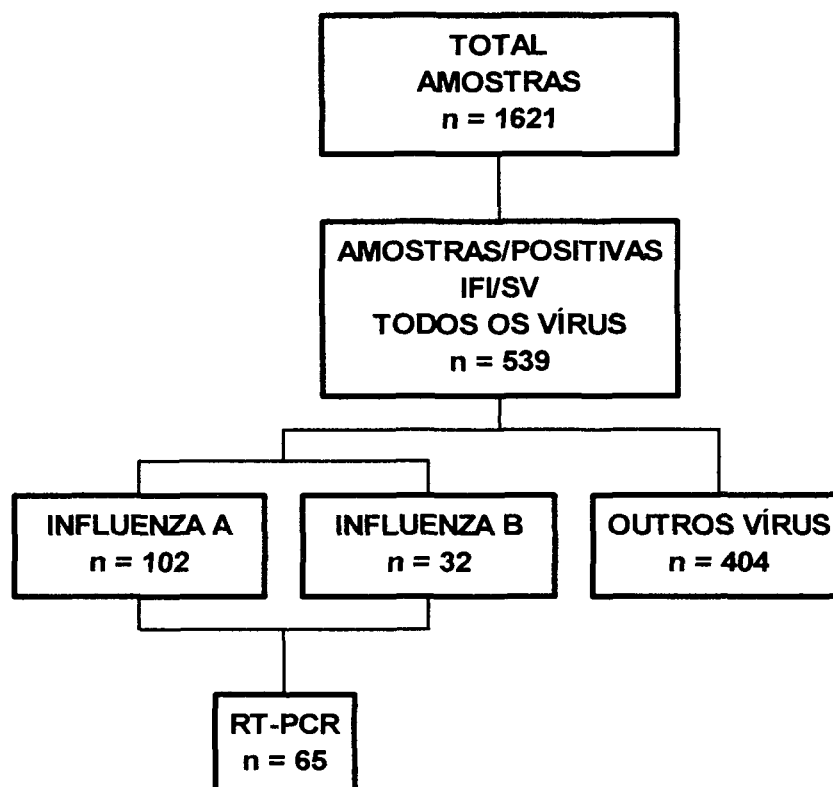
Amplificação Iniciadores	Seqüência (5' – 3')	Posição do gene	G+C (%)	Temperatura ótima de anelamento	Tamanho do Produto (pb)
1º					
Amplificação					
AHI A	CAGATGCAGACACAATATGT	HA	40	52	1.015
AHI FII	AAACCGGCAATGGCTCCAAA	HA	50		
AH3 A	CAGATTGAAGTGACTAATGC	HA	40	52	883
AH3 DII	GTTTCTCTGGTACATTCCGC	HA	50		
BHA A	GTGACTGGTGTGATACCACT	HA	50	53	900
BHA DII	TGTTTTCACCCATATTGGGC	HA	45		
2º					
Amplificação (Nested)					
AHI B	ATAGGCTACCATGCGAACAA	HA	45	52	944
AHI EII	CTTAGTCCTGTAACCATCCT	HA	45		
AH3 B	AGCAAAGCTTTCAGCAACTG	HA	45	54	591
AH3 CII	GCTTCCATTTGGAGTGATGC	HA	50		
BHA B	CATTTTGCAAATCTCAAAGC	HA	35	54	767
BHA CII	TGGAGGCAATCTGCTTCACC	HA	55		

FONTE: Adaptado de STOCKTON; ELLIS; SAVILLE, 1998.

5 RESULTADOS

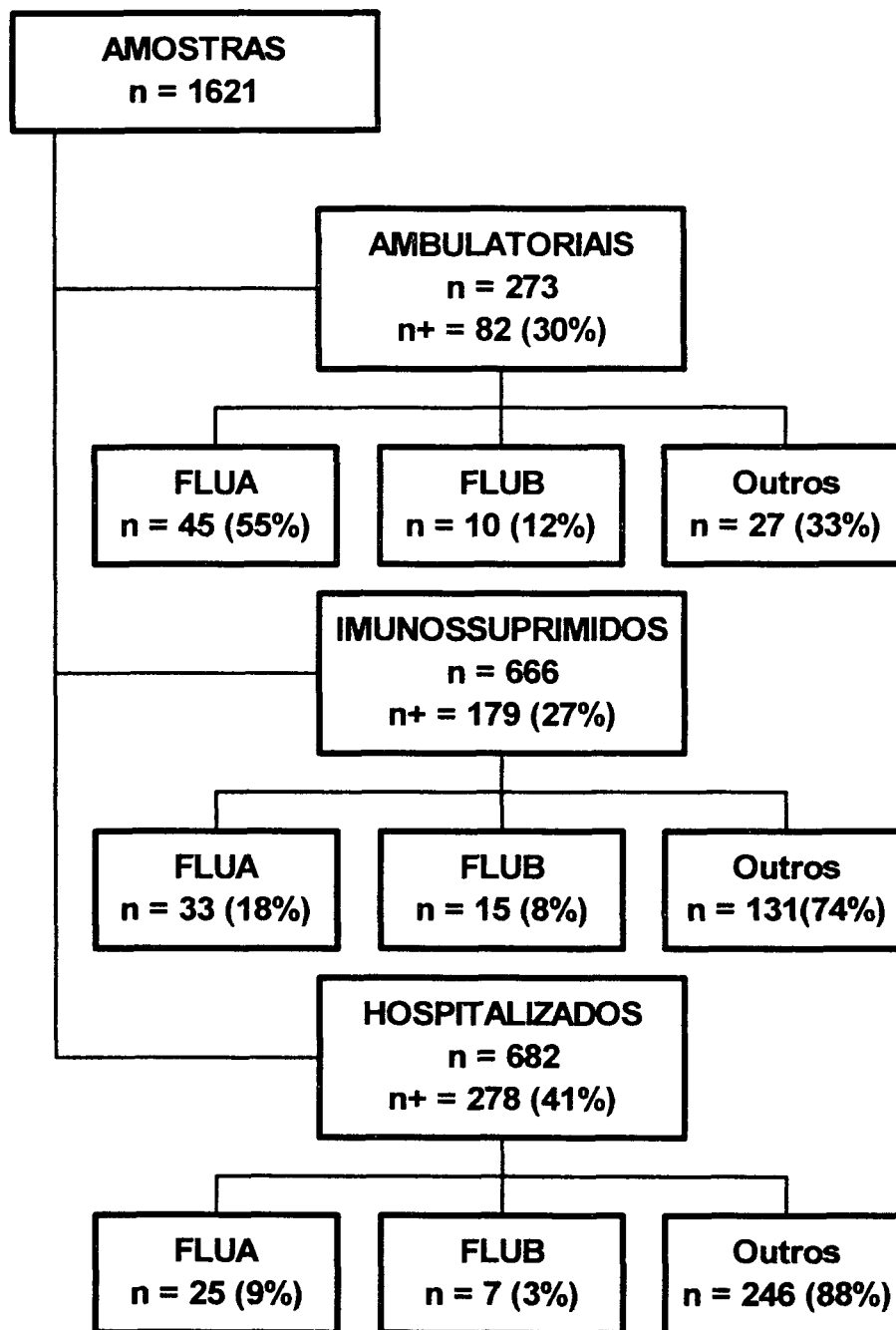
Avaliou-se um total de 1621 amostras de aspirado de nasofaringe ou lavado broncoalveolar, sendo, 273 de ambulatoriais, 666 de imunossuprimidos e 682 de hospitalizados. Do total de amostras, 135 foram positivas para os vírus influenza, destas, 103 positivas para o tipo A e 32 para o tipo B. Outros vírus estudados apresentaram um total de 404 amostras. Um mil e oitenta e duas amostras apresentaram resultado negativo (Figura 16). Selecionaram-se as amostras positivas, por meio das metodologias de imunofluorescência, culturas celulares (SV), das positivas para os vírus influenza, 65 foram selecionadas para posteriormente serem subtipadas por RT-PCR. A figura 17 apresenta um resumo da incidência dos vírus influenza nos diferentes grupos. Desta forma, foi possível avaliar os parâmetros de incidência, sazonalidade e subtipar as amostras selecionadas de vírus influenza nos diferentes grupos, no período de 2000 a 2003. Adicionalmente, avaliou-se perfil clínico dos pacientes ambulatoriais e hospitalizados e perfil demográfico de todos os pacientes.

FIGURA 16 – DIAGRAMA REPRESENTATIVO DOS RESULTADOS



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

FIGURA 17 – INCIDÊNCIA DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B EM RELAÇÃO A OUTROS VÍRUS ESTUDADOS



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

5.1 PACIENTES AMBULATORIAIS

5.1.1 INCIDÊNCIA

O estudo envolveu a análise de amostras coletadas nos anos de 2000 a setembro de 2003.

As amostras, recebidas no laboratório de virologia, foram armazenadas à temperatura de 2-8° C, até seu processamento, no máximo 4 horas após a coleta. Posteriormente, fez-se a pesquisa dos diferentes vírus respiratórios, como, vírus sincicial respiratório, influenza A, influenza B, parainfluenza e adenovirus utilizando-se as técnicas de imunofluorescência, com anticorpos monoclonais específicos para detecção dos antígenos aos vírus estudados, e cultura celular com linhagens celulares, MDCK e HEp-2, como descrito no item 4 em material e métodos.

Os padrões de fluorescência obtidos estão apresentados nas figuras 18, 19 e 20. A figura 18 mostra célula do aspirado de nasofaringe, reagente para vírus influenza B, em cor verde maçã e célula não reagente em cor vermelha. A figura 19 representa células coletadas de sobrenadante de cultura celular infectadas com vírus influenza do tipo A, em cor verde maçã, onde se observam aproximadamente 100% de células positivas, figura 20 representa o sobrenadante de cultura celular, não reagente, utilizada, como controle negativo.

Do total de 273 amostras incluídas no estudo, 82 (30,0%) foram amostras positivas para os diferentes vírus, destas 55 (67,1%) foram positivas para os vírus influenza, utilizando-se as metodologias de imunofluorescência e cultura celular, sendo 54,9% para o tipo influenza A e 12,2% para o tipo influenza B e 32,9% para os outros vírus estudados. Cento e noventa e uma (70,0%) amostras apresentaram resultados negativos (Figura 17).

No gráfico 1 estão apresentadas, a distribuição total das amostras coletadas, e amostras positivas no período do estudo. No ano de 2000 obteve-se 25 (47,2%) de amostras positivas para todos os vírus. Nos anos subseqüentes houve uma distribuição homogênea, porém menor, com uma média de 25% de amostras positivas.

O gráfico 2 e tabela 7 apresentam a distribuição dos tipos dos vírus influenza no período do estudo em relação ao número total de amostras positivas.

Observou-se uma incidência mais elevada do vírus influenza A no ano de 2000 (32,0%), do que nos anos de 2001, 2002 e 2003 cujas taxas foram de 11,5%, 7,2% e 12,3% respectivamente. Para o vírus influenza do tipo A o coeficiente de proporção, isto é a probabilidade de ocorrer a infecção pelo vírus influenza foi de 15,3%, com um intervalo de confiança (95%) de 11,4% - 20,3%.

Para o vírus influenza tipo B a incidência foi homogênea, com exceção do ano de 2002, onde a taxa encontrada foi de 8,5% em relação aos outros anos cuja taxa média foi de 1,7%. Para o vírus influenza do tipo B coeficiente de proporção foi de 2,9%, com um intervalo de confiança (95%) de 1,36% - 5,89%.

Observou-se também uma porcentagem de coinfeções devidas aos vírus influenza A / parainfluenza, influenza A / RSV e influenza A / adenovírus, cujas taxas foram de 1,9%, 4,3% e 1,3%, nos anos 2000, 2001 e 2002 respectivamente, não sendo observadas no ano de 2003.

Os outros vírus foram detectados em uma proporção de 11,3%, 7,2%, 12,0% e 9,7% no período de quatro anos.

O vírus mais freqüente foi o vírus influenza do tipo A ao longo dos quatro anos, sendo que no ano de 2000 observou-se uma incidência mais elevada em relação aos anos subseqüentes. O vírus influenza do tipo B foi menos freqüente em todos os anos, com exceção do que foi encontrado no ano de 2002, onde o vírus apresentou uma incidência mais alta.

FIGURA 18 - IMUNOFLORESCÊNCIA POSITIVA DA AMOSTRA Nº 180 PARA VÍRUS INFLUENZA B EM CÉLULAS DE ASPIRADO DE NASOFARINGE

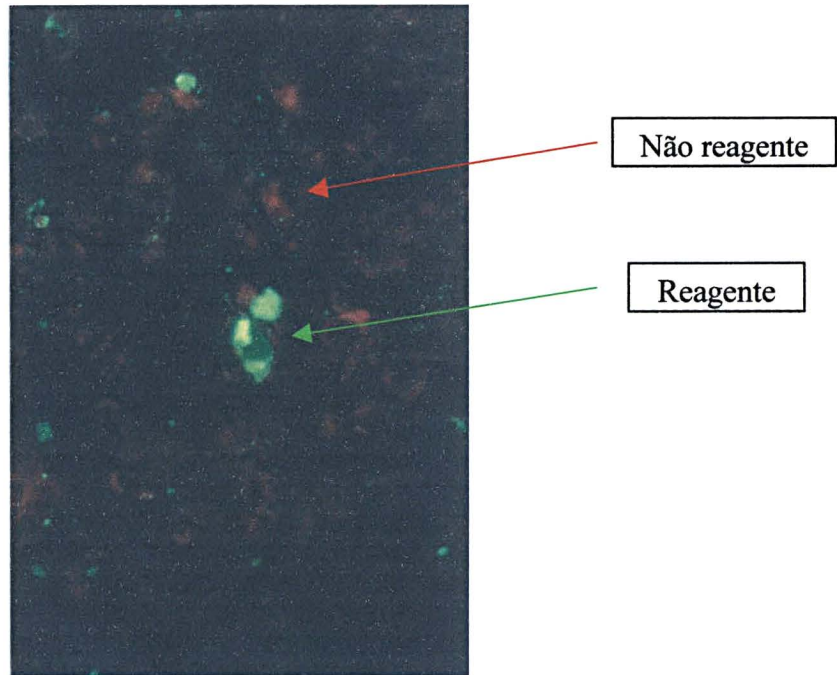


FOTO: Luine R. R. Vidal Tsuchiya

FIGURA 19 - IMUNOFLORESCÊNCIA POSITIVA DA AMOSTRA Nº 36 PARA VÍRUS INFLUENZA A EM CÉLULAS DE CULTURA CELULAR-MDCK

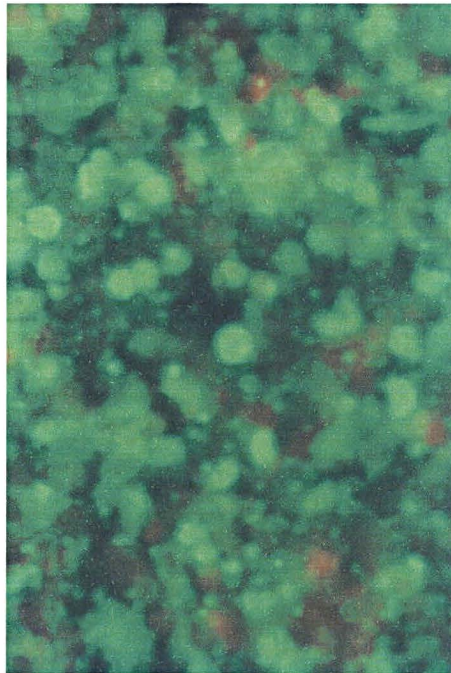


FOTO: Luine R. R. Vidal Tsuchiya

FIGURA 20 - IMUNOFLUORESCÊNCIA NEGATIVA – CONTROLE NEGATIVO EM CULTURA DE CÉLULAS MDCK

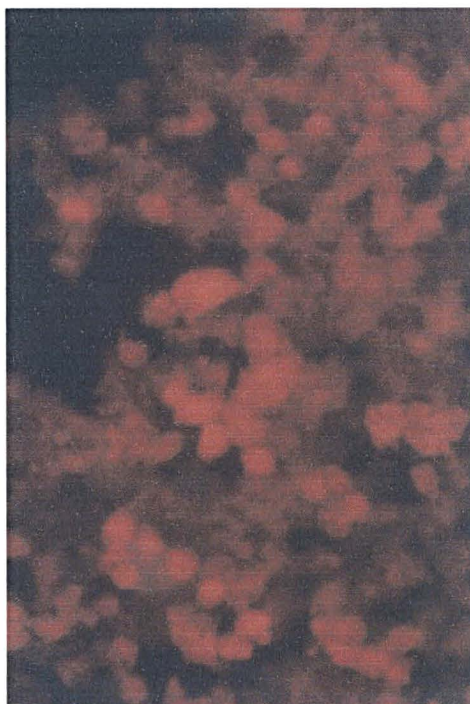
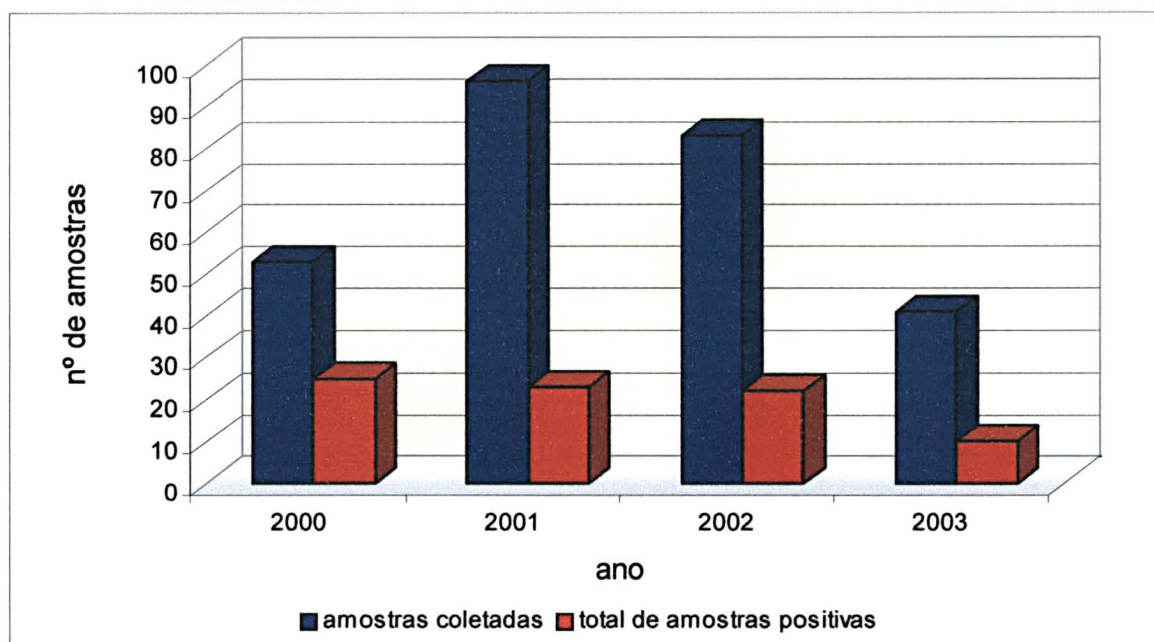


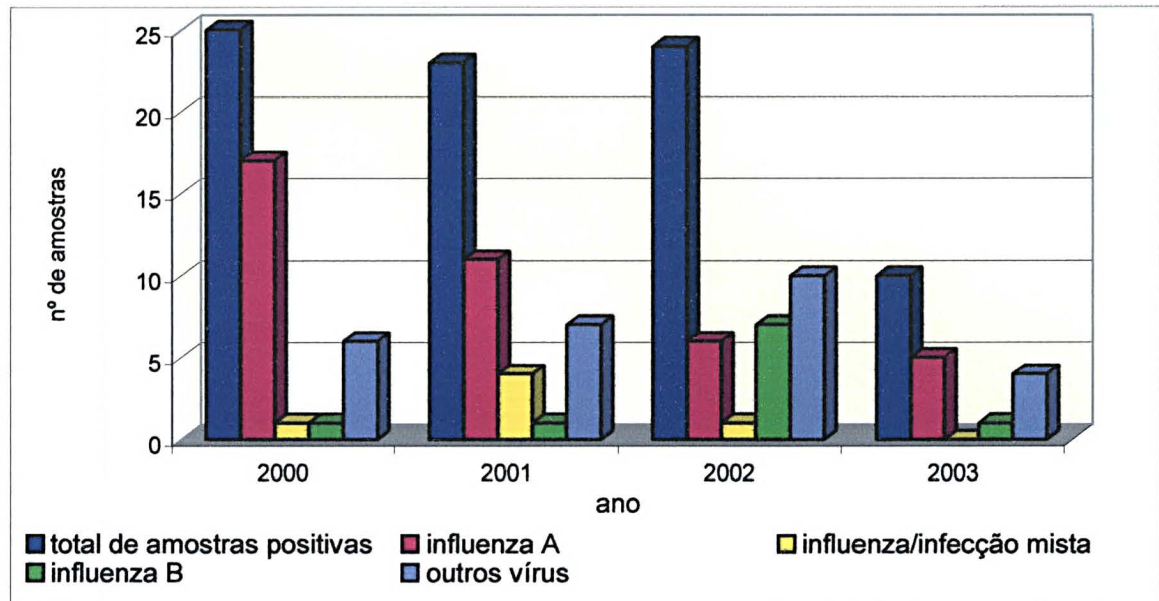
FOTO: Luine R. R. Vidal Tsuchiya

GRÁFICO 1 - NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS E NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS, PACIENTES AMBULATORIAIS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

GRÁFICO 2 - NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS E NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA VÍRUS INFLUENZA, PACIENTES AMBULATORIAIS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

TABELA 7 - INCIDÊNCIA DOS VÍRUS INFLUENZA EM RELAÇÃO AOS OUTROS VÍRUS E AMOSTRAS NEGATIVAS, PACIENTES AMBULATORIAIS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003

VÍRUS	IFI e CC+			
	2000 (n=53)	2001 (n=96)	2002 (n=83)	2003 (n=41)
Influenza A	17 (32,0%)	11 (11,5%)	6 (7,2%)	5 (12,3%)
Influenza B	1 (1,9%)	1 (1,0%)	7 (8,5%)	1 (2,4%)
Infecção Mista	1 (1,9%) ^a	4 (4,3%) ^b	1 (1,3%) ^c	0 (0%)
Outros Virus	6 (11,3%)	7 (7,2%)	10 (12,0%)	4 (9,7%)
Não Reagente	28 (52,9%)	73 (76%)	59 (71,0 %)	31 (75,6%)

FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

NOTA: ^aFLUA / PIV

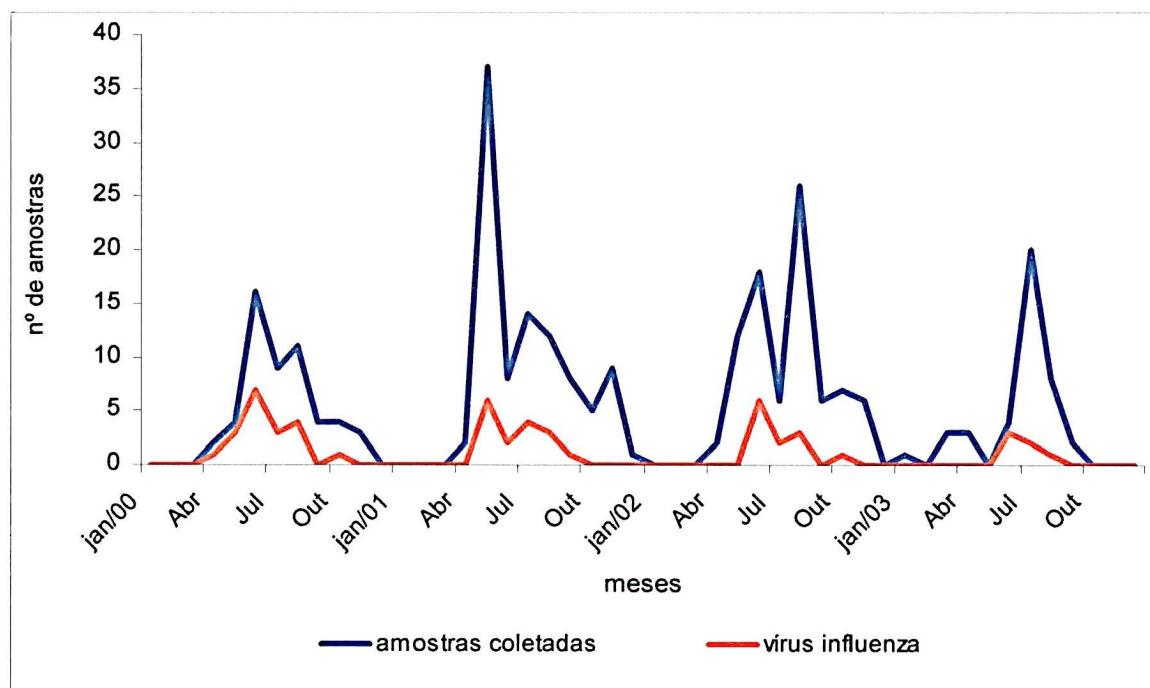
^bFLUA / RSV

^cFLUA / ADENO

5.1.2 SAZONALIDADE

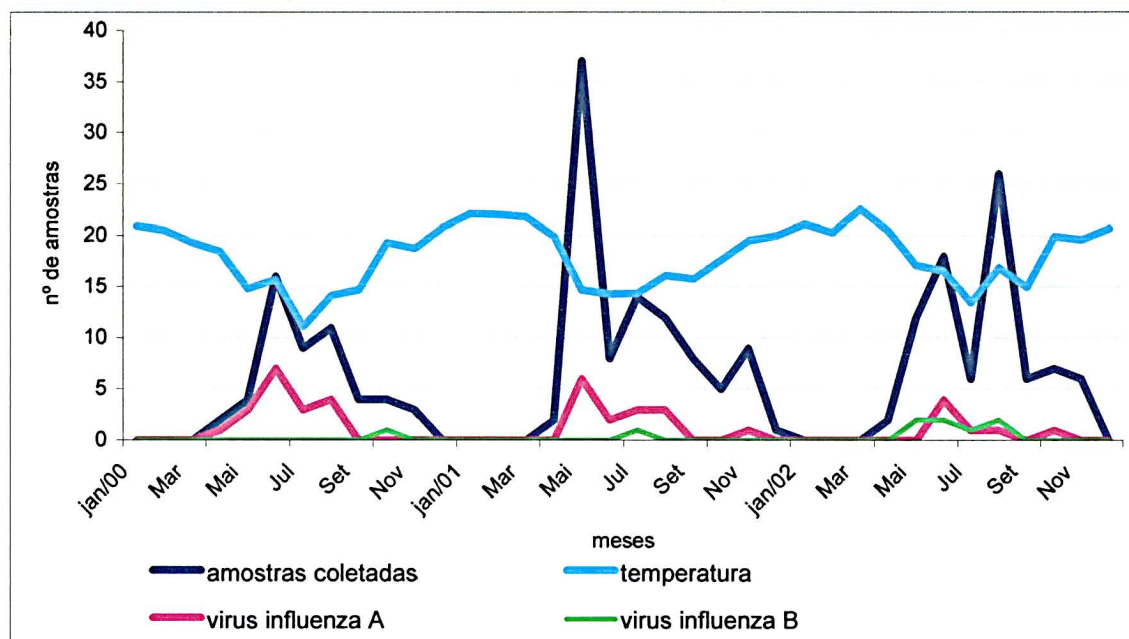
A incidência das viroses respiratórias por vírus influenza A e B, ao longo dos quatro anos, foi distribuída trimestralmente, como apresentado no gráfico 3. Observa-se neste gráfico uma maior frequência dos vírus nos meses de inverno, principalmente junho e julho. A análise mostra uma correlação linear significativa. Em relação às temperaturas médias anuais, observa-se uma relação similar, onde o coeficiente de correlação linear encontrado foi negativo de - 0,6091 para influenza do tipo A e - 0,0089 para o vírus influenza do tipo B. O gráfico 4 mostra a incidência dos vírus influenza tipos A e B, distribuídos trimestralmente, durante um período de 3 anos 2000 a 2002, em relação às temperaturas médias. Observa-se que os períodos de temperatura mais baixa coincidem com um maior número de amostras coletadas, bem como, uma maior incidência dos vírus influenza tipos A e B.

GRÁFICO 3 - INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS, PACIENTES AMBULATORIAIS, NOS ANOS DE 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

GRÁFICO 4 - INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS MÉDIAS ANUAIS, PACIENTES AMBULATORIAIS, NOS ANOS DE 2000 A 2002



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR e SIMEPAR

5.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

A tabela 8 compara características demográficas e clínicas dos pacientes ambulatoriais, atendidos nas unidades de saúde, com diagnóstico de infecção respiratória aguda, relacionados ou não com vírus influenza.

Os fatores associados a “influenza like illness” como: coriza, febre, mialgia, artralgia, cefaléia e tosse, foram avaliados, além de dados como idade, sexo e taxas de vacinação.

Pacientes de todas as faixas etárias foram admitidos no estudo. No gráfico 5 se observa a distribuição por faixa etária dos pacientes ambulatoriais admitidos no estudo, que variou de 1 mês a 70 anos. No mesmo gráfico, identifica-se que todas as faixas etárias são acometidas pelo vírus influenza, e são coincidentes com o aumento de amostras coletadas. Observou-se que 58,3% das amostras coletadas eram provenientes do sexo feminino. No entanto, nem o sexo nem idade não influenciaram no aparecimento de vírus nas amostras.

Os sinais clínicos mais freqüentemente relatados por todos os pacientes atendidos, foram coriza, febre e tosse em mais de 80% dos casos.

Verificou-se que as variáveis mialgia ($p = 0,1233$) e febre ($p = 0,0216$) são significativas para o modelo proposto de regressão logística. Sendo que as probabilidades de haver presença de vírus influenza, quando há febre e mialgia, apenas febre e apenas mialgia, são de 31,1%, com intervalos que variam de 9,9% a 64,9%; 22,6%, intervalo de 12,35 – 40,83 e 14,1%, intervalo de 3,8% - 40,62%, respectivamente.

Observou-se uma baixa freqüência de pacientes que receberam vacinação de acordo com as datas adequadas, destes 23,8% foram positivos para vírus influenza (Tabela 9).

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES AMBULATORIAIS, PERÍODO DE 2000 A 2003

	N	%
Sexo ^a F	158	58,3
M	113	41,7
Coriza	246	89,1
Febre	234	84,8
Tosse	230	83,3
Cefaléia	201	72,8
Odinofagia	183	66,3
Mialgia	176	63,7

FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR.

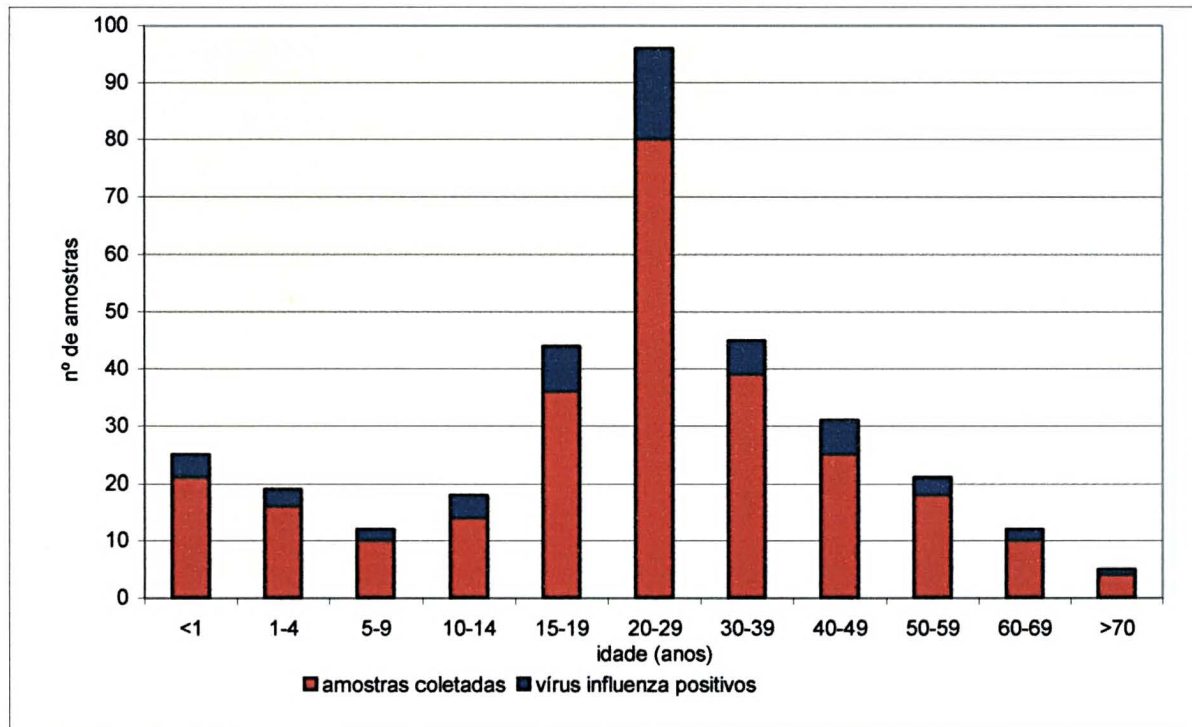
NOTA: ^aDois pacientes não tem informação de sexo.

TABELA 9 - NÚMERO DE PACIENTES AMBULATORIAIS VACINADOS x PACIENTES AMBULATORIAIS INFLUENZA POSITIVOS, PERÍODO 2000-2003

	N	%
PACIENTES VACINADOS	21	7,7
PACIENTES VACINADOS INFLUENZA POSITIVOS	05	23,8
PACIENTES NÃO VACINADOS	252	92,3

FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS E VÍRUS INFLUENZA DETECTADOS, POR FAIXAS ETÁRIAS NOS PACIENTES AMBULATORIAS, PERÍODO 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR.

5.2 PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS

5.2.1 INCIDÊNCIA

As amostras foram coletadas nos anos de 2000 a setembro de 2003.

Os espécimens recebidos no laboratório de virologia foram armazenados à temperatura de 2-8° C, até seu processamento. Os protocolos para o processamento e pesquisa dos antígenos virais, foram os mesmos adotados para as amostras dos pacientes ambulatoriais, como descrito em material e métodos, item 4, objetivando selecionar os espécimens positivos para os vírus influenza.

As figuras 18, 19 e 20, incluídas no item 5.1.1, apresentam os padrões positivos e negativos de fluorescência, iguais àqueles adotados para os pacientes ambulatoriais.

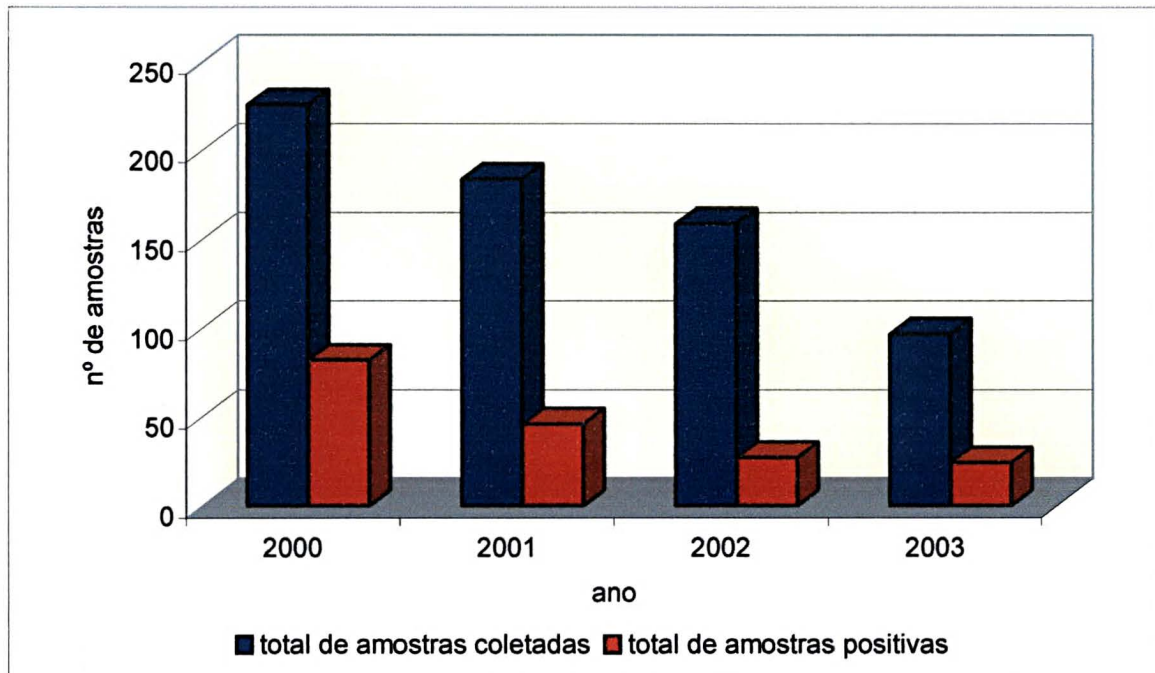
Do total de 666 amostras incluídas no estudo, obteve-se 179 (26,9%) amostras positivas para os diferentes vírus e 487 (73,1%) amostras negativas. Do total das amostras positivas, em 48 (26,8%) delas eram detectados os vírus influenza, utilizando-se as metodologias de imunofluorescência e cultura celular, sendo 68,8% para o tipo influenza A e 31,2% para o tipo influenza B (Figura 17).

No gráfico 6 estão apresentadas a distribuição das amostras coletadas, e a positividade para o vírus influenza no período do estudo. No ano de 2000, observou-se uma positividade de 36,3% para os diferentes vírus em 82 amostras estudadas. Nos anos subsequentes estas freqüências foram menores.

O gráfico 7, tabela 10 demonstram a distribuição dos tipos dos vírus influenza, no período do estudo. Observa-se uma incidência mais elevada do vírus influenza A nos anos de 2000, 2001 e 2003, porém no ano de 2001 observa-se que os vírus influenza tipo B e infecção mista com vírus sincicial respiratório foram mais incidentes. Na mesma tabela estão apresentadas as freqüências de amostras negativas para os vírus estudados, sendo demonstrada uma freqüência média de 74,2% durante o período do estudo. Para o vírus influenza do tipo A o coeficiente de proporção foi de 4,4%, com um intervalo de confiança (95%) de 3,1% - 6,3%.

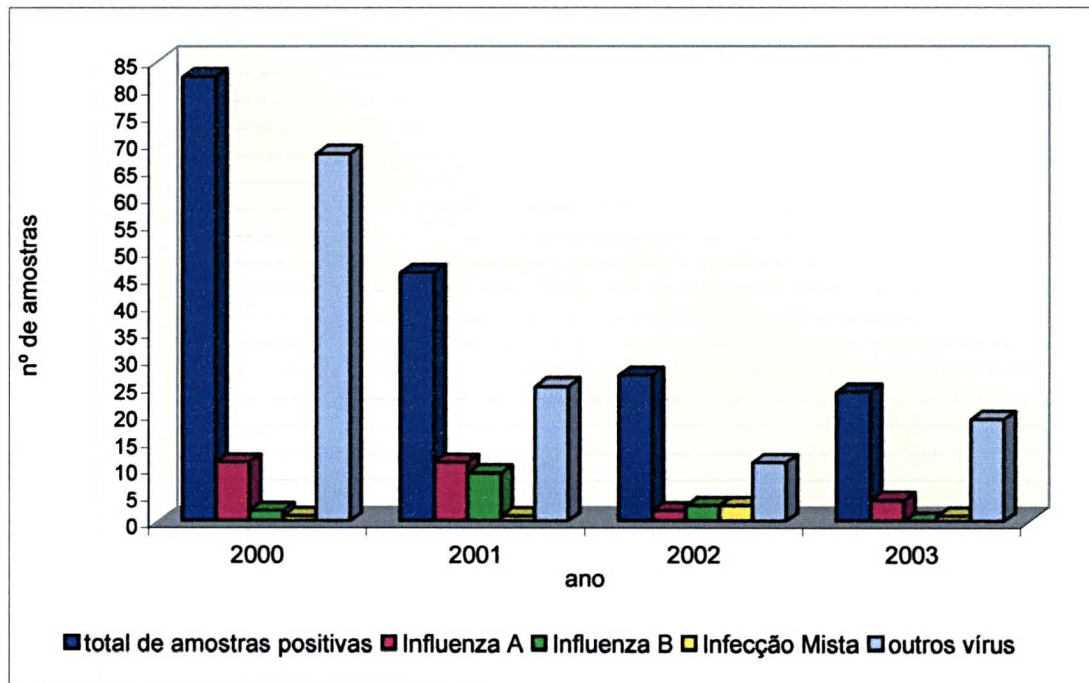
Para o vírus influenza tipo B a incidência encontrada foi menor que 1% em 2000, no ano de 2001 observou-se uma elevação e a taxa encontrada foi de 4,9%. No ano de 2002 a taxa foi de 1,9%, o vírus não foi detectado em 2003, observando-se influenza B e coinfeção com parainfluenza. O vírus influenza do tipo B apresentou um coeficiente de proporção de 2,0%, com um intervalo de confiança (95%) de 1,1% - 3,4%. Na tabela 10, observa-se uma porcentagem de coinfeção e esta foi devida aos vírus influenza A / parainfluenza, influenza A / vírus sincicial respiratório e influenza B / parainfluenza, com taxas de incidência de <1%, <1%, 1,9% e 1% respectivamente.

GRÁFICO 6 - NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS E NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS NOS PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR.

GRÁFICO 7 – NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS E NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA VÍRUS INFLUENZA NOS PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, NO PERÍODO 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

TABELA 10 - INCIDÊNCIA DOS VÍRUS INFLUENZA EM RELAÇÃO AOS OUTROS VÍRUS E AMOSTRAS NEGATIVAS, PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003

VÍRUS	IFI e CC+			
	2000 (n=226)	2001 (n=184)	2002 (n=159)	2003 (n=97)
Influenza A	12 (5,3%)	10 (5,4%)	2 (1,3%)	4 (4,1%)
Influenza B	2 (<1%)	9 (4,9%)	3 (1,9%)	0
Infecção Mista	1 (<1%) ^a	1 (<1%) ^b	3 (1,9%) ^b	1 (1,0%) ^c
Outros Vírus	68 (30,0%)	25 (13,6%)	19 (11,9%)	19 (19,6%)
Não Reagente	143 (63,3%)	139 (75,5%)	132 (83%)	73 (75,3%)

FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

NOTA: ^aFLUA / PIV

^bFLUA / RSV

^cFLUB / PIV

5.2.2 SAZONALIDADE

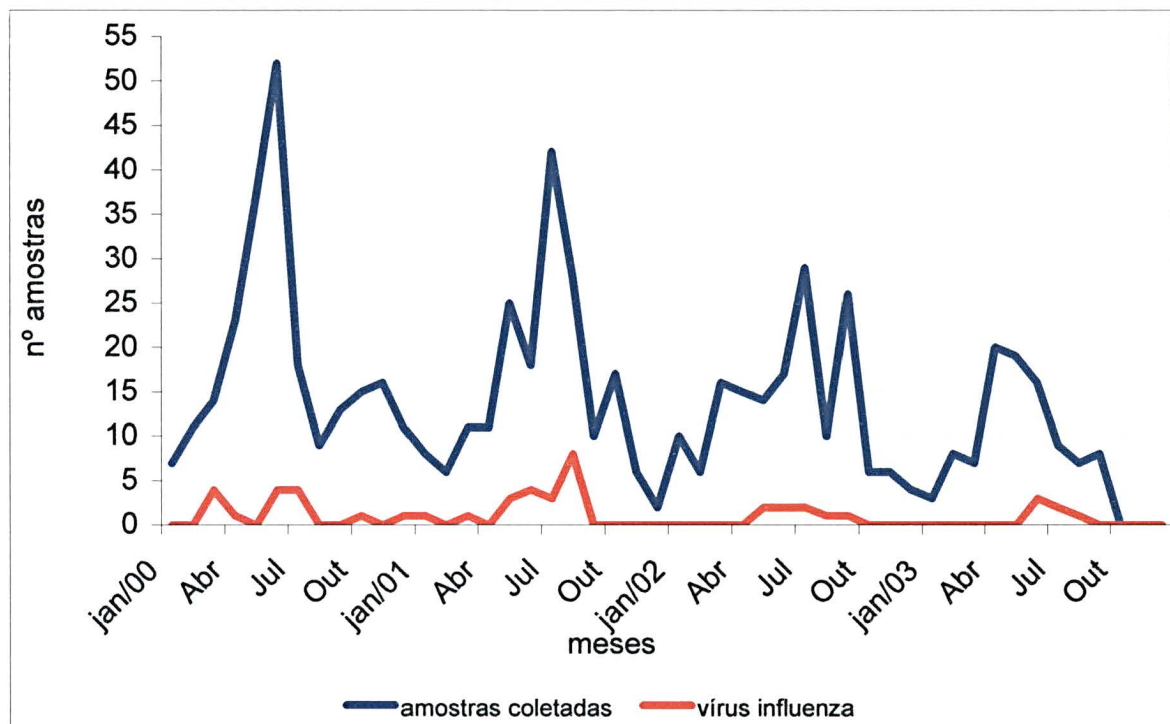
A incidência das viroses respiratórias por vírus influenza, ao longo dos quatro anos, foi distribuída trimestralmente, em relação às amostras coletadas, como demonstrado no gráfico 8. Observou-se um aumento da incidência do vírus influenza em relação ao aumento do número das amostras coletadas durante o período do estudo.

A distribuição da incidência dos vírus influenza, por meses, está apresentada no gráfico 8, nota-se uma distribuição irregular ao longo dos quatro anos. No ano de 2000 a circulação do vírus se iniciou no mês de março e se estendeu até o mês de agosto, com um aumento de amostras positivas no mês de abril, decrescendo em maio com outro aumento no mês de agosto. No ano de 2001 a maior incidência iniciou-se em junho, apresentando um pico no mês de agosto, mantendo-se em índices elevados até setembro, porém com tendência de queda atingindo o mínimo de incidência em outubro. No ano de 2002, observou-se um decréscimo do número de amostras positivas, com um aumento do número de vírus influenza durante junho, julho e agosto diminuindo no mês de outubro. No ano de 2003 notou-se um aumento de amostras positivas no mês de agosto, diminuindo em setembro, mês do término

da coleta das amostras. A incidência dos vírus influenza nestes pacientes também foi maior nos meses de inverno.

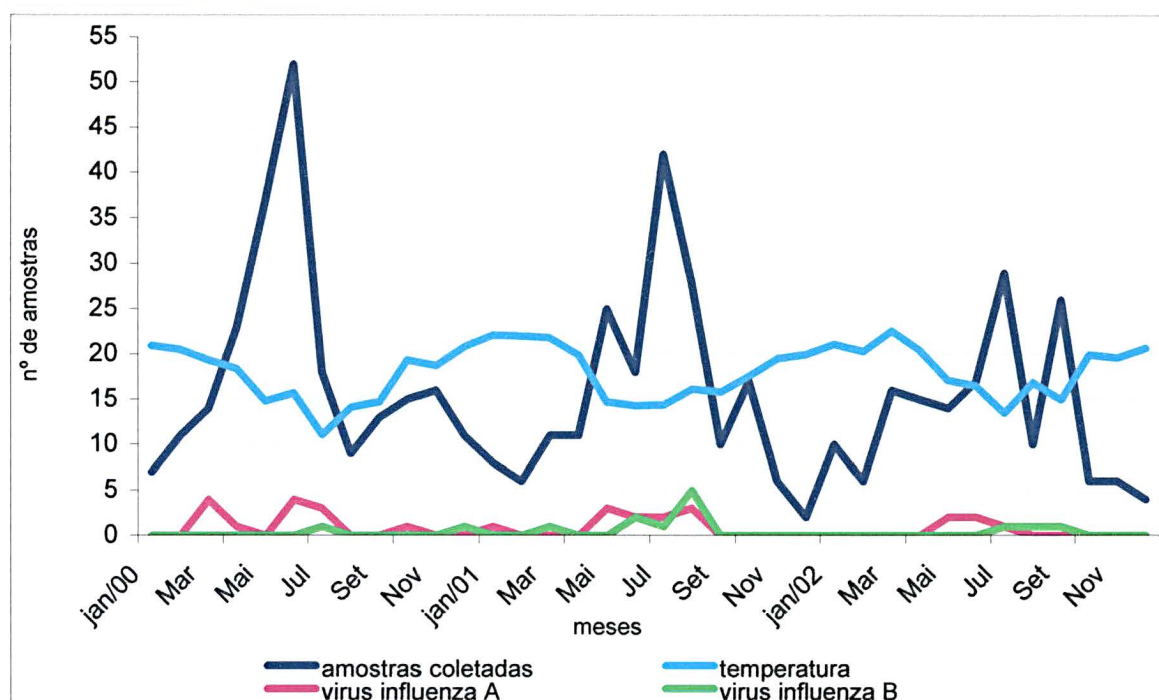
No gráfico 9 se observa a distribuição dos vírus influenza em relação às temperaturas médias anuais no período de 3 anos, 2000 a 2002. O gráfico demonstra que, nas temperaturas mais baixas ocorreu maior número de amostras coletadas, apresentando um coeficiente de correlação linear de - 0,5666 e amostras positivas para influenza tipo A e tipo B com coeficiente de correlação linear de - 0,4595 e - 0,3478, respectivamente, indicando que, quanto menor a temperatura maior o número de amostras coletadas bem como amostras positivas.

GRÁFICO 8 - INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B EM RELAÇÃO ÀS AMOSTRAS COLETADAS NOS PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, ANOS DE 2000 A 2003



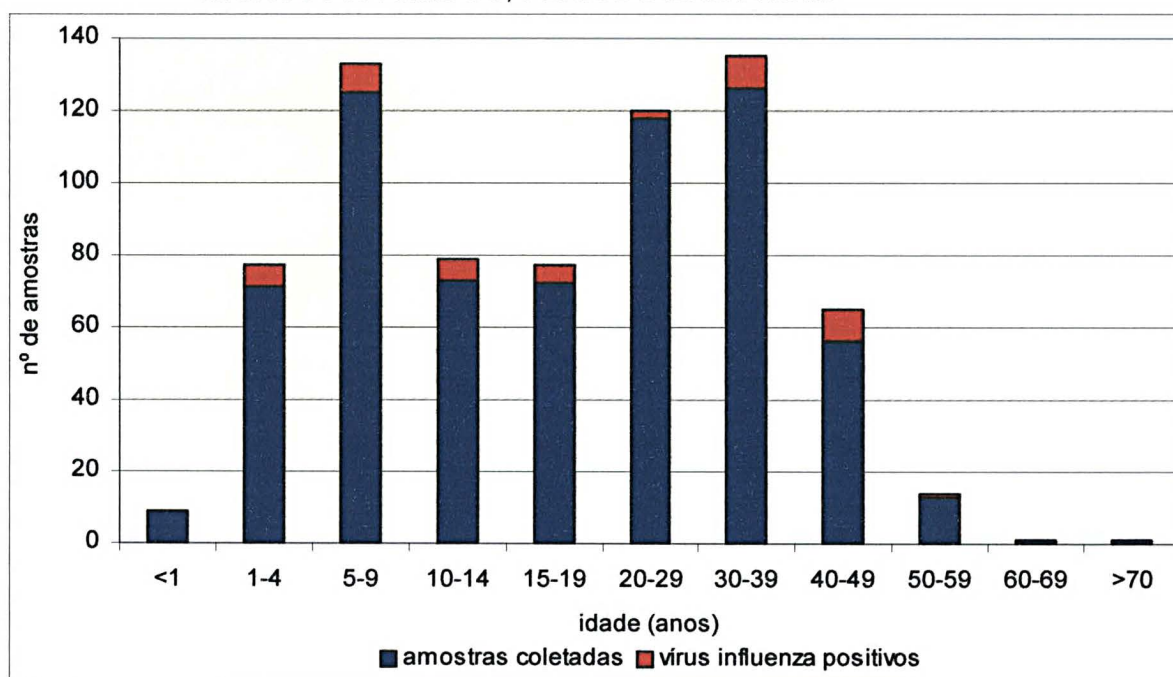
FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR.

GRÁFICO 9 - INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS MÉDIAS ANUAIS NOS PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, NOS ANOS DE 2000 A 2002



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR E SIMEPAR.

GRÁFICO 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS E VÍRUS INFLUENZA DETECTADOS, POR FAIXA ETÁRIA NOS PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS, PERÍODO 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR.

5.2.3 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

O gráfico 10 distribui por faixa etária o número total de amostras coletadas. Observa-se que as idades mais atingidas por doenças respiratórias são as faixas de 5 a 9 anos e 30 a 39, sendo também detectado o vírus influenza nesta população.

Com relação ao sexo, os homens representam 55,8% das amostras. Esses dados não apresentaram significância estatística utilizando-se a regressão logística.

5.3 PACIENTES HOSPITALIZADOS

5.3.1 INCIDÊNCIA

O estudo envolveu a análise de amostras coletadas em anos consecutivos de 2000 a setembro do ano de 2003.

O processamento das amostras e a pesquisa dos antígenos virais foram desenvolvidos de acordo com os protocolos descritos em material e métodos. Os padrões de fluorescência obtidos são aqueles apresentados nas figuras 18, 19 e 20 no item 5.1.1. De um total de 682 amostras incluídas no estudo, obtiveram-se 278 (40,8%) positivas para os diferentes vírus e 404 (59,2%) amostras negativas. Do total das positivas, 31 (11,15%) foram positivas para os vírus influenza e 88,8% de amostras positivas para outros vírus, utilizando-se as metodologias de imunofluorescência e cultura celular, sendo 77,4% para o tipo influenza A e 22,6% para o tipo influenza B (Figura 17).

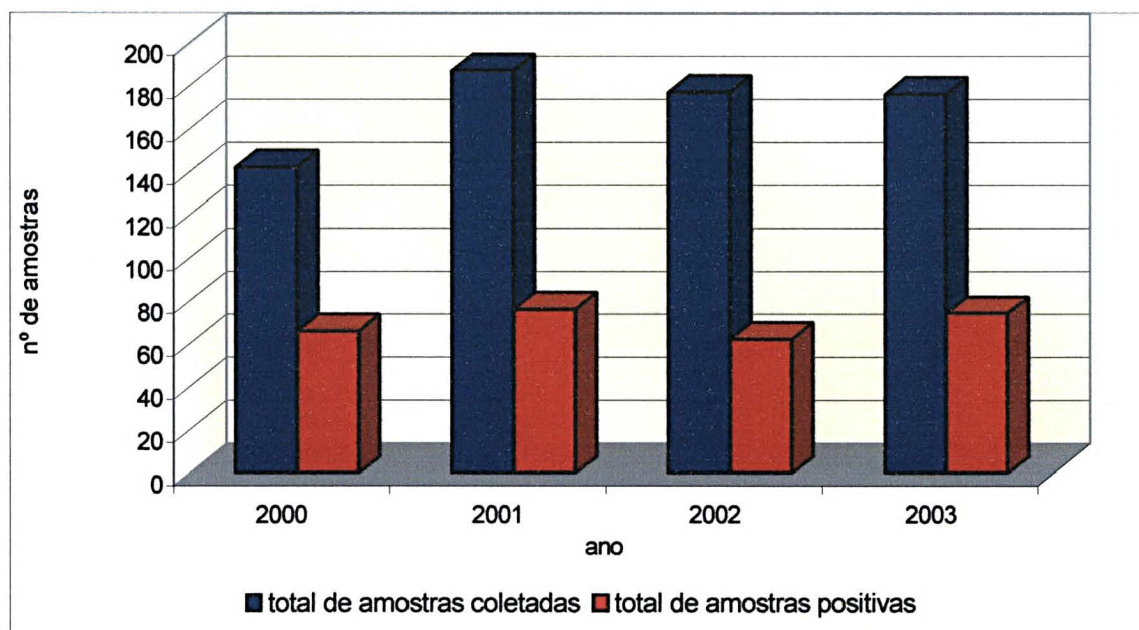
No gráfico 11 estão apresentadas a distribuição das amostras coletadas, e as positivas para os diferentes vírus no período do estudo. Em todos os anos observou-se uma frequência homogênea de amostras positivas para os vírus rotineiramente estudados.

O gráfico 12 apresenta a distribuição dos vírus influenza no período do estudo. O vírus influenza foi o que ocorreu em maior incidência em todos os anos, porém com uma distribuição que oscila de ano para ano. Também no gráfico 12 e tabela 11 observa-se uma incidência mais baixa em 2002 e 2003, 1,7%. A proporção

encontrada para o vírus influenza do tipo A nestes pacientes, foi de 3,8%, com um intervalo de confiança (95%) de 2,2% – 5,1%.

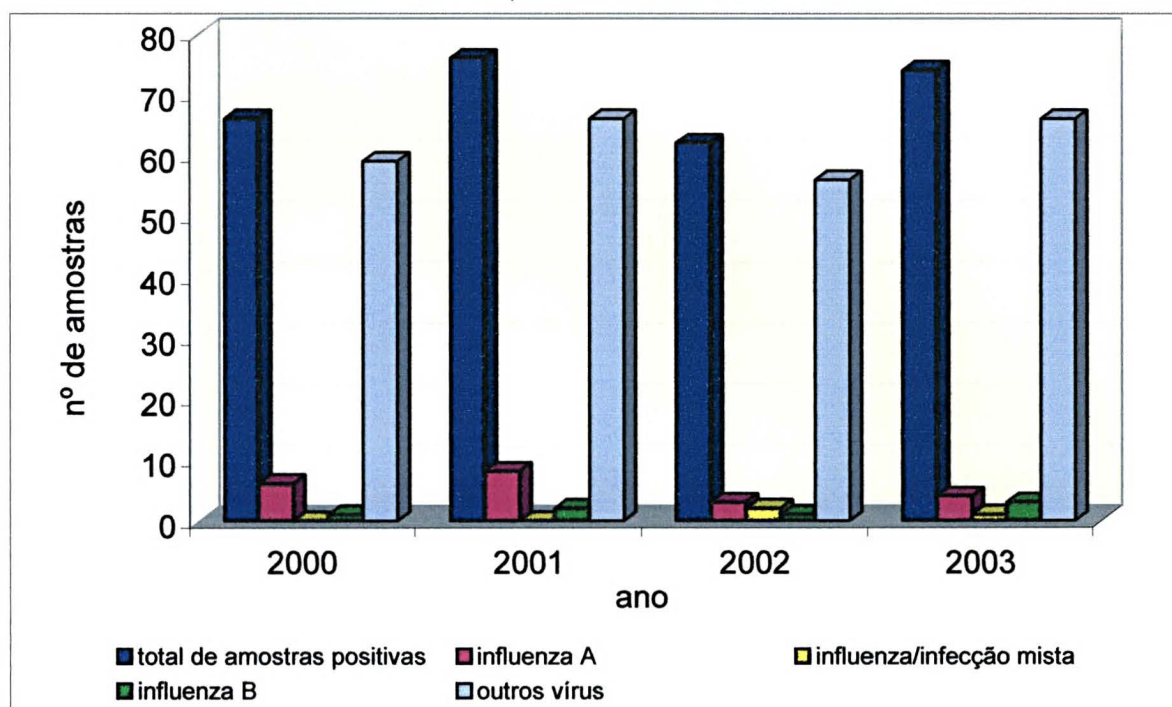
Para o vírus influenza tipo B a incidência foi homogênea, sendo maior no ano de 2003 (1,7%) e nos anos 2000, 2001 e 2002 as taxas variaram de <1 a 1,0%. A proporção encontrada para o vírus tipo B foi de 0,9%, com um intervalo de confiança (95%) de 0,4 – 2,11. Observa-se também uma porcentagem de coinfeção devidas aos vírus influenza A / adenovirus, influenza A / vírus sincicial respiratório. Não foi observada infecção mista no período e 2000 e 2001.

GRÁFICO 11 - NÚMERO DE AMOSTRAS COLETADAS E NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS, PACIENTES HOSPITALIZADOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

GRÁFICO 12 - NÚMERO TOTAL DE AMOSTRAS POSITIVAS E NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA VÍRUS INFLUENZA NOS PACIENTES HOSPITALIZADOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR.

TABELA 11 - INCIDÊNCIA DOS VÍRUS INFLUENZA EM RELAÇÃO AOS OUTROS VÍRUS E AMOSTRAS NEGATIVAS, DE PACIENTES HOSPITALIZADOS, NO PERÍODO DE 2000 a 2003

VÍRUS	IFI e CC+			
	2000 (n=142)	2001 (n=187)	2002 (n=177)	2003 (n=176)
Influenza A	6 (4,2%)	8 (4,3%)	4 (2,3%)	4 (2,3%)
Influenza B	1 (<1%)	2 (1,0%)	1 (<1%)	3 (1,7%)
Infecção Mista	0	0	2 (1,1%) ^{a,b}	1 (<1%) ^b
Outros Virus	59 (41,5%)	66 (35,3%)	56 (31,6%)	66 (37,5%)
Não Reagente	76 (53,5)	111 (59,3%)	114 (64,4%)	102 (57,9%)

FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

NOTA: ^aFLUA/ADENO

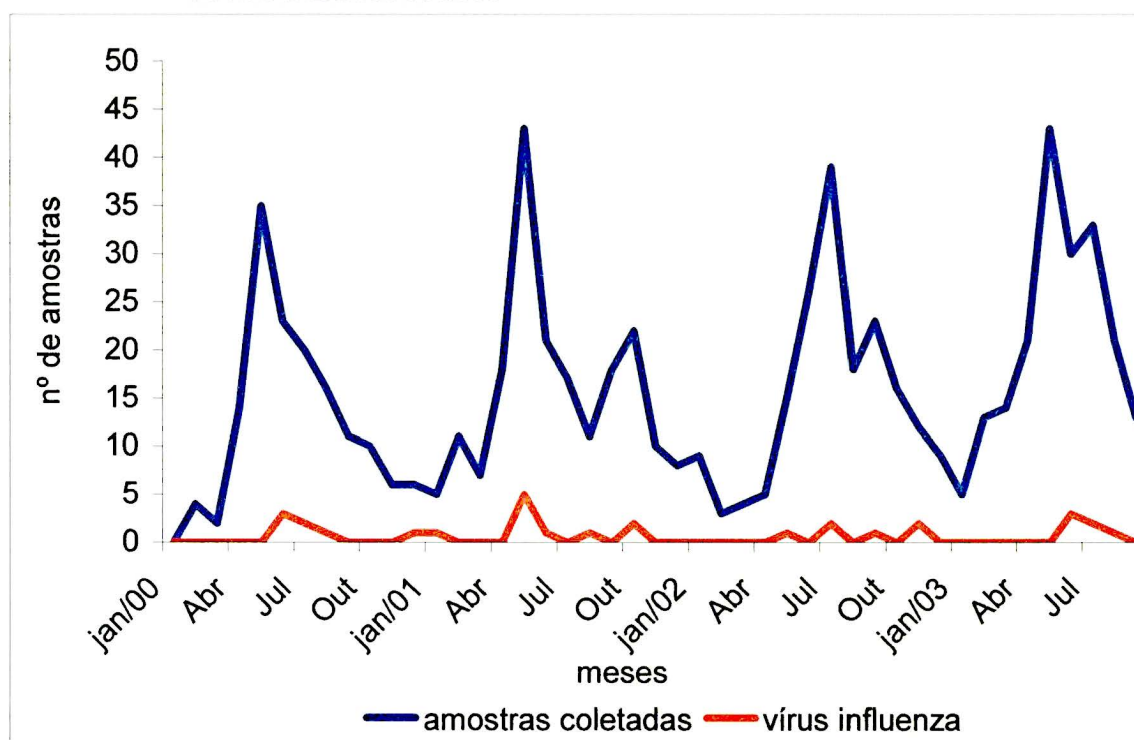
^bFLUA/RSV

5.3.2 SAZONALIDADE

A incidência das viroses respiratórias por vírus influenza A e B foi distribuída trimestralmente, de acordo com o gráfico 13. Observou-se uma taxa maior dos vírus influenza, nos meses de aumento de coleta de amostras, predominando nos meses

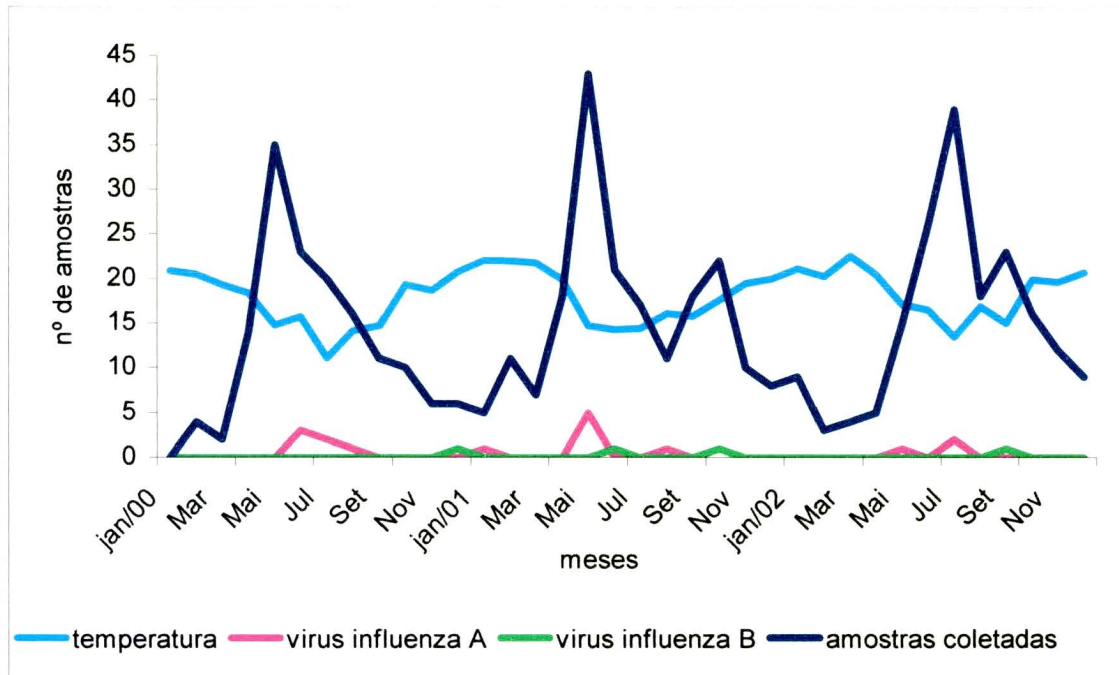
de junho e julho. Inferem-se as mesmas observações quando se analisa o gráfico 14 onde estão apresentadas as coletas e positividade para o vírus em relação às temperaturas médias anuais no período de 3 anos. Nesse gráfico, nota-se que o aumento da coleta de amostras é coincidente a uma maior positividade para os vírus influenza e diminuição das temperaturas. Para análise da quantidade da amostra com relação à temperatura, verifica-se que o coeficiente de correlação linear encontrado é negativo com valor de $-0,7167$, e correlação para a presença de um dos tipos de vírus influenza é de $-0,4528$, para o tipo A é de $-0,4584$ e tipo B é de $-0,1373$.

GRÁFICO 13 - INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS EM PACIENTES HOSPITALIZADOS, NOS ANOS DE 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR.

GRÁFICO 14 - INCIDÊNCIA TRIMESTRAL DOS VÍRUS INFLUENZA TIPOS A E B E AMOSTRAS COLETADAS EM RELAÇÃO ÀS TEMPERATURAS MÉDIAS ANUAIS NOS PACIENTES HOSPITALIZADOS, NOS ANOS DE 2000 A 2002



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR e SIMEPAR

5.3.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

A tabela 12 compara características demográficas e clínicas Dos pacientes hospitalizados, atendidos nos vários serviços do HC-UFPR, que apresentavam sinais ou sintomas compatíveis com diagnóstico de infecção respiratória aguda, relacionados ou não com vírus influenza.

Os fatores associados a “influenza like illness” como: coriza, febre, mialgia, artralgia, cefaléia, tosse, além de dispnéia e apnéia foram avaliados além da idade e sexo.

A maioria dos pacientes era de faixa etária menor de 1 até quatro anos. Nessas idades observou-se uma maior incidência dos vírus influenza, como apresentado no gráfico 15, que apresenta a distribuição por faixa etária dos pacientes hospitalizados incluídos no estudo. A maioria das amostras era proveniente de pacientes do sexo masculino totalizando uma porcentagem 59,2%.

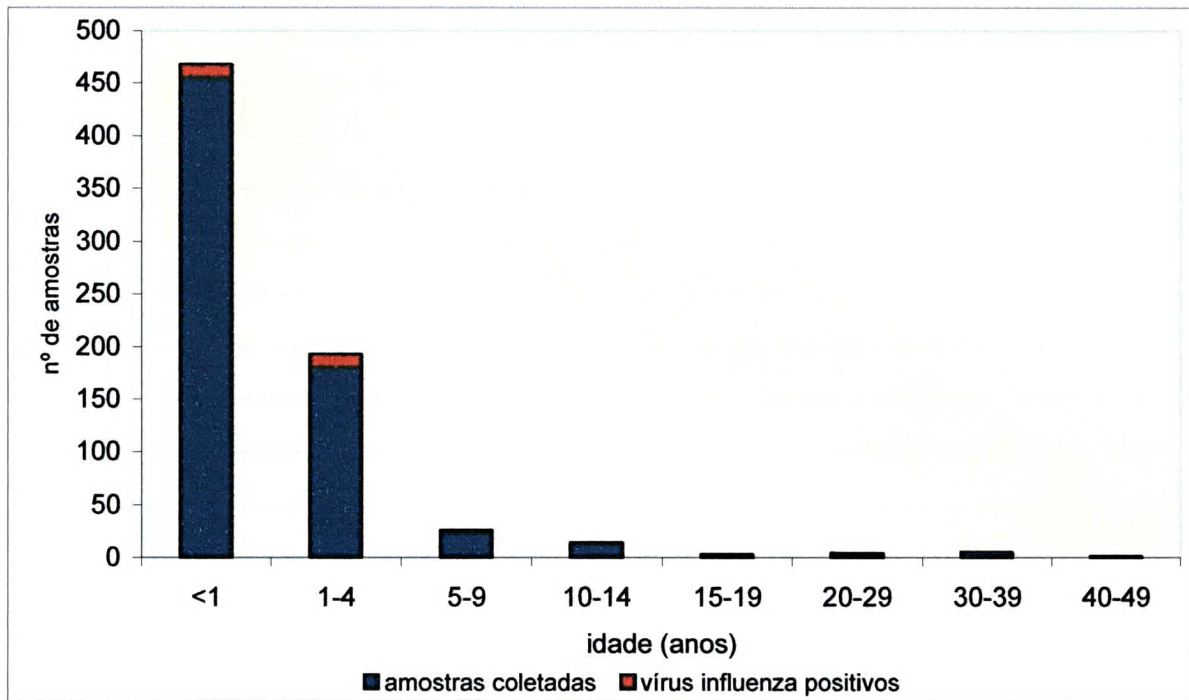
O sinal clínico mais freqüente foi dispnéia em 51,9%, seguidos de febre e tosse em 48,3 e 44,4% dos casos, sendo também relatado apnéia e coriza em menor proporção. Verificou-se que as variáveis, febre ($p = 0,2452$) e tosse ($p = 0,0149$) são significativas para o modelo proposto de regressão logística. A probabilidade de haver presença do vírus nestes pacientes se houver febre e tosse é de 51,98% com um intervalo de 25,5% – 77,4%, se há apenas febre é de 61,88%, intervalo de 41,5% - 78,8% e se há apenas tosse é de 56,5%, intervalo de 35,7% - 75,2%.

TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES HOSPITALIZADOS, NO PERÍODO DE 2000 A 2003

	N	%
Sexo* F	278	40,9
M	404	59,2
Dispnéia	351	51,5
Tosse	330	48,3
Febre	303	44,4
Apnéia	119	17,4
Coriza	79	11,5

FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

GRÁFICO 15 -DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS E VÍRUS INFLUENZA DETECTADOS, POR FAIXA ETÁRIA, PACIENTES HOSPITALIZADOS, PERÍODO 2000 A 2003



FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR.

Os pacientes internados nas clínicas pediátricas foram distribuídos de acordo com a especialidade clínica em pediatria geral, emergência pediátrica (SEC-PED) e unidade de terapia intensiva (UTI). Um total de 676 amostras foi distribuído de acordo com a especialidade médica onde foram coletadas. A maioria das amostras era proveniente de pacientes das clínicas de emergência e unidade de terapia intensiva. Estas foram também às clínicas onde se obteve as amostras influenza positivas (Tabela 13)

TABELA 13 – NÚMERO DE AMOSTRAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS INTERNADOS AGRUPADOS POR CLÍNICA E RESULTADOS POSITIVOS PARA VÍRUS INFLUENZA

Ano/ Clínica	2000		2001		2002		2003	
	N	FLUA/B+	N	FLUA/B+	N	FLUA/B+	N	FLUA/B+
SEC-PED	66	3	92	4	90	2	88	4
UTI-PED	46	3 ^a	68	6	62	2	68	4
Pediatria	32	1	26	0	21	3	17	0

FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR.

NOTA: ^a 1 óbito por influenza

5.4 SUBTIPAGEM POR RT-PCR

Com o objetivo de subtipar o vírus influenza, selecionou-se algumas amostras positivas representativas de cada ano da coleta para posterior análise genômica por PCR e sequenciamento. Os critérios de seleção foram, amostras de pacientes com idade acima de 15 anos, coletadas nos meses de maio, junho ou julho. A identificação dos subtipos H3 e H1 do vírus influenza e vírus influenza tipo B foi realizada utilizando-se a metodologia PCR, especificamente a técnica com transcriptase reversa como descrito no item 4.5.3, em material e métodos. A amplificação do RNA viral seguida da transcrição reversa foi realizada na presença de 3 pares de iniciadores. Na figura 22, observa-se o tamanho dos produtos obtidos, das amostras positivas, para cada tipo e subtipo dos vírus influenza, encontrados nesse estudo, em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

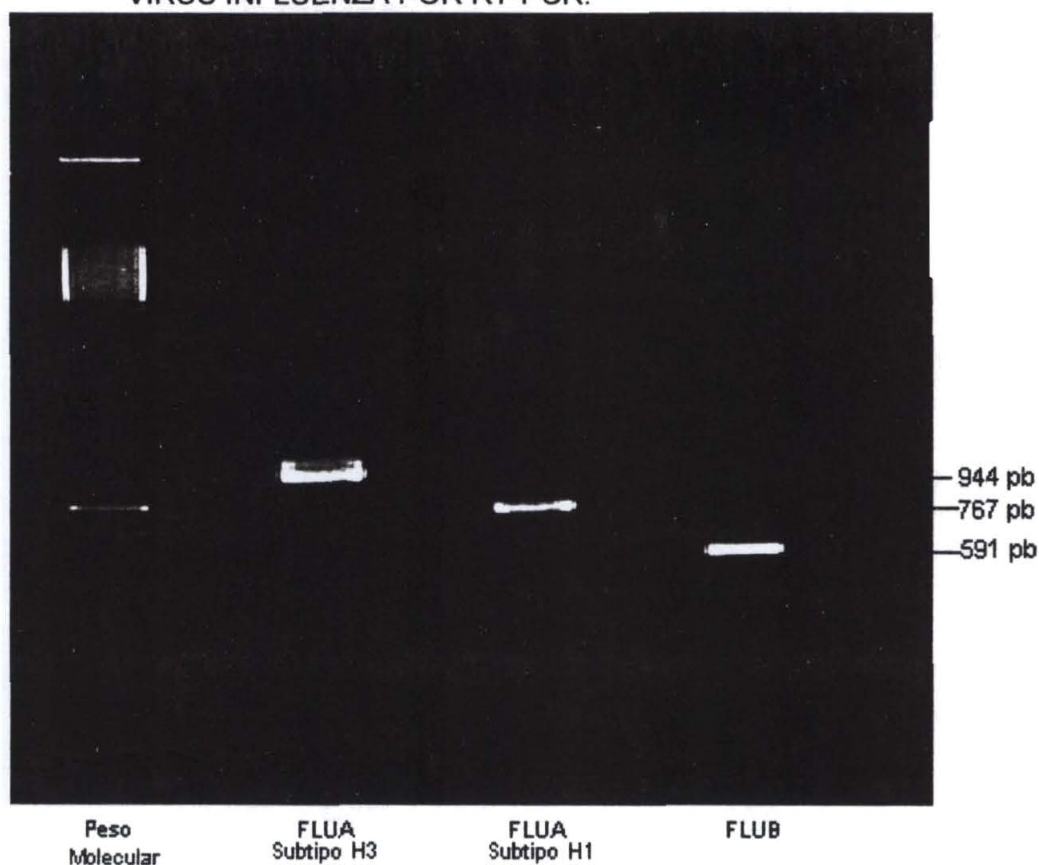
Nos anos de 2000 a 2003, analisaram-se 65 amostras positivas por IFI ou SV. Nesse período detectou-se os subtipos H3, H1 e B. As distribuições dos tipos virais foram irregulares, na tabela 14 apresenta-se relação das amostras testadas e os subtipos encontrados. As Figuras 23 e 24 apresentam os géis de agarose com os produtos obtidos de algumas amostras positivas após a reação de amplificação por RT-PCR, corados pelo brometo de etídeo e visualizados com radiações ultravioletas.

TABELA 14 – SUBTIPAGEM DOS VÍRUS INFLUENZA DE ALGUMAS AMOSTRAS POSITIVAS NO PERÍODO DE 2000 A 2003.

ANO/RESULTADOS	2000 n=20	2001 n=17	2002 n=13	2003 n=15
H1	1	2	3	6
H3	12	0	2	1
B	1	5	2	1
Negativas	6	10	6	6

FONTE: Laboratório de Virologia, HC-UFPR

FIGURA 22 – TAMANHO DOS PRODUTOS OBTIDOS PARA OS DIFERENTES TIPOS DE VÍRUS INFLUENZA POR RT-PCR.



FONTE: Laboratório de Virologia HC-UFPR

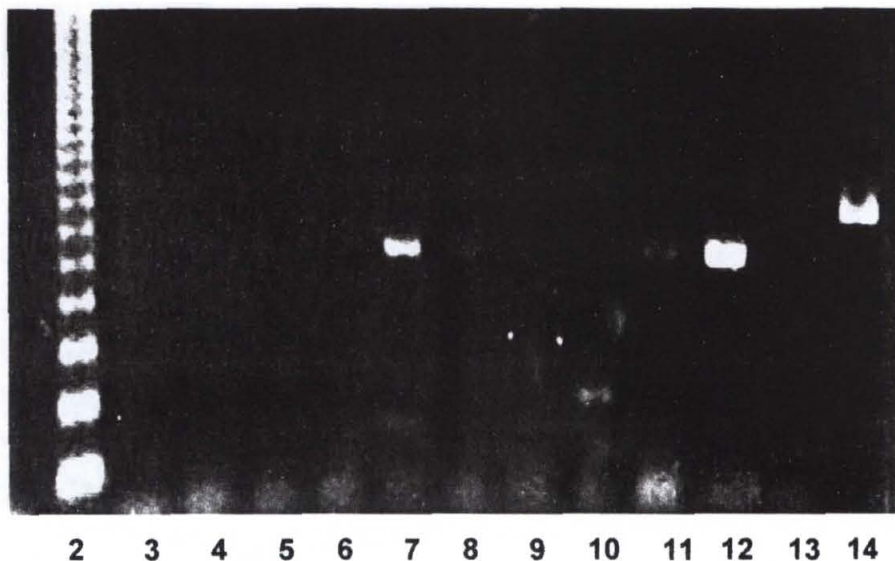
LEGENDA: Linha 1 - Marcador de Peso Molecular.

Linha 3 – Influenza A H1 – 944 pb

Linha 5 – Influenza B – 767 pb

Linha 7 – Influenza A H3 – 591pb

FIGURA 23 - SUBTIPAGEM POR RT-PCR DE ALGUMAS AMOSTRAS SELECIONADAS



FONTE: Laboratório de Vírus Respiratórios, FIOCRUZ.

LEGENDA: Linha 2 - Marcador de Peso Molecular

Linhas 3,4, 6, 9 – Amostras Negativas 11,16, 18 e 30/2000

Linha 5 – Amostra 821/2000 Influenza A H3 (Fraco) 591pb

Linha 7 – Amostra 21/2000 Influenza A H3 591pb

Linha 8 - Amostra 27/2000 Influenza A H3 – 591pb

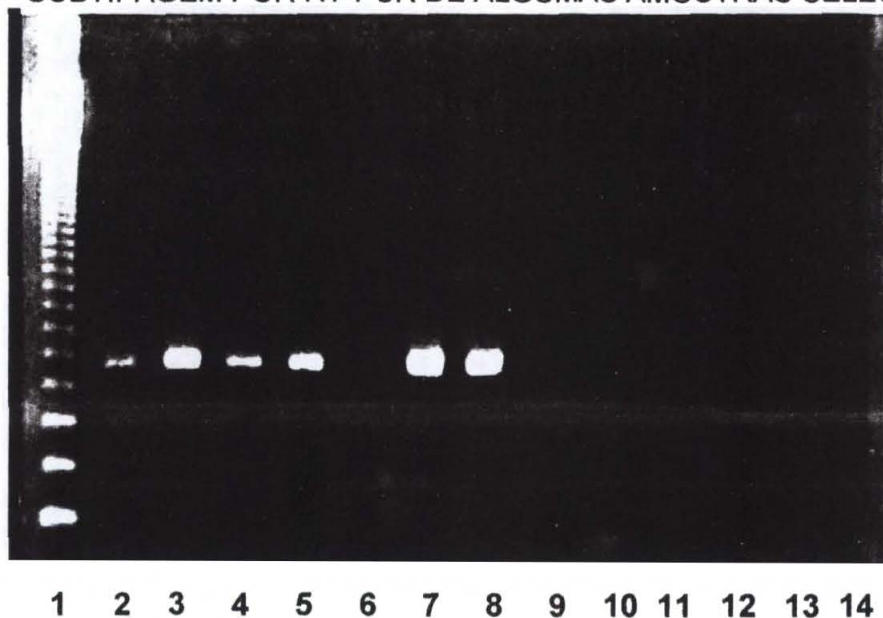
Linha 10 - Amostra 36/2000 Influenza A H1 – 944 pb

Linha 11 e 12 - Amostra 5 e 9/2000 Influenza A H3 – 591pb

Linha 13 – Controle Negativo Água

Linha 14 - Amostra 1530/2000 Influenza B – 767 pb

FIGURA 24 – SUBTIPAGEM POR RT-PCR DE ALGUMAS AMOSTRAS SELECIONADAS



FONTE: Laboratório de Vírus Respiratórios, FIOCRUZ.

LEGENDA: Linha 1 - Marcador de Peso Molecular

Linhas 2, 3, 4, 5, 7, 8 – Amostras 493/2000; 1258/2000; 1271/2000; 1315/2000; 1408/2000; 1503/2000 -Influenza A H3 – 591 pb

Linhas 6, 9-13 – Amostras Negativas 1494/2000, 81,111,124, 195, 213/2001

Linha 14 – Controle Negativo Água

6 DISCUSSÃO

O estudo mostra que agentes virais tem um papel importante na etiologia de doenças respiratórias agudas em crianças, pacientes imunocomprometidos e pacientes ambulatoriais em Curitiba. Demonstrou-se que as infecções virais são responsáveis por 32,0% dos casos das doenças respiratórias e 25,5% destes são atribuídas aos vírus influenza. Dos pacientes positivos para vírus influenza a maioria deles foi do tipo A, caracterizados por meio das técnicas de imunofluorescência e cultura celular. Algumas amostras positivas foram subtipadas, por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase, transcrição reversa. Observou-se uma circulação dos subtipos H1 e H3 com uma distribuição heterogênea e o tipo B.

Adicionalmente, têm-se levantamentos obtidos da Secretaria Municipal de Saúde, da Prefeitura Municipal de Curitiba, que indicam altas taxas de morbidade e mortalidade, devido a doenças respiratórias, em todas as faixas etárias e com alto grau de pneumonia, sem causa definida em nossa região. Neste sentido, os levantamentos de dados epidemiológicos por meio da vigilância do vírus influenza determinam certos indicadores importantes para a avaliação de medidas preventivas para uma possível epidemia (Brasil, 2002).

O vírus influenza está envolvido em uma proporção importante das doenças respiratórias, na população estudada, em concordância com outros relatos onde os vírus influenza contribuem com a elevação das taxas de morbidade observadas durante o inverno (MONTÓ; ARNOLD, 2002, p. 7S-8S). Neste contexto, é importante conhecer a epidemiologia do vírus, desde que, o mesmo apresenta um padrão sazonal, e é facilmente transmitida levando a uma clínica muitas vezes grave.

Zambon (1999) em seu estudo realizado nos anos de 1975 a 1990, no Reino Unido, relata uma estimativa de, 5.000 a 29.000 mortes, não atribuídas ao vírus influenza, isto é, cinco vezes o número diretamente atribuído aos casos notificados pelo agente.

No estudo utilizaram-se as metodologias de imunofluorescência e cultura celular, a técnica de centrifugação rápida "Shell Vial", como métodos rápidos para a detecção de viroses respiratórias e seleção das amostras influenza positivas. O desempenho destas metodologias tem sido largamente demonstrado por vários autores, apresentando boas taxas de sensibilidade e especificidade (COX, *et al.*,

1998; FERNÁNDEZ, *et al.*, 1998; ISON E HAYDEN, 2002; NASCIMENTO, *et al.*, 1991; KIM; LEE; LEE, 2000; MONTO, 2002; NAVARRO-MARÍ, 1999; VIEIRA, *et al.*, 2001).

Atualmente, a metodologia de imunofluorescência é empregada rotineiramente, por ser uma técnica mais acessível quanto ao custo e rapidez na obtenção dos resultados, de relativa facilidade para seu desenvolvimento e apresentarem boa sensibilidade e especificidade, aproximadamente 85,9 e 87,1% quando comparada a metodologia de shell vial, respectivamente e 69 e 97% quando comparada a cultura convencional (HORTAL *et al.*, p. 137-142, 1985; IRMEN; KELLEHER, 2000, p. 396; NOYOLA *et al.*, 2000, p. 1162-1163).

Relata-se que a utilização da técnica de shell vial aliada à técnica de imunofluorescência apresentam um pequeno aumento da sensibilidade e especificidade para a detecção do vírus influenza. A metodologia de shell vial foi padronizada para minimizar as desvantagens da metodologia de cultura tradicional pois, representa uma redução de custo, requer um menor volume de reagentes e a grande vantagem em relação a cultura convencional, na obtenção dos resultados que se dá de 24 horas a 5 dias e é menos laboriosa (SHIH *et al.*, 1999, p.77-80; NAVARRO-MARI *et al.*, p. 2346-2347, 1999).

A cultura celular é considerada “padrão ouro” para a confirmação do diagnóstico em virologia. Porém o sucesso para o isolamento viral depende de alguns fatores determinantes, como, coleta da amostra no início dos sinais e sintomas, transporte imediato ao laboratório, preferencialmente em meio de transporte e na temperatura de 2-8 °C, com o objetivo de manter a viabilidade viral, o processamento imediato e adequado, além de alto título de partículas virais na amostra, ainda deve-se considerar a inativação da partícula viral pelo sistema imune e a sensibilidade da linhagem celular a ser utilizada (SHIH *et al.*, 1999; OLSEN *et al.*, 1993; MAITREYI, 2000; NOYOLA *et al.*, 2000).

No estudo, além da IFI, utilizaram-se as técnicas de shell vial, para a seleção das amostras positivas para vírus influenza e posteriormente os sobrenadantes positivos foram inoculados em tubos para o isolamento por cultura celular convencional com o intuito de aumentar a carga viral para os ensaios de inibição de hemaglutinação e as técnicas de biologia molecular. Iniciou-se a padronização da técnica de cultura celular no laboratório de virologia do HC-UFPR em meados do

ano de 2001. Até adequação das linhagens celulares no laboratório e a padronização das técnicas de shell vial, as amostras coletadas mantiveram-se congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, fator que associado a outros interferentes, resultaram em uma diminuição da sensibilidade e especificidade da metodologia. A técnica de RT-PCR multiplex para a tipagem do vírus, foi utilizada para tipar as amostras positivas desde que a mesma tem demonstrado boas taxas de sensibilidade e especificidade.

Estabelecer protocolos diagnósticos e conhecer o impacto do vírus influenza em nossa população, certamente contribuirá na compreensão da epidemiologia do patógeno, no estabelecimento de estratégias terapêuticas e epidemiológicas para minimizar o impacto do vírus.

Nesse trabalho, determinou-se uma incidência importante dos vírus influenza em uma população, que incluem pacientes ambulatoriais, imunossuprimidos e hospitalizados.

Pacientes ambulatoriais foram avaliados apresentando uma porcentagem de amostras, influenza positiva de 67,1% do total dos resultados positivos para todos os vírus estudados. A taxa variou ao longo dos quatro anos, sendo maior no ano de 2000, onde a taxa encontrada foi de 35,6%. Especificamente durante o ano de 2000, manteve-se uma técnica treinada para a seleção e coleta das amostras de pacientes que apresentavam os sintomas "flu-like" estabelecidos no estudo. Acredita-se que o acompanhamento e a seleção criteriosa destes pacientes aumentou o número de amostras positivas. O vírus influenza do tipo A foi o mais incidente nos anos de 2000, 2001 e 2003. No ano de 2002 as taxas mantiveram-se entre 14,0 e 16,0%. Nesse mesmo ano observa-se uma taxa mais elevada de influenza do tipo B em relação ao tipo A. Paiva e colaboradores (2003) descrevem neste mesmo ano, um surto de influenza similar à estirpe B / Hong Kong no Brasil, os dados foram obtidos por meio da vigilância epidemiológica do vírus influenza de janeiro a outubro de 2002, foi demonstrada a circulação da estirpe viral na região sudeste e centro oeste do Brasil. Neste mesmo estudo demonstrou-se a importância da vigilância desde que, crianças foram acometidas em uma proporção mais elevada e com maior severidade.

Foi observada no estudo taxa de infecção mista com vírus influenza em proporções relativamente baixas, com exceção do ano de 2001 que foi de 4,1%. Considerando, o caráter sazonal das viroses respiratórias e sua cocirculação,

admite-se a ocorrência de infecção mista e estas são devidas, principalmente aos vírus influenza do tipo A e vírus sincicial respiratório (GILCHRIST *et al.*, 1994; BOYCE *et al.*, 2000; ZAMBON, 2001; NEUZIL *et al.*, 2003).

Coletaram-se amostras de todas as faixas etárias, de menor de 1 a 70 anos, onde se observou uma incidência de positividade para o vírus influenza. Porém, houve predomínio de amostras coletadas bem como amostras positivas na faixa etária de 20-29 anos. Este dado é relevante visto que, em adultos saudáveis, o vírus influenza, pode causar uma doença febril de duração de 1-2 semanas. A infecção em adultos é responsável por uma alta porcentagem de visitas as unidades de saúde, dias de ausência no trabalho e utilização de serviços de emergência (ZAMBON, 1999; GREENBERG, 2002). Neuzil e colaboradores, 2003, descrevem em seu estudo que, 42-67 pacientes por 1000 indivíduos, sem condição de risco identificada visitaram o serviço ambulatorial de saúde devido a infecção por vírus influenza ou vírus sincicial respiratório. Entre os indivíduos em condição de risco o impacto é maior estimado em 115-136 pacientes por 1000 indivíduos fizeram mais do que uma visita médica.

A incidência de amostras positivas, para vírus influenza, em relação ao total de amostras positivas foi de 26,8%, em pacientes imunossuprimidos. O vírus influenza do tipo A foi o mais incidente nos anos 2000, 2001 e 2003, porém no ano de 2002 o tipo B mostrou uma pequena elevação em relação ao tipo A, achado que poderá estar relacionado com o surto descrito por Paiva e colaboradores (2003), e concordante com os nossos achados que também demonstram uma taxa maior de vírus influenza do tipo B em pacientes ambulatoriais. Também, no ano de 2001, observa-se um aumento na taxa do vírus influenza tipo B nos pacientes imunossuprimidos, indicando uma possível transmissão dentro da unidade, reafirmando a importância de se manter uma vigilância constante, bem como, a padronização de métodos diagnósticos sensíveis e específicos. O número de pacientes imunocomprometidos tem aumentado extensivamente, desta forma, postula-se grandes avanços na área de prevenção. Tem sido descrita, por vários autores, a incidência das viroses respiratórias em pacientes imunocomprometidos, sendo o vírus influenza um dos agentes importantes envolvidos nas doenças respiratórias. Estes estão sujeitos a alguns fatores como, idade, exposição comunitária ou nosocomial, contato com crianças, estado de imunidade específica,

grau de imunossupressão e natureza da epidemia, que determinam o desenvolvimento da infecção e complicações. Alguns trabalhos determinam uma baixa incidência do vírus (0-2%) e outros relatam uma incidência maior que 29% (RABELLA *et al.*, 1998, p. 1043-1049; ISON; HAYDEN, 2002, p. 355-358).

Pacientes hospitalizados apresentaram uma taxa de 11,1% de amostras positivas para o vírus influenza, do total de amostras positivas para os diversos vírus, sendo o tipo A mais incidente em todos os anos. Em relação à faixa etária, a grande maioria das amostras coletadas, e onde se detecta amostras positivas para vírus influenza, estão entre as idades de menos de 1 até 4 anos e estes achados são similares aos relatos de outros autores (PELUFFO *et al.*, p. 218-219, 1986; KIM; LEE; LEE, p.155-156, 2000; CARBALLAL *et al.*, p. 173, 2001; STRALIOTTO *et al.*, 2002; NICHOLSON *et al.*, p. 228-229, 2003; HEIKKINEN *et al.*, p. 203-205, 2003; FORSTER, p. 215-216, 2003; LAUNDY *et al.*, p. 225-226, 2003).

Uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em crianças no mundo são as infecções do trato respiratório. O vírus influenza está implicado em uma proporção importante destes pacientes, manifestando uma diversidade de sinais e sintomas clínicos do trato respiratório e também apresentando doenças severas (PELUFFO *et al.*, p. 218-219, 1986; KIM; LEE; LEE, p.155-156, 2000; CARBALLAL *et al.*, p. 173, 2001; STRALIOTTO *et al.*, 2002; NICHOLSON *et al.*, p. 228-229, 2003; HEIKKINEN *et al.*, p. 203-205, 2003; FORSTER, p. 215-216, 2003; LAUNDY *et al.*, p.225-226, 2003).

São poucos os dados da prevalência das infecções por vírus influenza em pacientes pediátricos em nosso país. Recentemente tem se procurado estabelecer uma vigilância destas infecções em nossa comunidade, amostras coletadas de pacientes com sintomatologia "flu-like" pelo sistema de informação de vigilância epidemiológica do vírus influenza no Brasil (BRASIL, 2003), demonstrou em pacientes com idade de 0 a 4 anos uma frequência dos vírus influenza A de 19% e influenza B de 1,5%, sendo que esta faixa etária constituiu no maior número de amostras coletadas, 36,5% (VIEIRA *et al.*, 2001).

Nestes pacientes, também se observou, infecção mista com vírus sincicial respiratório e vírus parainfluenza, provavelmente devido a cocirculação.

A cidade de Curitiba está localizada a uma latitude de 25°25'48"(sul), longitude de 49°16'15"(oeste), altitude média de 908 metros, possui um clima

temperado, com temperaturas, média de verão de 21°C e inverno de 13°C e pluviosidade de 1500 milímetros por ano (www.totaltrade.com.br/PAGES/CURITIBA_2). Estas características geográficas facilitam a manutenção do vírus na comunidade. O agente apresenta grande labilidade a variações de temperaturas, sendo que a viabilidade é maior em temperaturas mais baixas, também são sensíveis as umidades, isto é, são mais susceptíveis a ambientes mais úmidos.

No estudo, observou-se um aumento abrupto de incidência tanto de amostras coletadas como amostras influenza positiva nos meses de menor temperatura, nos diferentes grupos de pacientes. Observa-se que a maioria das amostras coletadas se concentram nos meses de junho e julho, sendo também os meses de maior incidência do vírus influenza, nota-se que em pacientes imunossuprimidos este padrão difere sutilmente, apresentando uma oscilação ao longo dos meses subseqüentes. Os parâmetros obtidos através da análise por coeficiente de correlação linear demonstram uma similaridade entre os valores demonstrados nos diferentes grupos, inclusive nos pacientes imunossuprimidos. Há uma correlação negativa entre a temperatura e a quantidade de vírus influenza encontrados nas amostras coletadas, isto é, quanto menor a temperatura maior a quantidade de vírus por amostras.

A sazonalidade do vírus influenza tem sido identificada em vários estudos epidemiológicos, porém as razões para esta definição ainda são incógnitas. Há uma associação entre o excesso, de visitas médicas e a circulação dos vírus nos meses de inverno nas diversas faixas etárias e em pacientes saudáveis ou de grupo de risco, imunossuprimidos, cardiopatas ou que apresentem doenças crônicas respiratórias. A avaliação de indicadores com índices de mortalidade e morbidade, associados, a subtipagem das cepas circulantes, determinam a atividade do vírus, bem como, estabelecem as estações do vírus influenza e época de vacinação. Adicionalmente, o estudo da sazonalidade poderá determinar a probabilidade de certa doença respiratória viral acontecer (ARRUDA *et al.*, 1991; CARBALLAL *et al.*, 2001; STRALIOTTO *et al.*, 2002; MONTTO, 2002; NEUZIL *et al.*, 2003).

O aumento da prevalência do vírus nos períodos de abril a julho foi demonstrado no estudo, bem como o padrão sazonal. Estes achados foram relatados no Paraná, em pacientes imunossuprimidos e em outros estados

brasileiros (NASCIMENTO *et al.*, 1991, p. 288-289; STRALIOTO *et al.*, 1998, p. 3-4; VIEIRA *et al.*, 2001, p. 128-129; RABONI *et al.*, 2002, p. 143-144).

Os pacientes ambulatoriais foram avaliados quanto aos sinais clínicos, sendo predominantes a coriza, febre e tosse com valores acima de 80%. Contudo, a análise, por meio do método estatístico, regressão logística, do mesmo dado clínico, para os indivíduos que apresentaram vírus influenza, pelos métodos de IFI e SV, obteve-se que a febre e mialgia foram variáveis significativas, pelo modelo proposto de regressão logística, porém, com um intervalo de probabilidades, muito amplo. Este dado indica que a análise em separado dos dados clínicos tem baixas sensibilidade e especificidade (MONTA, 2002; MONTALTO, 2003).

Os sintomas adotados para diagnosticar clinicamente a "influenza-like illness" incluem, febre, coriza, tosse, mialgia, odinofagia, cefaléia. Infecções por vírus influenza, resfriados comuns e bactérias causam sintomas similares do trato respiratório superior, podendo apresentar variações quanto a intensidade, severidade e frequência dos sintomas. Determinar a presença do vírus influenza, baseada nos sinais clínicos, torna-se difícil, devido à baixa especificidade desse diagnóstico e baixa sensibilidade dos achados clínicos. Porém, esses dados quando avaliados em associação com levantamentos epidemiológicos podem aumentar a especificidade do diagnóstico clínico (MONTALTO, p. 111-114, 2003).

Boivin e colaboradores descrevem que, infecção por vírus influenza, durante os períodos de epidemia, indica que febre e tosse, utilizando-se o método de regressão logística, tem valor preditivo positivo de 86,8%, sensibilidade de 77,6% e especificidade de 55,0%. Outro estudo demonstra também que tosse e febre tem o melhor valor preditivo (BOIVIN *et al.*, p. 1166-1169, 2000; MONTA, *et al.*, p. 3247, 2000).

Pacientes imunossuprimidos não foram avaliados quanto à clínica, em virtude da dificuldade de se estabelecer critérios clínicos específicos para doença respiratória.

O impacto das infecções do trato respiratório em populações de alto risco, como pacientes com asma ou bronquites crônicas estão confirmados em vários estudos. Pacientes imunossuprimidos parecem ser altamente susceptíveis as mesmas viroses que circulam na população em geral. A imunossupressão pode

originar complicações respiratórias muito importantes nestes pacientes levando-os até a morte (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998; RABONI *et al.*, 2002).

Realizou-se uma análise prospectiva dos pacientes hospitalizados, levantando dados clínicos, sendo, dispnéia, febre e tosse os sinais clínicos mais prevalentes. Porém, quando se utiliza o método estatístico de regressão logística, encontrou-se diferença significativa entre as variáveis, febre e tosse, associados aos resultados obtidos por IFI e SV. Estes pacientes apresentavam idade de 0-4 anos. Porém, quando se analisa o intervalo de probabilidade para estas variáveis, observa-se que estes são muito amplos, sendo a utilização destes critérios de provável baixo valor de sensibilidade para o diagnóstico clínico, como discutido para os pacientes ambulatoriais.

Os vírus influenza estão associados às hospitalizações de pacientes pediátricos por infecções do trato respiratório inferior com grande frequência (PELUFFO *et al.*, 1986; SUTMOLLER *et al.*, 1983; MEQDAM *et al.*, 2000; STRALIOTTO *et al.*, 2002; LAUNDY *et al.*, 2003; HEIKKINEN *et al.*, 2003; NICHOLSON *et al.*, 2003).

No presente estudo demonstra-se que 48,3% dos pacientes incluídos eram pediátricos. Esses pacientes foram agrupados por especialidade clínica em serviço de emergência pediátrica, unidade de terapia intensiva e pediatria geral. Observou-se que os serviços de emergência pediátrica e unidade de terapia intensiva continham a maioria dos pacientes e onde se encontrava a maioria das amostras positivas. Foi relatado um óbito na unidade de terapia intensiva e foi atribuído a infecção por influenza.

Infecções respiratórias são as causas mais comuns de doenças na infância. A razão mais comum de atendimento médico e hospitalização, nestes pacientes, é atribuída às infecções do trato respiratórias inferior, sendo que um dos agentes mais incidente é o vírus influenza. Está comumente relatado por autores de todo o mundo o excesso das taxas de morbidade e mortalidade não atribuídas ao vírus influenza. Sendo que, estas taxas justificam a possibilidade de se adotar a vacinação em crianças, principalmente porque estas têm um papel fundamental na transmissão do vírus (REICHERT *et al.*, p.889-896, 2001; FORSTER, p. 215-217, 2003).

Principi e colaboradores, 2003, demonstram em seu estudo, o impacto socioeconômico do vírus influenza em crianças saudáveis e constatam que o mesmo

é responsável por complicações clínicas, especialmente em crianças com idade abaixo de 2 anos, e também é responsável por um grande número de hospitalizações, atendimentos médicos e uso de antibióticos. Os autores sugerem a prevenção por meio da vacina em todas as faixas etárias e em pacientes saudáveis e afirmam que a medida reduz significativamente custos indiretos e diretos (PRINCIPI *et al.*, 2003).

Neste estudo levantou-se dados de vacinação, porém para grande maioria dos pacientes não havia esta informação. O dado de vacinação só foi possível para pacientes ambulatoriais, para os quais, se utilizou a ficha para coleta de dados. Observou-se que somente 7,7% dos indivíduos receberam vacinação, sendo 92,3% não vacinados, e do total de pacientes vacinados, 23,8% apresentaram resultado positivo para vírus influenza.

Os programas de imunização preconizam o uso da vacinação para indivíduos de qualquer idade e pertencentes a grupos de risco para complicação por vírus influenza, como descrito no item 2.10 na revisão de literatura. Atualmente o comitê que estabelece a utilização da vacina, American Advisory Committee on Immunizations Practices, no ano de 2003, tem encorajado a utilização da vacina para crianças de 6 a 23 meses de idade e seus contatos. Algumas estratégias e intervenções têm sido implementadas para o encorajar a vacinação em crianças (QUACH *et al.*, p197-198, 2003; BRIDGES *et al.*, 1-36, 2003).

Nas amostras selecionadas para subtipagem, por meio da PCR, observou-se a ocorrência dos subtipos H1 e H3 do vírus influenza tipo A e o tipo B. Das amostras testadas, no ano de 2000 observou-se no subtipo H3 em maior número, no ano subsequente foi o subtipo H1, sendo que o H3 não foi detectado, em 2002 novamente detectou-se H1, mas com presença de H3, e finalmente as amostras do ano de 2003 mostraram que o subtipo H1 foi detectado nas amostras testadas com maior frequência que o H3. A análise molecular, das amostras selecionadas, apresentou limitações que não permitem concluir sobre a prevalência desses subtipos na nossa população, esses dados devem ser mais bem avaliados.

A Agenda Global de Vigilância do Vírus Influenza tem como uma das suas prioridades a coleta de dados efetivos para a formulação da vacina. Para isso, a coleta de amostras e a caracterização das cepas que circulam no mundo, são

fundamentais, desde que os vírus influenza estão sujeitos a variações antigênicas (EUA, WHO Global Influenza Programme).

A importância de se coletar estes dados, é que a efetividade da vacina está estreitamente relacionada com a similaridade das cepas que compõe a vacina e dos vírus que estão circulando, um ou dois, dos três componentes da vacina tipicamente estão presentes a cada ano. Assim, a vigilância epidemiológica, responsável pelo isolamento, tipagem e subtipagem do vírus e a vigilância da doença, são necessárias para a identificação das variantes dos vírus influenza e pode determinar a habilidade da transmissão e impacto da doença. Estas informações são fundamentais para a formulação da vacina a cada ano (BRAMMER *et al*, 2000).

O vírus influenza causa sérias doenças em humanos principalmente por sua variabilidade antigênica, podendo resultar em um fenótipo benigno ou uma cepa potencialmente virulenta. Assim, a expectativa por uma nova pandemia é uma incerteza. Vários relatos têm demonstrado o impacto do vírus no mundo, no mês de janeiro de 2003, em Michigan houve relatos de uma severa e inexplicável doença com morte de crianças e adultos jovens menores de 21 anos. Posteriormente, duas mortes foram associadas com influenza e para identificar casos de gripe em crianças saudáveis e jovens menores de 21 anos, foi instaurado um programa de vigilância mais efetivo do vírus influenza indicando uma melhor definição da frequência de sérias complicações por influenza em crianças saudáveis e melhor avaliar os achados para incorporar ao programa de imunização para crianças (WILKINS, *et al.*, 2003).

Relatou-se neste estudo o envolvimento do vírus influenza nas diferentes categorias de pacientes. Onde se obteve para cada grupo dados de incidência, sazonalidade, perfil clínico, perfil de vacinação, sexo, idade e caracterização antigênica do vírus. Com este estudo foi possível conhecer o perfil dos pacientes acometidos pelo vírus influenza em nossa região, bem como, estabelecer um protocolo de diagnóstico laboratorial no nosso hospital, que certamente trará muitos benefícios aos nossos pacientes. Os resultados encontrados são similares aos estudos de outros autores, que reafirmam a importância do levantamento de dados sobre o vírus influenza com o objetivo de conhecer este agente imprevisível que se perpetua, e faz parte dos relatos de Hippocrates e Thucydides. Transcrevendo as palavras de Webster (1997), este pesquisador que dedica sua vida ao estudo do

agente: "Dada à certeza que haverá uma outra pandemia pelo vírus influenza humano, nós devemos devotar tanto esforço quanto muitas pesquisas são necessárias para desenhar estratégias de defesa e um plano de batalha para lidar com o que poderá ser uma catástrofe".

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitiram algumas conclusões:

- 1 A incidência dos vírus respiratórios obtidos nesse estudo foi de 31,7%.
- 2 Das amostras positivas para os diferentes vírus, detectou-se uma incidência de vírus influenza de 27,4%, sendo 80% tipo A e 20% tipo B.
- 3 A incidência de vírus influenza para pacientes ambulatoriais, imunossuprimidos e hospitalizados foi de 54,9%, 18,4% e 8,6% para tipo A e 12,2%, 8,37% e 2,5% para o tipo B do vírus influenza respectivamente.
- 4 Observou-se uma correlação negativa entre a temperatura e a quantidade de vírus encontrados nas amostras coletadas, isto é, quanto menor a temperatura maior a quantidade de vírus por amostras. Esta mesma correlação foi observada quando se analisou o tipo A e B em separado.
- 5 Verificou-se que as variáveis mialgia e febre para os pacientes ambulatoriais, febre e tosse para os pacientes hospitalizados, foram significativas para o modelo proposto de regressão logística. As probabilidades de haver a presença do vírus no organismo foram significativas, porém com intervalos grandes de probabilidades.
- 6 Observou-se que o número de amostras positivas para vírus influenza de pacientes hospitalizados, com predomínio de idade de meses a 4 anos, foi maior nas clínicas de emergência e unidade de terapia intensiva.
- 8 Com a subtipagem detectou-se a presença dos subtipos que comumente têm sido encontrados mundialmente H3, H1 e B.
- 9 Os diferentes grupos de pacientes mostraram uma heterogeneidade de incidência. Sendo maior nos pacientes ambulatoriais.

- 10 Análises de caracterização genômicas são as propostas para a continuidade do trabalho.

- 11 Demonstrou-se que o vírus influenza tem um impacto importante na comunidade estudada, também se determinou o padrão sazonal do vírus na nossa região. Além disso, o estudo sugere que a continuidade da vigilância e avaliação de indicadores epidemiológicos são importantes para estabelecer medidas de prevenção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-JABRI, A. A.; WIGG, M. D.; OXFORD, J. S. Initial *in vitro* screening of drug candidates for their potential antiviral activities. In: MAHY, B. W. J.; KANGRO, H. O. **Virology Methods Manual**. 1. ed. London: Academic Press, 1996, p. 309-322.

ARRUDA, E. *et al.* Acute Respiratory Viral Infections in Ambulatory Children of Urban Northeast Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, n. 164, p. 252-258, 1991.

BOIVIN, G. *et al.* Predicting Influenza Infections During Epidemics with Use of a Clinical Case Definition. **Clinical Infectious Diseases**, Washington, v. 31, p. 1166-1169, 2000.

BOOM, R. *et al.* Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990.

BOYCE, T. G. *et al.* Rates of Hospitalization for Respiratory Syncytial Virus Infection among Children in Medicaid. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 137, p. 865-870, 2000.

BRAMMER, T. L. *et al.* Surveillance for Influenza – United States, 1994-95, 1995-96, and 1996-97 Seasons. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, vol. 52, n. RR 08, p. 1-36, Apr 25 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde – FUNASA. Projeto Vigilância Epidemiológica da Influenza no Brasil – 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informações de Saúde. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>> Acesso em 17 out. 2002.

BRIDGES, C. B. *et al.* Prevention and Control of Influenza. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, vol. 49, n. SS-3, Apr. 2000.

BRIDGES, C. B. *et al.* Prevention and Control of Influenza. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, vol. 52, n. RR08, p. 1-36 Apr. 25 2003.

BRITO, N. A. La dansarina: a gripe espanhola e o cotidiano na cidade do Rio de Janeiro. **História, Ciências, Saúde**, Rio de Janeiro, vol. IV, p. 11-30, mar-jun 1997.

CABRAL, M. C. *et al.* ORTHOMYXOVIRIDAE. In: OLIVEIRA, L. H. S. **Virologia Humana**. 1. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. p.110-121.

CARBALLAL, G. *et al.* Multicentered Study of Viral Acute Lower Respiratory Infections in Children From Four Cities of Argentina, 1993-1994. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 64, p. 167-174, 2001.

CDC. CDC Health Advisory. Recommendations to Enhance us Surveillance for Influenza A (H5N1). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/flu/hanH5N1.htm>> Acesso em 13 jan 2004.

CDC. Health AlertNetwork Update. Human Cases of Avian Influenza A (H7N7) Infections. The Netherlands. Enhanced Influenza Surveillance in the United States. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/flu/hanH7N7.htm>> Acesso em 13 jan 2004.

CDC. Update: influenza activity. Severe Morbidity and Mortality Associated with Influenza in Children and Young Adults – Michigan. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 5, n. 35, p. 837-840, September 2003.

CDC. Vaccine Information for the Public and Health Professionals. Disponível em: www.vaccineinformation.org/photos/flu_cdc001.jpg Acesso em: out 2003.

CDC. WHO Global Influenza Programme. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/flu/weekly.htm>> Acesso em: jun 2002 .

CDC. Weekly Report. National Center for Infectious Diseases. Influenza. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/flu/weekly.htm>> Acesso em set. 2003.

Cell Culture. Disponível em: www.bdbiosciences.com/.../cell_culture_tubes/htm Acesso em 18 janeiro de 2004.

CHERNESKY, M. A. Hemagglutination Inhibition. In: MAHY, B. W. J.; KANGRO, H. O. **Virology Methods Manual**. 1. ed. London: Academic Press, 1996, p. 309-322.

CHOI Y. K.; GOYAL S. M.; JOO H. S. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. **Archives of Virology**, Vienna, v. 47, n. 6, p-1209-1220, jun. 2002.

Conventional Culture Tubes. Disponível em: www.bdbiosciences.com/.../cell_culture_tubes/htm Acesso em; 18 janeiro 2004.

COOPER, L. A.; SUBBARAO, K. A Simple Restriction Fragment Length Polymorphism-Based Strategy That Can Distinguish the Internal Genes of Human H1N1, H3N2, and H5N1 Influenza A Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 7, p. 2579-2583, Jul. 2000.

COUCEIRO, J. N. S. S. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. 1. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002, p. 119-120.

COUCEIRO, J. N. S. S.; BAUM, L. G. Characterization of the Hemagglutinin Receptor Specificity and Neuraminidase Substrate Specificity of Clinical Isolates of Human Influenza A Viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 4, p. 587-591, oct/dec 1994.

COUCH, R. B.; KASEL, J. A. INFLUENZA. In: LENNETTE E. H.; LENNETTE D.; LENNETTE E. T. **Diagnostics for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**. 7. ed. England: APHA American Public Health Association, 1995, p. 431-446.

COVALCIUCK A.; WEB, K. H.; CARLSON, C. A. Comparison of Clinical Specimen Types for Detection of Influenza A and B Viruses by Optical Immunoassay (FLU OIA Test) and Cell Culture Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 12, p. 3971-3974, Dec. 1999.

COX, N. J. *et al.* Seroepidemiological study of respiratory syncytial virus in São Paulo state, Brazil. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 55, p. 234-239, 1998

COX, N. J. E SUBBARAO, K. Global Epidemiology of Influenza: Past and Present. **Annual Reviews of Medicine**, Palo Alto, v. 51, p. 401-421. 2000.

CROSBY, A. W. **America's forgotten pandemic: the influenza of 1918**. 1. ed. UK: Cambridge University Press, 1989.

van ELDEN, L. J. R. *et al.* Simultaneous Detection of Influenza Viruses A and B Using Real-Time Quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 196-200, Jan. 2001.

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 e 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 8, p. 2076-2082, Jan 1997.

ELLIS, J. S.; ZAMBON M. C. Molecular diagnosis of influenza. **Reviews in Medical Virology**, London, v. 12, p. 375-389, 2002.

FERNÁNDEZ, S. O. *et al.* Detección y caracterización rápida de los virus de influenza A y B en secreciones nasofaríngeas mediante el método de la inmunoperoxidasa. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Cuba, v. 50, n. 1, p. 36-41, 1998.

FORSTER, J. Influenza in Children: the German Perspective. **Journal of Pediatric Infectious Disease**. Baltimore, v. 22, n. 10, S215-217, 2003.

FOUCHIER, R. A. M. *et al.* Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 11, p. 4096-4101, Nov. 2000.

FUJIMOTO, S. *et al.* PCR on cerebrospinal fluid to show influenza-associated acute encephalopathy or encephalitis. **The Lancet**, Oxford, v. 352, n.12, p. 873-875, sep. 1998.

GARDNER, P. S.; McQUILLIN, J. Application of immunofluorescence antibody technique in rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. **British of Medical Journal**, London, v. 3, p. 340-343, 1968.

GILCHRIST, S. *et al.* National Surveillance for Respiratory Syncytial Virus, United States, 1985-1990. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 170, p. 986-990, 1994.

GREENBERG, S. B. Respiratory viral infections in adults. **Current Opinion of Pulmonary Medicine**, Philadelphia, v. 8, n. 3, p. 201-8, 2002.

GRÖNDAHL, B. *et al.* Rapid Detection of Nine Microorganisms Causing Acute Respiratory Tract Infections by Single Tube Multiplex Reverse Transcription-PCR: Feasibility Study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 1, p. 1-7, Jan. 1999.

HEIKKINEN, T. *et al.* Incidence of influenza in Finish children. **Journal of Pediatric Infectious Disease**. Baltimore, v. 22, n. 10, S204-206, 2003.

HERRMANN, B.; LARSSON, C.; ZWEYGBERG, B. W. Simultaneous Detection and Typing of Influenza Viruses A and B by a Nested Reverse Transcription-PCR: Comparison to Virus Isolation and Antigen Detection by Immunofluorescence and optical Immunoassay (FLU OIA). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 134-138, Jan. 2001.

HIROMOTO, Y. *et al.* Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. **Journal of General Virology**, New York, v. 81, p. 1293-1303, 2000.

HORTAL, M. *et al.* Antígenos Virales en Celulas de Aspirados Nasofaríngeos de Niños Hospitalizados por Infecciones Respiratorias Agudas. **Archivos Pediatricos**, Uruguai, v. 57, n. 3, p.137-141, 1985.

Influenza virus and its glycoreceptor: Host Range Variation of Human and Animal Influenza Viruses. Disponível em: <www.glycoforum.gr.jp/science/world/gif0009/gd_a06e.jpg> Acesso em out 2003.

IRMEN, K. T.; KELLEHER, J. J.; Use of Monoclonal Antibodies for rapid Diagnosis of Respiratory Viruses in an Community Hospital. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 7, n. 3, p. 396-402, 2000.

ISON, M.G. AND HAYDEN, F.G. Viral infections in immunocompromised patients: what's new with respiratory viruses? **Current Opinion of Infectious Diseases**, New Haven, v. 15, n. 4, p. 355-67, 2002.

JEKEL, J. F.; ELMORE, J. G.; KATZ, D. L. **Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva**. 1. ed. São Paulo: ARTMED® EDITORA S.A., 1999, 327 p.

JONG, J. C. *et al.* Influenza Virus: a Master of Metamorphosis. **Journal of Infection**, London, v. 40, p.218-228, 2000.

JULKUNEN, I. *et al.* Inflammatory responses in influenza a virus infection. **Vaccine**, Kidlington, v. 19, p. S32-S37, 2001.

KAVERIN, N. V. *et al.* Postreassortment Changes in Influenza A Virus Hemagglutinin Restoring HA-NA Functional Match. **Virology**, Philadelphia, v. 244, p. 315-321, 1998.

KAWAOKA, Y.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. **Journal of Virology**, Washington, v. 63, p. 4603-4608, 1989.

KIM, M. R., LEE, H. R., LEE, G. M. Epidemiology of Acute Viral Respiratory Tract Infections in Korean Children. **Journal of Infection**, New York, v. 41, p. 152-158, 2000.

KINGSBURY, D. W. Orthomyxoviridae and their Replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Fundamental Virology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1991. p.527-541.

KNEZ, V. Familia orthomyxoviridae. In: CARBALLAL G.; OUBINÃ, J. R. **Virologia Medica**. Buenos Aires: El Ateneo, p. 105-130, 1991.

KOLATA, G. **GRIPE. A história da Pandemia de 1918**. Rio de Janeiro: Editora Record, 2002. 381 p.

LAUNDY, M. *et al.* Influenza A community-acquired pneumonia in East London infants and young children. **Journal of Pediatric Infectious Disease**, Baltimore, v. 22, n. 10, S223-227, 2003.

LAVAL. E. Chile 1918: Las dos Epidemias. **Revista Chilena de Infectologia**, Chile, v. 16, n. 1, p. 70-73, 1999.

LI, J.; CHEN, S.; EVANS, D. H. Typing and Subtyping Influenza Virus Using DNA Microarrays and Multiplex Reverse Transcriptase PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 696-704, feb. 2001.

LINDSEY, J. **Appling Generalized Linear Models**. New York: Springer-Verlag, 1997.

McCULLAGH, P.; NELDER, J.A. **Generalized Linear Models**, Chapman and Hall. 1983.

MAGNARD, C. *et al.* Comparison of Two Nested PCR, Cell Culture, and Antigen Detection for the Diagnosis of Upper Respiratory Tract Infections due to Influenza Viruses. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 59, p. 215-220, 1999.

MAIETREYI, R. S. *et al.* Rapid Detection of respiratory viruses by centrifugation enhanced cultures from children with acute lower respiratory tract infections. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 16, p. 41-47, 2000.

MAROZIN S. *et al.* Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. **Journal of Genetic Virology**, London, v. 83, n. Pt 4, p. 735-745, Apr 2002.

MEQDAM, M. M., NASRALLAH, G. K. Enhanced Detection of Respiratory Syncytial Virus by Shell Vial in Children Hospitalized with Respiratory Illnesses in Northern Jordan. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 62, P. 518-523, 2000.

MEQDAM, M. M.; NASRALLAH, G.; AL-SHURMAN, A. Detection of Adenovirus Infection in Children in Jordan. **Annals of Tropical Paediatrics**, n. 21, p. 59-65, 2001.

MITNAUL, L. J. *et al.* Balanced Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Are Critical for Efficient Replication of Influenza A Virus. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 74, n.13, p. 6015-6020, July, 2000.

MONTALTO, N. J. An Office-Based Approach to Influenza: Clinical Diagnosis and Laboratory Testing. **American Family Physician**, Washington, v. 67, n. 1, p. 111-118 January, 2003.

MONTO, A. S. *et al.* Clinical Signs and Symptoms predicting influenza infection. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, p. 3243-3247, 2000.

MONTO, A. S., Epidemiology of Viral Respiratory Infections. **The American Journal of Medicine**, Newton, v. 112, n. 6A, april,2002.

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

MOTTA, F. C.; LUIZ, M. O.; COUCEIRO, J. N. S. S. Serological analysis reveals circulation of influenza C viruses, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 2, 2 p., 2000.

NASCIMENTO, J. P. *et al.* Influenza Surveillance in Rio de Janeiro Between 1980-1981: a Virological and Serological Study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, p. 169-173, abr/jun 1984.

NASCIMENTO, J. P. *et al.* Longitudinal Study of Acute Diseases in Rio de Janeiro: Occurrence of Respiratory Viruses During Four Consecutive Years. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 287-296, Julho-Agosto 1991.

NAVARRO-MARÍ, J. M. *et al.* Rapid Detection of respiratory Viruses by Shell Vial Assay Using Simultaneous Culture of HEp-2, LLC-MK2, and MDCK Cells in a single Vial. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 7, July 1999, p.2346-2347.

NEROME, K. *et al.* Genetic analysis of porcine H3N2 viruses originating in southern China. **Journal of General Virology**, Cambridge, v. 76, p. 613-624, 1995.

NEUZIL, K. M.; GRIFFIN, M. R.; SCHAFFNER, W. Influenza Vaccine: Issues and Opportunities. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 15, n. 1, p. 123-141, march 2001.

NEUZIL, K. M. *et al.* Winter Respiratory Viruses and Health Care Use: A Population-Based Study in the Northwest United States. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 37, p. 201-207, 15 July 2003.

NICHOLSON, K. G. *et al.* Influenza-related hospitalizations among young children in Leicestershire. **Journal of Pediatric Infectious Diseases**. Baltimore, v. 22, n. 10, S 228-230, 2003.

NOYOLA, D. E. *et al.* Comparison of a New Neuraminidase Detection Assay with an Enzyme Immunoassay, Immunofluorescence and Culture for Rapid Detection of Influenza A and B Viruses in Nasal Wash Specimen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1161-1165, Março 2000.

OLIVEIRA, E. C.; MARIK, P. E.; COLICE, G. Influenza Pneumonia. **CHEST**, Park Ridge, v. 119, n. 6, p. 1717-1723, june 2001

OLSEN, M. *et al.* Isolation of Seven Respiratory Viruses in Shell Vials: a Practical and Highly Sensitive Method. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 2, p. 422-425, Feb. 1993.

PAIVA, T. M. *et al.* Outbreak of Influenza Type A (H1N1) in Iporanga, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 6, nov/dez 2001.

PAIVA, T. M. *et al.* Ocurrência of influenza B/Hong Kong-Like strains in Brazil, during 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 1, jan/fev 2003.

PARANÁ. Serviço de Metereologia do Paraná – SIMEPAR. Dados de temperaturas médias anuais, 2003.

PELUFFO, M. *et al.* Infecciones respiratorias agudas en niños menores de 5 años hospitalizados. **Revista Médica del Uruguay**, Uruguai, v. 3, p. 213-226, 1986.

PRINCIPI, N. *et al.* Socioeconomic impact of influenza on healthy children and their families. **Journal of Pediatric Infectious Diseases**, Baltimore, v. 22, n. 10, S207-210, 2003.

QUACH, C. *et al.* Risk Factor Associated With Severe Influenza Infections in Childhood: Implication for Vaccine Strategy. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 112, n. 3, p. 197-200, 3 september 2003.

RABELLA, N. *et al.* Conventional Respiratory Viruses Recovered from Immunocompromised Patients: Clinical Considerations. **Clinical Infectious Diseases**, Baltimore, v. 28, p. 1043-1048, 1999.

RABONI, S. M. *et al.* Respiratory Tract Viral Infections in Bone Marrow Transplant Patients. **Transplantation**, Baltimore, v. 76, n. 1, p. 142-146, jul. 13 2003.

REICHERT, T. A.; SUGAYA, N.; FEDSON, D.S., *et al.* The Japanese experience with vaccinating schoolchildren against influenza. **New England Journal of Medicine**, Boston, n. 344, p. 886-899, 2001.

REID, A. H. *et al.* Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, vol. 97, n. 12, p. 6785-6790, june 2000.

SANTOS, D. E. M.; CARDIAS, A. S.; MELLO, W. A. Inquérito Soroepidemiológico para os vírus influenza em Belém, Para, Brasil, 1992-1993. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, 9 p., jan/mar 1997.

SCHRADER C.; SÜSS J. Genetic characterization of a porcine H1N2 influenza virus strain isolated in German. **Intervirolgy**, Basel, vol. 46, n. 1, p. 66-67, 2003

SCHULMAN, S. G.; DASSEY, D. E.; MASCOLA, L. Influenza. **West Journal of Medicine**, San Francisco, v. 169, n. 6, p. 377- 378, Dec. 1998.

SCHWEIGER B.; ZADOW, I.; HECKLER, R. *et al.* Application of a Fluorogenic PCR Assay for Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Respiratory Sample. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 1552-1558, Apr. 2000.

Shell Vial. Disponível em: www.ourworld.compuserve.com/.../milleranalytical/sanlebot.htm Acesso em; 18 janeiro 2004.

SHIH, S. *et al.* Diagnosis of Respiratory tract viruses in 24 h by Immunofluorescent Staining of Shell Vial Cultures containing Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells. **Journal of Virological Methods**, v. 81, p. 77-81, 1999.

Situação Geográfica de Curitiba. Disponível em: www.totaltrade.com.br/PAGES/CURITIBA_2 Acesso em: 24 novembro 2003.

SMIRNOV, Y. A.; LIPATOV, A. S.; GITELMAN, A. K. *et al.* An epitope shared by the hemagglutinins of H1, H2, H5, and H6 subtypes of Influenza A virus. **Acta Virologica**, n. 43, p. 237-244, apr 1999.

SMITH, W.; ANDREWS, C. H.; LAIDLAN, P. P. A virus obtained from influenza patients. **LANCET**, Oxford, v. 1, p. 66-68, 1933.

SOUZA, L. S. F. *et al.* Viral Respiratory Infections in Young Children Attending Day Care in Urban Northeast Brazil. **Pediatric Pulmonology**, n. 35, p. 184-191, 2003.

SPECTER, S.; JEFFRIES, D. Detection of virus and viral antigens. In: MAHY, B. W. J.; KANGRO, H. O. **Virology Methods Manual**. 1. ed. London: Academic Press, 1996, p. 309-322.

STOCKTON, J. *et al.* Multiplex PCR for typing and subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 10, p. 2990-2995, out 1998.

STRALIOTTO S. M. *et al.* Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 35, n. 4, jul-ago 2002.

SUAREZ, D. L. *et al.* Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 72, p. 6678-6688, 1998.

SUBBARAO, K. Influenza Vaccines: Present and Future. **Advances in Virus Research**, Washington, v. 54, p. 349-373, 1999.

SUTMOLLER F.; NASCIMENTO J. P.; CHAVES J. R. S.; FERRERIA V.; PEREIRA M. S. Viral etiology of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro: first two years of a longitudinal study. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 61, p. 845-852, 1983.

TUMPEY, T. M. *et al.* Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, New York, v. 99, n. 21, p. 13849-13854, October 2002.

UEDA, M.; MAEDA, A.; NAKAGAWA, N. *et al.* Application of subtype-specific monoclonal antibodies for rapid detection and identification of influenza A and B viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 2, p. 340-344, feb. 1998.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas para apresentação de documentos científicos**. 1. ed., Curitiba, Editora da UFPR, 2000. Parte 2: Teses, dissertações e trabalhos acadêmicos.

_____. **Normas para apresentação de documentos científicos**. 1. ed., Curitiba, Editora da UFPR, 2000. Parte 6: Referências.

_____. **Normas para apresentação de documentos científicos**. 1. ed., Curitiba, Editora da UFPR, 2000. Parte 7: Citações e notas de rodapé.

_____. **Normas para apresentação de documentos científicos**. 1. ed., Curitiba, Editora da UFPR, 2000. Parte 8: Redação e Editoração.

VIEIRA, S. E. *et al.* Clinical Patterns and Seasonal Trends in Respiratory Syncytial Virus Hospitalizations in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 125-131, may-jun. 2001.

WAGNER, R.; MATRSOVICH, M.; KLENK, H. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. **Reviews in Medical Virology**, London, v. 12, p. 159-166, feb. 2002.

WEBSTER R. G. Predictions for Future Human Influenza Pandemics. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 176, Suppl. 1, p. S14-19, 1997.

WEBSTER, R. G. Influenza: An Emerging Disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p.436-441, jul-sep 1998.

WILKINS, M. J. *et al.* Severe Morbidity and Mortality Associated with influenza in Children and Young Adults --- Michigan, 2003. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, vol. 52, n. 35, p. 837-840, sep 5 2003.

WILLIAMS, G. **HyperCELL**. Hamden, USA: Garland Publishing, 1997. 1 CD-ROM.

World Health Organization. WHO Global Influenza Programme. Disponível em: <http://www.who.int/emc/diseases/flu/globalagenda_report.htm> Acesso em: 06 jun. 2002.

WRIGHT, P. F. Respiratory Diseases. In: NATHANSON, N. *et al.* **Viral Pathogenesis**. 1. ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1997, p. 703-712.

ZAMBON, M. C. Epidemiology and pathogenesis of Influenza. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 44, topic B, p.3-9, 1999.

ZAMBON, M. C. *et al.* Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. **The Lancet**, Oxford, v. 358, p. 1410-1416, 2001.

ZOU, S. A Practical Approach to Genetic Screening for Influenza Virus Variants. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 10, p. 2623-2627, oct. 1997.

ANEXO

ANEXO 1 – CARTA DA COMISSÃO DE ÉTICA	114
ANEXO 2 – FICHA DA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA	116
ANEXO 3 – PROTOCOLO DE TÉCNICA IFI	118
ANEXO 4 – PROTOCOLO DE TÉCNICAS BIOLOGIA MOLECULAR	120

ANEXO**ANEXO 1 – CARTA DA COMISSÃO DE ÉTICA**

Curitiba. 07 de maio de 2.002.

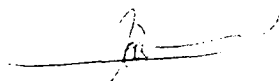
Ilmo (a) Sr. (a)
Dra. Luine Rosele Renaud Vidal Tsuchiya
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DO VÍRUS INFLUENZA NA CIDADE DE CURITIBA", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 07 de maio de 2.002, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 , 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

Protocolo CEP-HC Nº 453.035/2002-04

Atenciosamente,



Prof. Dr. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR

ANEXO

ANEXO 2 – FICHA DA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA



MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE
CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA

SENTINELA CLÍNICO-VIROLÓGICA
FICHA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Unidade Sentinela: _____ Laboratório: _____

NOME: _____ SEXO: F M DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ DATA DA COLETA: ___/___/___

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: ___/___/___ MUN. RESIDÊNCIA: _____ VACINADO? SIM NÃO

DATA DA ÚLTIMA VACINAÇÃO CONTRA INFLUENZA: ___/___/___

SINTOMAS CLÍNICOS PRESENTES:

FEBRE CORIZA OBSTRUÇÃO NASAL ARTRALGIA DORES MÚSCULARES TOSSE DÔR DE CABEÇA
DÔR DE GARGANTA DÔR DE OUVIDO OUTROS (ESPECIFICAR) _____

COLETA ENVIADA POR: _____ IMPRESSÃO DIAGNÓSTICA: _____

COMPLICAÇÃO CLÍNICA? _____ QUAL? _____

RESERVADO AO LABORATÓRIO

REGISTRO LABORATORIAL: ___/___/___ NATUREZA DO ESPÉCIME: ANF SWAB COMBINADO

QUALIDADE MATERIAL: BOA RAZOÁVEL NÃO APROVEITÁVEL

RESULTADOS	Negativo	Positivo	Inconclusivo	Observações
IF Influenza A				
IF Influenza B				
IF Parainfluenza				
IF Adnovirus				
IF VSR				

DATA DO RESULTADO: ___/___/___ DATA DO RETORNO DO RESULTADO À CLÍNICA: ___/___/___

RESPONSÁVEL: _____

ANEXO

ANEXO 3 – PROTOCOLO DE TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

HOSPITAL DE CLINICAS
 SERVIÇO DE ANÁLISES CLINICAS
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 SECÃO DE VIROLOGIA
 REGISTRO DE TÉCNICA - IFI

Data ____/____/____

Técnico _____

Anticorpo Monoclonal :

Adeno: _____ FluA: _____ FluB: _____

Pflu1: _____ Pflu2: _____ Pflu: _____

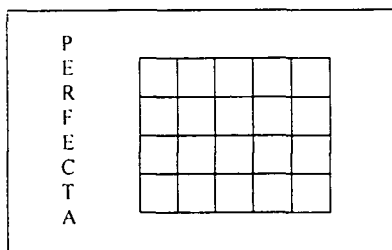
RSV: _____ HSV: _____ CMV: _____

Conjugado FITC: _____

Kit : _____

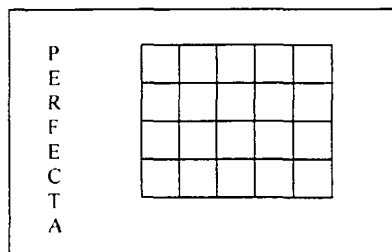
Observações : _____

Lâmina nº _____



- 1 _____ 7 _____
- 2 _____ 8 _____
- 3 _____ 9 _____
- 4 _____ 10 _____
- 5 _____ 11 _____
- 6 _____ 12 _____

Lâmina nº _____



- 1 _____ 7 _____
- 2 _____ 8 _____
- 3 _____ 9 _____
- 4 _____ 10 _____
- 5 _____ 11 _____
- 6 _____ 12 _____

ANEXO

ANEXO 4 – PROTOCOLO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

