

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISIANE CRISTINE LOPES

VÍRUS DA GRIPE H7N9: CENÁRIO ATUAL

CURITIBA  
2013

LISIANE CRISTINE LOPES

## VÍRUS DA GRIPE H7N9: CENÁRIO ATUAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Análises Clínicas.

Orientador Prof.: Eduardo Pietruchinski

CURITIBA  
2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Departamento de Patologia Médica

## AUTORIZAÇÃO DE ENTREGA DA VERSÃO FINAL CORRIGIDA DO ARTIGO

### AUTORIZAÇÃO

Eu, professor EDUARDO PIETRUCHISNKI autorizo a entrega da versão definitiva do artigo intitulado: **VÍRUS DA GRIPE H7N9: CENÁRIO ATUAL**, pela aluna LISIANE CRISTINE LOPES.

Curitiba, 05 de novembro de 2013.

---

Orientador

## **VÍRUS DA GRIPE H7N9: CENÁRIO ATUAL H7N9 FLU VIRUS: CURRENT SCENARIO**

LOPES, L. C.<sup>1</sup>; PIETRUCHINSKI, E.<sup>2</sup>

### **RESUMO**

Nos últimos anos, a gripe aviária se tornou um dos mais importantes desafios que surgiram na área de saúde. A epidemiologia do vírus dessa gripe é complexa, e há ainda muitos aspectos desconhecidos, especialmente em relação ao seu reservatório. O vírus surgiu em finais de março de 2013 na China, infectando mais de 130 pessoas, das quais mais de 30 faleceram. A influenza é uma infecção viral do sistema respiratório que tem elevada transmissibilidade e classicamente, apresenta-se com início abrupto de febre, mialgia e tosse seca. Os vírus do grupo H7 circulam entre as aves migratórias e acabam infectando aves para consumo humano. Ainda não se sabe por que, mas o vírus passou a ser transmitido das aves para humanos. Pesquisas publicadas este ano mostraram que o vírus podia ser transmitido entre mamíferos e outro estudo mostrou o que pode ser o primeiro caso de infecção entre humanos. Os exames para detecção são realizados através de imunofluorescência e por reação em cadeia da polimerase. A identificação de vírus H7N9 como causa de doença humana é apenas o início de um longo percurso destinado à elucidação da epidemiologia, a gama de hospedeiros e a patogenicidade deste vírus.

Palavras-chave: Gripe Aviária, Vírus H7N9.

<sup>1</sup>Estudante de especialização em análises clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

<sup>2</sup>Professor Mestre do curso de farmácia do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais (CESCAGE).

## ABSTRACT

In the last years, avian influenza has become one of the most important challenges that have arisen. The epidemiology of influenza virus that is complex, and there are still many unknown aspects, particularly in relation to the reservoir. The virus emerged in the end of the March of this year in China, infecting more than 130 people, of which more than 30 died. Influenza is a viral infection of the respiratory system that has high transmissibility and classically presents with sudden onset of fever, myalgia, and dry cough. The viruses of the group H7 circulating among migratory birds and finish infecting birds for human consumption. Even do not know why, but the virus was being transmitted from birds to humans. Studies published this year showed that the virus could be transmitted between mammals and another study showed that can be the first case of infection in humans. The exams for the detection is performed by immunofluorescence and polymerase chain reaction. The identification of the viruses H7N9 as a cause of human disease is only the beginning of a long journey for the elucidation of the epidemiology, host range and pathogenicity of this virus.

Key-words: Avian Flu, Virus H7N9.

## **INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, a gripe aviária tornou-se um dos mais importantes desafios que surgiram a partir de animais reservatórios (CAPUA, 2004; 2006). Os atuais surtos detectados em aves em muitos países asiáticos, europeus e africanos são motivos de preocupação não só para a indústria avícola, em que produzem uma doença economicamente devastadora, mas também para a saúde pública (ALEXANDER, 2007). A possibilidade do vírus H7N9 causar uma pandemia representa uma ameaça constante para aves e seres humanos em todo o mundo (ZHU, *et al* 2013).

Segundo ALEXANDER (2000), a epidemiologia do vírus da gripe aviária é complexa, e há ainda muitos aspectos desconhecidos, especialmente em relação ao reservatório.

O vírus da gripe H7N9 surgiu em finais de março de 2013 em Xangai. Em pouco mais de um mês, alastrou-se para outras regiões da China, infectando, segundo os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 130 pessoas, das quais mais de 30 faleceram. O surto levou ao encerramento dos mercados chineses que vendem aves – tendo sido mais tarde confirmado que o contato com aves infectadas foi a origem das infecções humanas pelo H7N9. E de fato, existem poucos estudos de que o vírus seja diretamente transmissível entre pessoas. Mas sabe-se, que ele possui certas características genéticas que o tornam susceptível de se vir a adaptar à nossa espécie no futuro (WHO, 2013).

Um dos problemas com o H7N9 é que não se sabe qual é o tamanho real da população infectada, uma vez que podem haver indivíduos não diagnosticados por os seus sintomas terem sido mais fracos (LEUNG, *et al* 2013).

## **OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho é apresentar os dados recentes sobre o vírus H7N9 e as perspectivas para o futuro.

## **EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS INFLUENZA**

A influenza é uma infecção viral aguda do sistema respiratório que tem elevada transmissibilidade. Classicamente, apresenta-se com início abrupto de febre, mialgia e tosse seca. Em geral, tem evolução autolimitada, de poucos dias. Sua importância deve-se ao seu

caráter epidêmico, caracterizado por disseminação rápida e elevada morbidade nas populações atingidas (WILSCHUT; McELHANEY, 2005).

A doença é causada pelos vírus Influenza da família dos *Orthomyxovirus*. São vírus RNA de hélice única e subdividem-se em três tipos: A, B e C, de acordo com sua diversidade antigênica. Os dois primeiros, principalmente os vírus influenza A, são altamente transmissíveis e mutáveis, causando maior morbidade e mortalidade e, por isto, merecem destaque em saúde pública (WILSCHUT; McELHANEY, 2005).

Os vírus da influenza A são classificados de acordo com os tipos de proteína que se localizam em sua superfície, chamadas de hemaglutinina (H) e neuraminidase (N). A proteína H está associada à infecção das células do trato respiratório superior, onde o vírus se multiplica, enquanto a proteína N facilita a saída das partículas virais do interior das células infectadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A nomenclatura dos vírus influenza definida pela Organização Mundial da Saúde inclui o tipo de vírus influenza, a localização geográfica onde o vírus foi isolado pela primeira vez, o número de série que recebe no laboratório, o ano do isolamento e, entre parênteses, a descrição dos antígenos de superfície do vírus, ou seja, da hemaglutinina e da neuraminidase. Por exemplo, A/Sydney/5/97(H3N2)(WHO, 2013).

Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2005), os vírus influenza do tipo A são encontrados em várias espécies de animais, além dos seres humanos. As aves migratórias desempenham importante papel na disseminação natural da doença entre distintos pontos do globo terrestre. O vírus H7N9 faz parte do grupo Influenza A.

## **HEMAGLUTININA E NEURAMINIDASE**

A hemaglutinina é uma proteína que se situa na camada mais externa do vírus, o envelope. Ela reconhece um açúcar da membrana celular, o ácido siálico, e é a responsável pelo reconhecimento e ligação do vírus as células do sistema respiratório. Seu nome vem desta capacidade de reconhecer e se ligar à células e aglutinar hemácias, um dos primeiros testes desenvolvidos para diagnosticar o vírus. Sua numeração é dada com base na variação dos aminoácidos e são conhecidos mais de 16 tipos de H (GALWANKAR; CLEM, 2009).

A neuraminidase reconhece a mesma molécula que a hemaglutinina, o ácido siálico da membrana celular, mas realiza sua função de maneira oposta. Seu papel é ajudar o vírus a deixar a célula invadida. A neuraminidase é necessária para remover o ácido siálico da célula e permitir que o vírus recém-sintetizado consiga brotar para invadir a próxima célula. Por isso,

ela também se localiza no envelope do vírus, e é a segunda proteína mais comum, depois da hemaglutinina. Também é classificada de acordo com sua variedade, e são conhecidos nove tipos (OXFORD; LAMBKIN, 1999). A estrutura do vírus H7N9 pode ser visualizada na FIGURA 1.

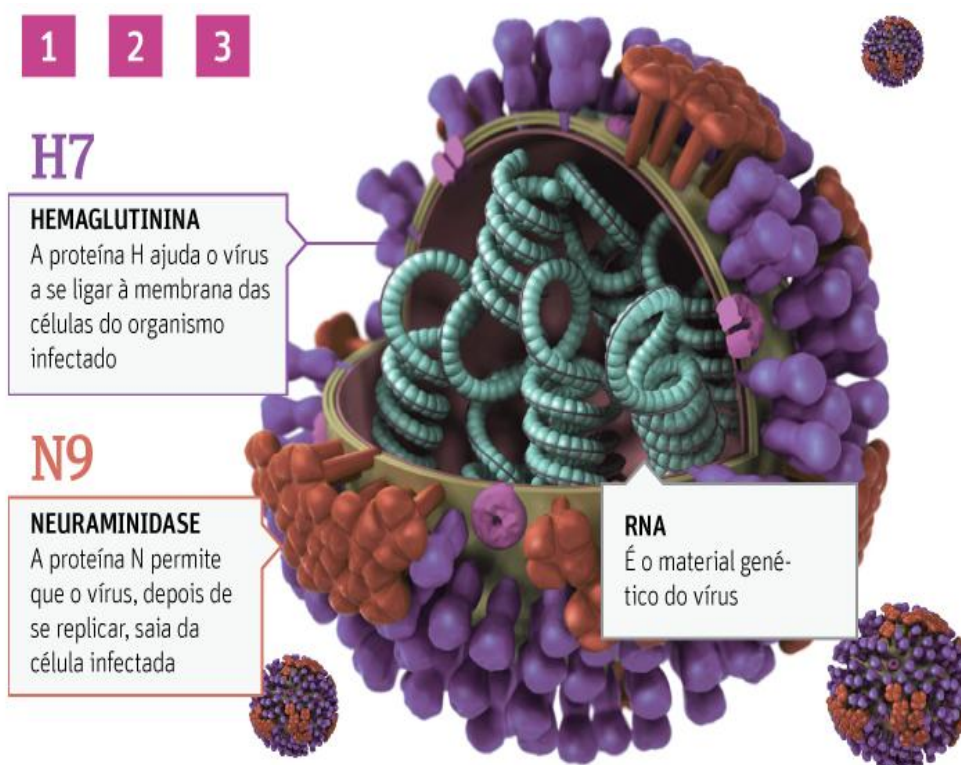


FIGURA 1 – Estrutura do vírus H7N9.

FONTE: Folha de São Paulo (2013).

## PROPAGAÇÃO DO VÍRUS H7N9

Os vírus do grupo H7 circulam entre as aves migratórias e acabam infectando aves para consumo humano. Ainda não se sabe por que, mas o vírus passou a ser transmitido das aves para humanos, mas a princípio, não havia sinal de contágio entre humanos. Pesquisas publicadas este ano mostraram que o vírus podia ser transmitido entre mamíferos (ZHU, *et al* 2013).

Outro estudo mostrou que um paciente do sexo masculino ficou doente cinco a seis dias após sua última exposição ao mercado de aves. A segunda paciente, sua filha, que prestou cuidados ao pai no hospital não teve contato com as aves. Ela desenvolveu sintomas seis dias após seu último contato com o pai. Testes mostraram que ambos os vírus eram quase



geneticamente idênticos. Os dois pacientes morreram em decorrência de falência múltipla de órgãos. Este pode ser o primeiro caso de infecção entre humanos (ZHOU, *et al* 2013).

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os procedimentos apropriados de coleta, transporte, processamento e armazenamento de espécimes clínicos são fundamentais no diagnóstico da infecção viral (WILSCHUT; McELHANEY, 2005).

A coleta da amostra (FIGURA 2) preferencial para o diagnóstico laboratorial são as secreções da nasofaringe obtidas por meio de aspirado de nasofaringe com auxílio de um coletor descartável ou por meio de *swab* combinado (oral + nasal). Ainda o lavado brônquico alveolar pode ser usado como amostra, e a coleta fica a critério do médico (LACEN - PR, 2013).

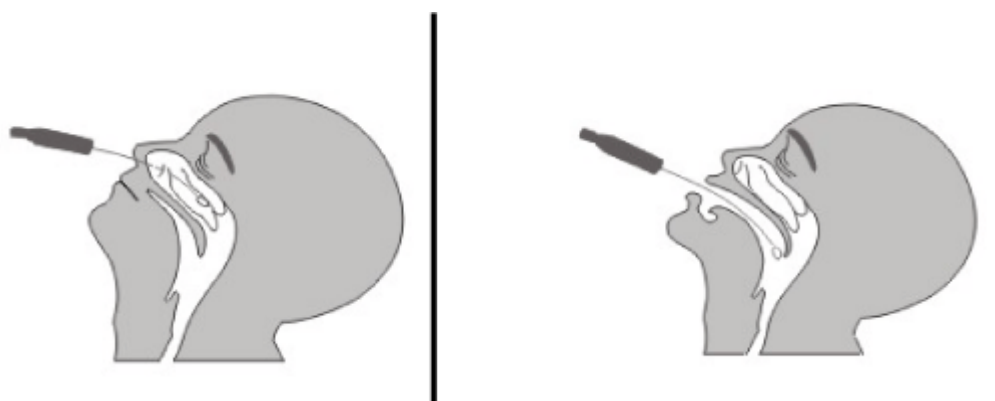


FIGURA 2 – Coleta com *swab* nasal e *swab* oral.  
FONTE: LACEN – PR (2013).

Ainda segundo LACEN – PR (2013), a detecção do vírus influenza é realizada pelas técnicas de imunofluorescência, de isolamento do agente em cultivos celulares/ovos embrionados e de detecção por reação em cadeia da polimerase (PCR). Adicionalmente, o diagnóstico pode ser estabelecido através do exame de inibição de hemaglutinação. Para isso, coletar amostras pareadas de sangue durante a fase aguda e convalescente (15 dias de intervalo entre as duas colheitas).

## TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

A técnica de imunofluorescência utiliza anticorpos marcados com corantes fluorescentes para revelar a formação de imunocomplexos vírus-anticorpo. Os anticorpos marcados são chamados de conjugados. O corante mais usado em virologia é o isotiocianato de fluoresceína (FITC), o qual produz fluorescência verde-amarela. Na imunofluorescência

direta, um conjugado de especificidade conhecido é adicionado às células infectadas por vírus, fixados em uma lâmina de microscópio. Se o anticorpo é específico para o antígeno, ocorre a formação do complexo que é visualizado pela fluorescência, se o conjugado não é específico para o antígeno, não há formação de imunocomplexos, logo não há fluorescência (SANTOS, N.S. O.; *et al*, 2005).

### **TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR)**

A PCR possibilita a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima DNA-polimerase, a mesma que participa da replicação do material genético nas células. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento (iniciador ou *primer*) já esteja ligado a uma das cadeias do DNA no ponto escolhido para o início da síntese. Os iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência DNA com bilhões de cópias. A técnica é feita nas seguintes etapas: desnaturação, hibridização, extensão e revelação. Na desnaturação, a temperatura elevada (geralmente 90°C) separa a cadeia de DNA. Durante a hibridização, a temperatura encontra-se entre 40°C e 65°C, os iniciadores marcam as extremidades da sequência alvo: uma para cada cadeia simples de DNA que foi produzida durante o passo de desnaturação. Durante a etapa de extensão, a temperatura eleva-se a aproximadamente 72°C e a enzima taq polimerase replica a cadeia de DNA, a extensão inicia-se sempre no extremo 3' do primer e a taq polimerase sintetiza exclusivamente na direção 5' para 3'. Na última etapa de revelação, é preciso detectar a presença de produtos detectados, em geral feito pela eletroforese em gel de agarose ou poliácridamida (NOVAIS; ALVES, 2004).

### **TÉCNICA DE REAÇÃO DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO**

Demonstração da dosagem de anticorpos inibidores da hemaglutinação, em 2 amostras de soro de um mesmo paciente, colhidas na fase aguda e na fase de convalescença.

Para a reação de inibição da hemaglutinação, os soros colhidos dos pacientes são diluídos na placa (1/2 a 1/1024) e cada diluição é colocada em contato com um volume fixo de uma suspensão viral, contendo 4 unidades hemaglutinantes. Esta mistura é incubada por 1 hora a 37°C, para permitir a reação do anticorpo com antígeno. A seguir, 1 gota de suspensão de hemácias é adicionada a cada orifício da placa. Após incubação de 30 minutos, faz-se a leitura da reação. Nos orifícios onde existem anticorpos em quantidade suficiente para se combinar com a hemaglutinina viral, observa-se a inibição da hemaglutinação, evidenciada

pela sedimentação das hemácias, formando um botão fechado; nos orifícios onde não existem anticorpos, as hemácias serão aglutinadas pelos vírus livres, sedimentando em forma de um aglomerado irregular. O título do soro é determinado como sendo igual à recíproca da maior diluição capaz de inibir completamente a hemaglutinação (SANTOS, N. S. O.; *et al*, 2005).

Leitura:

Nos orifícios "controle", isto é, aqueles nos quais se dispensou apenas a solução fisiológica e as hemácias, estas devem sedimentar, por ação da gravidade, formando ao fundo da cavidade um botão fechado, central. Nos orifícios que contém aglutinina viral, as hemácias formam uma malha, ou seja, um aglomerado irregular. Nos orifícios que receberam soro do paciente, vírus e hemácias se o soro tiver anticorpos estes vão recobrir os vírus e impedir que estes se liguem às hemácias. Portanto, na presença de anticorpos as hemácias sedimentam; na ausência de anticorpos os vírus estão livres e se adsorvem às hemácias, causando a aglutinação.

## **TRATAMENTO**

O oseltamivir e o zanamivir fazem parte de uma nova classe de drogas chamadas de inibidoras da neuraminidase e que podem ser utilizadas contra a infecção pelos vírus da influenza. O fosfato de oseltamivir é um pró-fármaco do carboxilato de oseltamivir, inibidor potente e seletivo das enzimas neuraminidase do vírus da gripe. O oseltamivir inibe a neuraminidase dos dois tipos de vírus da gripe: influenza A e B. As concentrações do carboxilato de oseltamivir necessárias para inibir a atividade enzimática em 50% encontram-se na faixa nanomolar inferior. O carboxilato de oseltamivir também inibe a infecção e a replicação *in vitro* do vírus da gripe e inibe a replicação e a patogenicidade *in vivo* do mesmo. O carboxilato de oseltamivir reduz a proliferação dos dois vírus (influenza A e B) pela inibição da liberação de vírus infecciosos das células infectadas (LAURENT, 2003).

Segundo a ANVISA (2013), a atividade do zanamivir é extracelular. Ele reduz a propagação do vírus influenza tipos A e B, inibindo a liberação de vírions infecciosos de influenza a partir das células infectadas do epitélio do trato respiratório. A replicação da influenza está limitada ao tecido epitelial superficial do trato respiratório. No entanto, nenhuma das duas drogas foi eficaz em prevenir as complicações da influenza havendo poucos dados sobre a efetividade do zanamivir em indivíduos de alto risco para complicações da doença.

Um estudo recente mostrou que uma mutação genética que torna o vírus da gripe aviária resistente ao Tamiflu<sup>®</sup> (nome comercial do oseltamivir) foi identificada em pacientes infectados com o vírus H7N9 na China. O gene foi descoberto em dois dos três pacientes com os sintomas mais severos da gripe em um estudo que contou com a participação de 14 pacientes infectados com o H7N9 e tratados com Tamiflu<sup>®</sup> em um hospital de Xangai. Em um dos pacientes, a resistência surgiu após a infecção inicial, sugerindo que o tratamento com a medicação pode ter provocado a mutação. A descoberta é a primeira confirmação oficial da resistência da nova gripe ao Tamiflu<sup>®</sup>. Nos outros pacientes, o tratamento com o medicamento parece ter efetividade contra o vírus, e o medicamento ainda é recomendado, de preferência, nas primeiras horas após a infecção (HU, Y; *et al*, 2013).

## **CONCLUSÃO**

A identificação do vírus H7N9 como uma causa da doença humana é apenas o início de um longo percurso destinado à elucidação da epidemiologia, a gama de hospedeiros e a patogenicidade deste vírus. O desenvolvimento de vacinas eficazes e agentes terapêuticos antivirais também será muito importante para deter a doença. Além disso, a vigilância adequada é o mais importante. No entanto, a vigilância integrada das infecções em animais e humanos ainda precisa ser melhorada. As barreiras entre médicos e veterinários devem ser removidas, e as lacunas devem ser preenchidas entre os órgãos governamentais responsáveis pela saúde animal e saúde pública. Enquanto uma estreita vigilância sobre H7N9 está acontecendo, espera-se que a pesquisa básica seja incentivada.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/fila\\_bula/](http://www.anvisa.gov.br/fila_bula/). Acesso em 20/07/2013.

ALEXANDER DJ. **An overview of the epidemiology of avian influenza**. Vaccine 30:5637-5644, 2007.

ALEXANDER DJ. **A review of avian influenza in different bird species**. Vet. Microbiol., 74(1-2):3-13, 2000.

CAPUA I., Alexander DJ. **Avian influenza: recent developments**. Avian Pathol., 4:393-404, 2004.

CAPUA I, Alexander DJ. **The challenge of avian influenza to the veterinary community**. Avian Pathol., 3:189-205, 2006.

GALWANKAR, S; CLEM, A. **Swine influenza A (H1N1) strikes a potential for global disaster**. Disponível em: <http://www.onlinejets.org/text.asp?2009/2/2/99/50744>. Acesso em 18/07/2013.

HU, Y; *et al.* **Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance**. The Lancet, 9885: 2273 - 2279, 2013.

LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ (LACEN). **Diagnóstico laboratorial de vírus respiratórios (biologia molecular)**. Curitiba, 2013.

LAURENT, K.; *et al.* **Impact of Oseltamivir Treatment on Influenza-Related Lower Respiratory Tract Complications and Hospitalizations**. Intern Med. 163(14):1667-1672, 2003.

LEUNG, G; *et al.* **Comparative epidemiology of human infections with avian influenza A H7N9 and H5N1 viruses in China: a population-based study of laboratory-confirmed cases**. The Lancet, 382 (9887): 129 - 137, 2013.

LEUNG, G; *et al.* **Human infection with avian influenza A H7N9 virus: an assessment of clinical severity**. The Lancet, 382(9887): 138 - 145, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 2005.

MUR, W. Entenda o vírus H7N9. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 07 de agosto de 2013. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/infograficos/2013/08/19356-entenda-o-virus-h7n9.shtml>. Acesso em 10/08/2013.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. **PCR em tempo real**. Revista Biotecnológica Ciência & Desenvolvimento, 33ed, 2004.

OXFORD, J.; LAMBKIN, R. **Direcionando esforços contra a neuraminidase do vírus influenza(gripe)- uma nova estratégia para a terapêutica antiviral**. Rev. Bras. Med., 56(8): 810- 819, 1999.

SANTOS, N. S. O; *et al.* **Introdução a virologia humana**. Guanabara Koogan, 2ed, 2005.

ZHOU, M; *et al.* **Probable person to person transmission of novel avian influenza A (H7N9) virus in Eastern China, 2013: epidemiological investigation**. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/347/bmj.f4752>. Acesso em: 28/08/2013.

ZHU, H; *et al.* **Infectivity, Transmission, and Pathology of Human-Isolated H7N9 Influenza Virus in Ferrets and Pigs**. Science, 341: 183 - 186, 2013.

WILSCHUT, J.; McELHANEY, J. **Influenza**. London: Mosby, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **A infecção humana pelo vírus da gripe aviária (H7N9)**. Disponível em: [http://www.who.int/csr/don/2013\\_05\\_08/es](http://www.who.int/csr/don/2013_05_08/es). Acesso em 20/07/2013.