

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANE APARECIDA PEREIRA

AValiação de fatores associados à gravidade de doença em
pacientes do CHC-UFPR infectados com o vírus influenza A

CURITIBA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANE APARECIDA PEREIRA

AVALIAÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS À GRAVIDADE DE DOENÇA EM
PACIENTES DO CHC-UFPR INFECTADOS COM O VÍRUS INFLUENZA A

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientadora: Profª Drª Sônia Mara Raboni

CURITIBA

2021

P436 Pereira, Luciane Aparecida

Avaliação de fatores associados à gravidade de doença em pacientes do CHC-UFPR infectados com o vírus influenza A [recurso eletrônico] / Luciane Aparecida Pereira – Curitiba, 2021.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde.

Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Mara Raboni

1. Carga viral. 2. Influenza aviária. 3. Síndrome respiratória aguda grave. 4. Prognóstico. I. Raboni, Sônia Mara. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLM: WC 515



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de LUCIANE APARECIDA PEREIRA intitulada: "AVALIAÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS A GRAVIDADE DE DOENÇA EM PACIENTES DO CHC-UFPR INFECTADOS COM O VIRUS INFLUENZA A", sob orientação da Profa. Dra. SONIA MARA RABONI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

03/09/2021 18:51:45.0

SONIA MARA RABONI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

06/09/2021 11:34:13.0

ANA LUIZA PAMPLONA MOSIMANN

Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS/FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica

03/09/2021 18:14:57.0

DANIELA FIORI GRADIA

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE GENÉTICA)

Assinatura Eletrônica

04/09/2021 15:10:52.0

MERI BORDIGNON NOGUEIRA

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA
UFPR)

Assinatura Eletrônica

09/09/2021 17:58:02.0

FERNANDA EDNA ARAÚJO MOURA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)

Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 109276

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 109276

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me deu forças para nunca desistir.

À minha família pelo carinho, apoio e por sempre me incentivar a continuar estudando. Em especial ao meu esposo, Paulo Henrique, pelo apoio, paciência e companheirismo nesta jornada.

À minha orientadora, Prof.^a Dra Sonia Mara Raboni, pela amizade e sua disponibilidade em sempre ensinar, os meus mais sinceros agradecimentos.

A Dr^a Líbera que junto com a minha orientadora, iniciaram o Laboratório de Pesquisa, lugar onde pude desenvolver toda a minha pesquisa.

À toda equipe do Laboratório de Virologia ao qual faço parte: Gisa, Indianara, Bárbara, Francielli, Luine, Clyete, Noely, Meri e Sérgio. Muito obrigada pelo convívio diário, amizade, palavras de apoio e incentivo e carinho, vocês são a minha segunda família! Aos meus novos colegas da Virologia neste último ano: Alessandra, Marina e Carolina;

Aos amigos Danieli e Altair pelo convívio harmônico e pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório. Aos novos colegas no Laboratório de Pesquisa: Bruna Alves, Thays, Laura, Gustavo, Lucas e Breno, e aos residentes multiprofissionais pela ajuda e amizade.

As colegas da pós-graduação Magda, Valéria, Jucélia, Beatriz e Heloísa, pela ajuda e convivência harmoniosa. Em especial à Bruna, amiga querida, que mesmo enfrentando desafios em sua vida, sempre se mostrou disposta a me ajudar. Minha sincera gratidão!

Ao Serviço de Epidemiologia do CHC, em especial ao Dr. Bernardo pela ajuda.

Ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, pelo apoio, estrutura e oportunidade de ingresso e a CAPES pelo apoio financeiro.

À banca, por terem aceito o convite de avaliar o meu trabalho e contribuírem com seus conhecimentos e experiências.

Ao Setor de Virologia do LACEN- PR, especialmente à Maria do Carmo, pela amizade e por sempre estar disponível a ajudar.

Finalmente, a todos os demais não mencionados, mas que de uma forma ou outra, contribuíram nessa caminhada para a realização desse trabalho, minha eterna gratidão!

RESUMO

A gripe é uma doença respiratória infecciosa aguda causada pelo vírus influenza, dos quais o tipo A tem maior impacto na saúde pública mundial, está associada a altas taxas de morbimortalidade devido à propensão a evoluir para síndrome respiratória aguda grave (SRAG). Dado que a evolução para SRAG é multifatorial, o conhecimento de biomarcadores de gravidade pode ser uma ferramenta importante para o desenvolvimento de estratégias contra as infecções causadas pelo vírus influenza A (FluA). Portanto, este estudo teve como objetivos: padronizar a quantificação absoluta da carga viral (CV) por RT-qPCR e avaliar os fatores associados à gravidade de doença em pacientes infectados por FluA. A quantificação absoluta de CV foi padronizada com DNA plasmidial, apresentou eficiência de 98,6%, R² de 0,998, faixa dinâmica de 10¹ a 10¹⁰, limite de detecção e de quantificação de 6,77 e 20,52 cópias/reação, respectivamente. Não foi observada variabilidade inter e intra ensaio e nenhum efeito de matriz. Em todos parâmetros avaliados, os coeficientes de variação foram menores que 5%. Para a validação clínica do ensaio foram realizadas duas quantificações seriadas de CV de 19 pacientes com o diagnóstico laboratorial positivo para FluA, internados no período entre 2015 a 2018 no Complexo Hospital de Clínicas da UFPR (CHC-UFPR). As medições em série das amostras clínicas coletadas em um intervalo de 72 horas não mostraram nenhuma alteração na CV. Em contraste, os pacientes imunocompetentes apresentaram uma CV significativamente mais baixa do que os imunossuprimidos. Para a determinação dos multifatores relacionados com a gravidade da doença, foram incluídos no estudo um total de 142 pacientes, com diagnóstico laboratorial positivo para FluA, no período de 2010 a 2018, no CHC-UFPR. Os vírus FluA foram subtipados e tiveram sua CV quantificada pelo método de RT-qPCR padronizado no estudo. As mutações no gene da hemaglutinina foram avaliadas pelo sequenciamento nucleotídico e os genótipos dos polimorfismos de nucleotídeo único na interleucina 28B foram identificados por qPCR. A análise multivariada identificou os seguintes fatores de risco para a gravidade da doença: infecção pelo subtipo (H1N1)pdm09 (OR = 2,29; IC 95% = 1,02-5,15; p = 0,046), CV (OR = 1,43; IC 95% = 1,09-1,88; p = 0,009), doenças cardíacas (OR = 5,47; IC 95% = 1,96-15,27; p = 0,001) e doenças neuromusculares (OR = 7,02; IC 95% = 1,18-41,75; p = 0,032). Um índice de prognóstico preditivo para admissão na UTI com o potencial de otimizar a triagem e o manejo clínico de pacientes de alto risco foi proposto com base na curva ROC (Índice = 3, com AUC = 0,812; p < 0,0001). A metodologia de CV padronizada pode ser aplicada para avaliar a evolução do quadro clínico dos pacientes por meio da quantificação seriada e da aplicação do escore proposto, uma vez que este apresentou alto desempenho em prever a admissão à UTI em pacientes infectados por FluA. No entanto, sua implementação no serviço de saúde está sujeito à validação em uma população maior.

Palavras Chave: Carga viral, quantificação absoluta, prognóstico, influenza A, SRAG, gravidade

ABSTRACT

Influenza is an acute infectious respiratory disease caused by the influenza virus, of which type A has the greatest impact on public health worldwide and is associated with high rates of morbidity and mortality due to the propensity to progress to severe acute respiratory infection (SARI). Given that the evolution to SARI is multifactorial, knowledge of severity biomarkers can be an important tool for developing strategies against infections caused by the influenza A virus (FluA). Therefore, this study aimed to: standardize the absolute quantification of viral load (VL) by RT-qPCR and assess factors associated with disease severity in patients infected with FluA. The VL absolute quantification was standardized with plasmid DNA, showed an efficiency of 98.6%, R² of 0.998, the dynamic range of 10¹ to 10¹⁰, detection and quantification limits of 6.77, and 20.52 copies/ reaction respectively. No inter-and intra-assay variability and no matrix effect were observed. In all parameters evaluated, the coefficients of variation were less than 5%. For the clinical validation of the trial, two serial VC measurements were performed in 19 patients with a positive laboratory diagnosis for FluA and hospitalized in the period between 2015 and 2018 at the Complexo Hospital de Clínicas of UFPR (CHC-UFPR). Serial measurements of clinical samples collected over a 72-hour interval showed no change in CV. In contrast, immunocompetent patients had a significantly lower CV than immunosuppressed ones. To determine the multifactors related to the severity of the disease, a total of 142 patients with positive laboratory diagnoses for FluA were included in the study, in the period from 2010 to 2018, at the CHC-UFPR. FluA viruses were subtyped and had their VL quantified by the RT-qPCR method standardized in the study. Mutations in the hemagglutinin gene were evaluated by nucleotide sequencing, and the genotypes of single nucleotide polymorphisms in interleukin 28B were identified by qPCR. Multivariate analysis identified the following risk factors for disease severity: infection by subtype (H1N1)pdm09 (OR= 2.29; 95% CI= 1.02-5.15; p= 0.046), VL (OR= 1.43; 95% CI= 1.09-1.88; p= 0.009), cardiovascular diseases (OR= 5.47; 95% CI= 1.96-15.27; p = 0.001) and neuromuscular diseases (OR= 7.02; 95% CI= 1.18-41.75; p= 0.032). A predictive prognostic index for ICU admission with the potential to optimize screening and clinical management of high-risk patients was proposed based on the ROC curve (Index = 3, AUC= 0.812; p<0.0001). The standardized VL methodology can be applied to assess the evolution of the clinical condition of patients through serial quantification and application of the proposed score since this presented a high performance in predicting admission to the ICU in patients infected with FluA. However, its implementation in the health service is subject to validation in a larger population.

Keywords: Viral load, absolute quantification, prognosis, influenza A, SRAG, severity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO VÍRUS INFLUENZA A.....	20
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO MONÔMERO DE HA NÃO CLIVADO DO VIRUS INFLUENZA A DE 1918 (H1N1).....	22
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA NA DO VÍRUS FLUA	23
FIGURA 4 - CLADO 6 COM SEUS RESPECTIVOS SUBCLADOS.....	26
FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO DOS SNP RS12979860 E RS8099917 NA REGIÃO DO CROMOSSOMO 19 Q13 DA IL- 28B.....	31
FIGURA 6 - REGISTRO EM ORDEM CRONOLÓGICA DAS PANDEMIAS CAUSADAS PELO VÍRUS FLUA.....	35
FIGURA 7 - DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE SRAG E DE FLUA NO PARANÁ NO PERÍODO DE 2010 A 2018.....	36
FIGURA 8 - DESENHO DO ESTUDO.....	46
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDEO.....	49
FIGURA 10 - DILUIÇÃO SERIADA DO PLASMÍDEO.....	51
FIGURA 11 - GRÁFICO TÍPICO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA.....	62
FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DE SUBTIPOS NO PERÍODO DE 2010 A 2018 NO CHC-UFPR.....	100
FIGURA 13 - ANÁLISE MULTIVARIADA DOS PREDITORES RELACIONADOS AOS SUBTIPOS FLUA.....	101
FIGURA 14 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO PARCIAL DA HEMAGLUTININA - 122-247AA - DE PACIENTES INFECTADOS COM O SUBTIPO FLUA (H1N1)PDM09.....	102

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PROTEÍNAS DO VÍRUS INFLUENZA A E SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES.....	18
QUADRO 2 - MUTAÇÕES ENCONTRADAS NAS SUBUNIDADES HA1 E HA2 DO GENE DA HA DO FLU A (H1N1)PDM09.....	26
QUADRO 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS ÓBITOS POR SRAG POR FLUA(H1N1)pdm09 EM 2009 NO BRASIL.....	35
QUADRO 4 - INICIADORES E SONDAS UTILIZADAS PARA DETECÇÃO DO VÍRUS FLUA	48
QUADRO 5 - FÓRMULA DO CÁLCULO EQUIVALENTES GENÔMICOS.....	50
QUADRO 6 - FATOR DE CONVERSÃO.....	54
QUADRO 7 - PAINEL DE INICIADORES E SONDAS PARA SUBTIPAGEM DO FLUA.....	57
QUADRO 8 - PAINEL DE INICIADORES USADOS PARA AMPLIFICAR PARCIALMENTE O GENE DA HEMAGLUTININA	59
QUADRO 9 - SEQUÊNCIAS E DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA DOS SNP DA IL-28B.....	61
QUADRO 10 - CRITÉRIOS PARA DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AS	Ácido Siálico
ANF	Aspirado nasofaríngeo
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cq	Ciclo de quantificação
CMV	Citomegalovírus
CNI	Centros Nacionais de Influenza
CV	Carga viral
CV%	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EIE	Ensaio Imunoenzimático
FDA	Do inglês “ <i>Food Drug Administrator</i> ”
FLUA	Influenza A
Gal	Galactose
GIHSN	Do inglês “ <i>Global Influenza Hospital Surveillance Network</i> ”
HA	Hemaglutinina
(H1N1)pdm09	Subtipo (H1N1) pandêmico/2009
IC	Intervalo de Confiança
IFI IFD	Imunofluorescência Indireta e Direta
IFITM3	Proteína transmembrana induzida por interferon 3
IFNλ3	Interferon lambda 3
LACEN-PR	Laboratório Central de Saúde Pública do Paraná
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MDCK	Do inglês: “ <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> ”
M1/M2	Gene da Matrix 1 e 2
MIQE	Do inglês “ <i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i> ”
NA	Neuraminidase
NS1	Proteína não- estrutural 1

OMS	Organização Mundial da Saúde
PB1/PB2	Polimerase básica 1 e 2
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucleico
RNPs	Ribonucleoproteínas
RP	RNase P humana
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real com transcrição reversa
SG	Síndrome Gripal
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
UTR	Do inglês “ <i>untranslated region</i> ”
UTI	Unidade de Terapia intensiva
VRS	Vírus sincicial respiratório

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	VÍRUS INFLUENZA.....	18
2.1.1	Estrutura Genômica.....	18
2.1.2	Hemaglutinina e Neuraminidase.....	21
2.1.3	Variabilidade Genética dos vírus influenza.....	24
2.1.4	Transmissão e Manifestações Clínicas.....	27
2.1.4.1	<i>Síndrome Gripal</i>	27
2.1.4.2	<i>Síndrome Respiratória Aguda Grave</i>	27
2.1.5	Patogenicidade e Gravidade.....	28
2.1.5.1	<i>Virulência</i>	28
2.1.5.2	<i>Resposta Imunológica do Hospedeiro</i>	29
2.1.6	Epidemiologia.....	32
2.1.7	Diagnóstico Laboratorial.....	36
2.1.8	Vigilância Epidemiológica.....	38
2.1.9	Vacinação.....	40
2.1.10	Antivirais e Resistência.....	41
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	43
3.1	JUSTIFICATIVA.....	43
3.2	OBJETIVO GERAL.....	43
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	45
4.2	PRIMEIRA SEÇÃO: PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DA CARGA VIRAL.....	47
4.2.1	Obtenção de controle positivo.....	47
4.2.2	Produção de controle positivo em larga escala.	48
4.2.3	Construção da Curva Padrão.....	50
4.2.4	Validação Analítica.....	51
4.2.4.1	<i>Efeito da matriz e presença de inibidores</i>	51
4.2.4.2	<i>Precisão do Método</i>	52
4.2.4.3	<i>Faixa Dinâmica Linear e Limite de Quantificação (LQ)</i>	52

4.2.4.4	<i>Limite de Detecção (LD)</i>	52
4.2.5	Validação Clínica do Ensaio	53
4.2.5.1	<i>Quantificação seriada de amostras clínicas</i>	53
4.2.6	Análise Estatística da Primeira Seção	54
4.3.	SEGUNDA SEÇÃO: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS	55
4.3.1	Avaliação da Carga Viral em Amostras Clínicas	55
4.3.1.1	<i>Casuística</i>	55
4.3.1.2	<i>Extração do Genoma</i>	56
4.3.1.3	<i>Identificação e subtipagem viral</i>	56
4.3.1.4	<i>Quantificação da carga viral</i>	58
4.3.2	Identificação das mutações no gene da HA de FluA (H1N1)pdm09	58
4.3.2.1	<i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	58
4.3.2.2	<i>PCR convencional</i>	58
4.3.2.3	<i>Sequenciamento</i>	59
4.3.2.4	<i>Análise filogenética do subtipo de FluA (H1N1)pdm09</i>	60
4.3.3	Polimorfismo de Nucleotídeo Único – SNP da IL28B	60
4.3.4	Análise Estatística da Segunda Seção	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Artigo 1	64
5.2	Artigo 2	73
6	RESULTADOS COMPLEMENTARES	100
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
8	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICE	129

1 INTRODUÇÃO

Influenza ou gripe é uma doença respiratória infecciosa aguda de origem viral, de elevada transmissibilidade e distribuição global, com tendência a se disseminar facilmente em surtos sazonais, afetando todos os tipos de grupos sociais e etários. Constitui-se em uma das grandes preocupações das autoridades sanitárias mundiais e apresenta alta incidência, acometendo cerca de 10% da população mundial anualmente (WHO, 2018; IULIANO *et al.*, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a gripe causa aproximadamente 290.000-650.000 mortes em todo mundo a cada ano, com taxa de letalidade variando de 5% a 15%, em população de alto risco. Os vírus influenza são responsáveis por epidemias sazonais, frequentemente associadas com o aumento das taxas de hospitalizações e morte (GBD, 2017; WHO, 2019). Além disso, têm impacto na economia devido aos gastos diretos nos serviços de saúde, ocasionando importantes perdas na produtividade da força de trabalho durante as epidemias (NOAH *et al.*, 2013; PUTRI *et al.*, 2018). Para reduzir seu impacto existem duas ferramentas utilizadas: a vacina e os antivirais inibidores de neuraminidase. Além dessas estratégias, a evolução dos métodos moleculares que estão atualmente disponíveis em laboratórios clínicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), propiciam maior agilidade e sensibilidade no diagnóstico, quando comparados com as técnicas de cultivo celular e pesquisa de antígeno. Além disso a técnica de qPCR possibilita a detecção e quantificação da carga viral, e já faz parte do protocolo na rotina assistencial de diversas doenças infecciosas virais, como a do vírus da imunodeficiência humana (HIV), do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV) e do citomegalovírus (CMV) (WATZINGER *et al.*, 2004; RAZONABLE; HUMAR, 2013; CLARK *et al.*, 2016, WARKAD *et al.*, 2018).

Devido à alta taxa de mutação relacionada aos vírus influenza, principalmente ao do tipo A, o monitoramento epidemiológico e molecular é de fundamental importância, pois permite detectar a presença de mutações relacionadas à resistência aos antivirais, à virulência e antigenicidade (MCADAM *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2013).

Os mecanismos que estão relacionados na patogênese e gravidade da infecção respiratória aguda causada pelo vírus FluA, ainda não estão muito bem esclarecidos, assim como o papel da carga viral na evolução da doença. Sabe-se que

uma parcela se dá por fatores virais, como a carga viral, mutação e virulência, por fatores ambientais, como a vacinação e manejo clínico e por fatores relacionados ao hospedeiro, como os fatores de riscos clínico - epidemiológicos e resposta imune. Dessa maneira, o conhecimento da relação destes fatores, podem contribuir para uma melhor compreensão e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam reduzir o impacto destas infecções na população (NOH *et al.*, 2014; TEIJARO, *et al.*, 2015; GRANADOS *et al.*, 2017).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS INFLUENZA

2.1.1 Estrutura Genômica

Os vírus influenza A (FluA) pertencem à família *Orthomyxviridae* que é composta por sete gêneros: *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Quaranjavirus* e *Thogotovirus*. Sendo os Influenza virus tipos A, B, C, as espécies de importância clínica, envolvidas em quadros de infecções respiratórias em seres humanos (KUCHIPUDI; NISSLY, 2018; ICTV, 2020). São vírus envelopados e de RNA de fita única com polaridade negativa, possuem oito segmentos que codificam até o momento 17 proteínas estruturais e não estruturais que desempenham diferentes funções na arquitetura e dinâmica do ciclo replicativo viral (QUADRO 1).

(continua)

QUADRO 1 – ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS INFLUENZA

PROTEÍNAS	SEGMENTO	FUNÇÃO
RNA polimerases dependentes de RNA viral (PB,PA)	1 - PB2	Participa do processo de transcrição e replicação
	2 - PB1	Possui atividade de endonuclease e alongamento
	- PB1-F2	Modula a resposta do hospedeiro à infecção pelo vírus FluA, induz a apoptose
	- PB1-N40	Proteína não essencial, mas interage com PB2 e melhora a eficiência da replicação viral
	3 - PA	Participa no processo de transcrição e replicação
	- PA-X	Modula a resposta do hospedeiro e a virulência viral
	- PA-N155	Papel na replicação viral
	- PA-N182	Papel na replicação viral
Hemaglutinina (HA)	4 - HA	Receptor de ligação; atividade de fusão; e maior antígeno viral
Nucleoproteína (NP)	5 - NP	Ligação, síntese de RNA viral e importação nuclear de RNA
Neuraminidase (NA)	6 - NA	Atividade de sialidase

(conclusão)

QUADRO 1 – ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS INFLUENZA

Proteínas de Matrix (M)	7 - M1	Interação com as RNPs virais e glicoproteínas de superfícies
	- M2	Desempenha papel importante na entrada e montagem do vírus, afeta as funções celulares do hospedeiro e é um alvo para drogas antivirais e vacinação
	- M42	Modula a patogenicidade do vírus
Proteínas Não-estruturais (NS)	8 - NS1	Inibidora da resposta imune inata
	- NS2/ NEP	Exportação nuclear das RNPs virais do núcleo para o citoplasma celular
	- NS3	Fortemente associado com a mudança de hospedeiros aviários para mamíferos

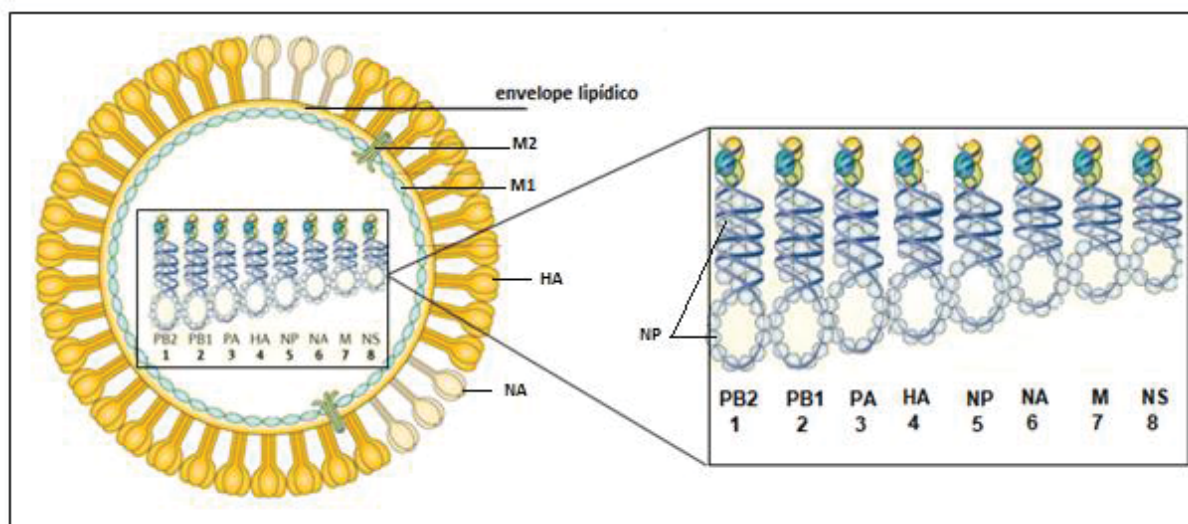
FONTE: WISE *et al.*, 2012; MURAMOTO *et al.*, 2013.

LEGENDA: FluA= influenza A; RNA= ácido ribonucleico; RNPs= ribonucleoproteínas.

Os segmentos 1,2 e 3 codificam as três subunidades chamadas de RNA polimerases dependentes de RNA viral (PB1, PB2 e PA). Elas são responsáveis pela síntese e replicação de RNA em células infectadas. Os dois segmentos de RNA, 4 e 6, codificam as glicoproteínas virais hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). O genoma de RNA é ligado pela nucleoproteína viral (NP), que é codificada pelo segmento 5 de RNA. O gene M, segmento 7 do RNA viral do influenza, codifica duas proteínas, a M1 de 252 aminoácidos e a M2 de 97 aminoácidos. Por ser um gene altamente conservado é utilizado para a detecção e diferenciação molecular dos vírus influenza A e B. Além disso, a proteína M é a mais abundante do vírus influenza, sendo um alvo importante para testes de diagnósticos moleculares (DAS *et al.*, 2012). Acredita-se que a proteína M1 forneça um suporte que ajuda na estrutura do vírion e que, juntamente com a proteína de exportação nuclear (NEP), regula o tráfego dos segmentos de RNA viral na célula. Além disso, desempenha um papel crítico no recrutamento de outros componentes virais durante a montagem e interage com as ribonucleoproteínas virais (vRNPs). Está envolvida em vários estágios do ciclo infeccioso viral e embora o gene que codifica para esta proteína também seja propenso a mutação, há uma região imunogênica que é evolutivamente conservada, em quase todas as cepas de vírus influenza incluindo (H1N1)pdm09, H5N1 e H3N2 (MEDINA; GARCIA-SASTRE, 2011; SCHRAUWEN *et al.*, 2014; EISFELD *et al.*, 2015; MANZOOR *et al.*, 2017). A proteína M2 é um canal de prótons necessária para a entrada e saída do vírus, inicialmente ela estabiliza o local de brotamento e, na

sequência altera a curvatura da membrana, causando sua ruptura e a liberação do vírion. Está localizada na superfície do vírus ancorada em uma membrana lipídica derivada da célula infectada, junto com as glicoproteínas HA e NA (ROSSMAN; LAMB, 2011). Segundo a literatura, o gene M evolui 5 a 10 vezes mais lentamente do que o gene da HA e embora haja uma diferença nas taxas de evolução entre as regiões codificantes para M1 e M2; com M2 evoluindo um pouco mais rapidamente do que M1 (HOM *et al.*, 2019). A proteína não-estrutural 1 (NS1) é codificada pelo segmento 8 e é um fator de virulência que inibe as respostas antivirais do hospedeiro em células infectadas. Os vírus FluA também podem expressar proteínas virais acessórias adicionais em células infectadas, como PB1-F2 e PA-X, que participam na prevenção de respostas antivirais inatas do hospedeiro juntamente com a proteína NS1. Atualmente as proteínas relacionadas ao potencial patogênico do vírus são a HA, PB1, PB2 e NS e as relacionadas ao desenvolvimento de resistência às drogas antivirais são a NA e M2 (HUSSAIN, *et al.*, 2017; KRAMMER *et al.*, 2018; CAI *et al.*, 2020) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO VÍRUS INFLUENZA A



FONTE: Adaptada de KRAMMER *et al.*, (2018).

LEGENDA: A figura representa uma partícula do vírus influenza A ou vírion que compreendem oito segmentos de RNA de fita simples. 1,2 e 3: RNA polimerases dependentes de RNA (PB1, PB2 e PA), 4: hemaglutinina (HA), 5: nucleoproteína viral (NP), 6: neuraminidase (NA), 7: proteína de matriz (M) e 8: proteína não-estrutural (NS).

2.1.2 Hemaglutinina e Neuraminidase

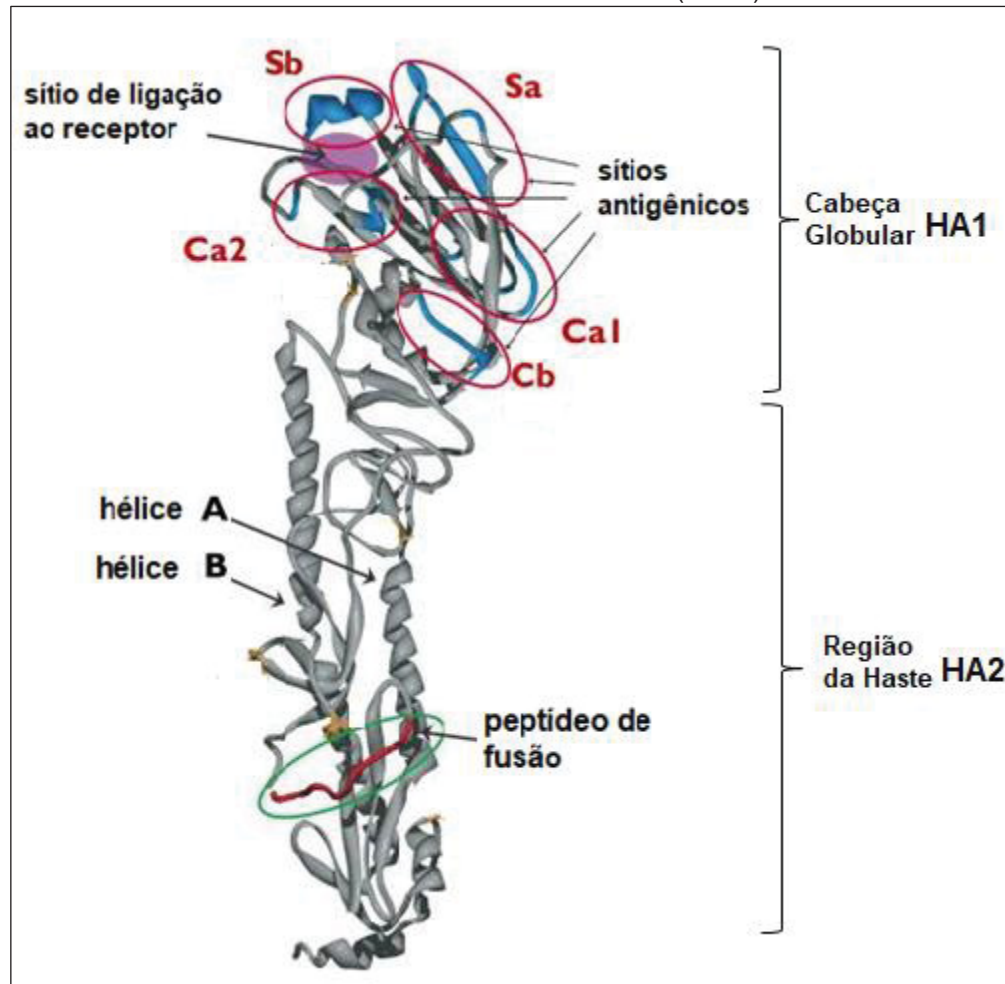
No envelope viral estão inseridas as duas principais proteínas dos vírus influenza, em relação à resposta antigênica e evolução molecular, a HA e NA. Ambas são glicoproteínas de superfície e são utilizadas para diferenciar os subtipos de FluA.

A HA é a proteína mais imunogênica do FluA, sendo o principal alvo dos anticorpos neutralizantes que impedem a ligação com o ácido siálico (AS), bloqueando o sítio de reconhecimento e com isso evitando a entrada na célula e a replicação do vírus. Até o momento foram descritos 18 tipos de HA (H1 a H18), todos identificados em aves, exceto H17 e H18, identificados em morcegos (HUANG *et al.*, 2009; TONG *et al.*, 2012; TONG *et al.*, 2013; CDC, 2019; SEDEYN; SAELENS, 2019). A HA é uma proteína trimérica composta por duas regiões estruturalmente distintas, uma haste e uma cabeça globular. Apresenta duas importantes funções no processo replicativo, é responsável pelo reconhecimento e ligação aos receptores de AS da superfície celular e pela fusão do envelope viral com a membrana interna do endossomo, permitindo a entrada do vírus nas células do hospedeiro. É sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (RER) do hospedeiro, como um polipeptídeo único, HA0. Esse precursor é transportado para a membrana plasmática e durante a replicação do vírus, é clivado por proteases celulares, resultando em duas subunidades, HA1 e HA2. Esse processo de clivagem é um fator fundamental para que a partícula viral se torne infecciosa (SHAW; PALESE, 2007; BOUVIER; PALESE, 2008; JAWETZ *et al.*, 2013).

Na subunidade HA1 que corresponde à porção amino-terminal da proteína, região externa do envelope viral está localizada a cabeça globular, local de ligação do receptor ao AS, circundada pelos sítios antigênicos, locais variáveis onde ocorrem as glicosilações e os domínios de ligação aos receptores celulares (TSCHERNE *et al.*, 2011; SRIWILAIJAROEN & SUZUKI, 2012). A fusão do envelope viral com a membrana é mediada pela HA que sofre uma mudança conformacional com a acidificação do pH e expõe o peptídeo N-terminal hidrofóbico, denominado "peptídeo de fusão", presente na região da haste da subunidade HA2 (BOUVIER & PALESE, 2008). Com a acidificação do compartimento endossômico também ocorre o bombeamento de íons de hidrogênio para a partícula viral por meio do canal de íons da proteína M2, que possui um canal iônico transmembrana encontrado apenas no

vírus FluA. Esse processo permite que os RNPs presentes na matriz viral sejam liberados para o citoplasma da célula (FIGURA 2).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO MONÔMERO DE HA NÃO CLIVADO DO VIRUS INFLUENZA A DE 1918 (H1N1)



FONTE: Adaptada de PALESE AND SHAW (2007).

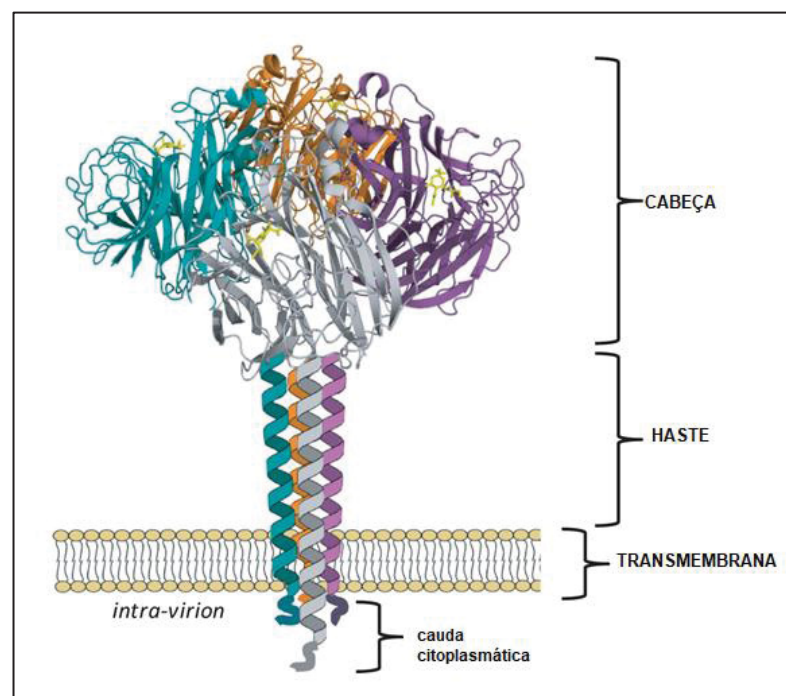
LEGENDA: A cabeça globular está localizada na subunidade 1 da hemaglutinina (HA1) e contém o sítio de ligação ao receptor de ácido siálico, indicado em rosa e pelos cinco locais antigênicos previstos: Sa, Sb, Ca1, Ca2 e Cb, em azul e circundados em vermelho. A região da haste está localizada na subunidade 2 da hemaglutinina (HA2) e é constituída pelas hélices A e B e pelo peptídeo de fusão, localizado dentro do círculo verde.

A HA possui duas importantes funções no processo de replicação: modulação do tropismo tecidual e patogênese viral. A membrana citoplasmática das células epiteliais do trato respiratório superior e inferior é rica em resíduos de AS e, ambas, HA e NA, possuem alta afinidade por estes resíduos. Geralmente estes resíduos estão ligados à galactose (Gal) por ligações do tipo α -2,6 (presentes em grande quantidade nas células epiteliais do trato respiratório superior) e do tipo α -2,3 (presentes nas células epiteliais do trato respiratório inferior em humanos) (MATROSOVICH *et al.*,

2015). Os subtipos aviários altamente patogênicos utilizam receptores de AS do tipo α -2,3, encontrados nas células de intestino dessas aves e podem causar uma pneumonia grave e rapidamente progressiva. Porém, apresentam baixa transmissibilidade entre humanos (NICHOLLS *et al.*, 2008; GAMBOTTO *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010).

A NA é codificada pelo 6º segmento do RNA viral e sua estrutura é de uma haste com uma porção globular (cabeça) na extremidade formando um tetrâmero que dobra-se em quatro domínios estruturais distintos conhecidos como: cabeça, haste, região transmembrana e cauda citoplasmática (FIGURA 3). Desempenha papel importante nas etapas de invasão, replicação, maturação e liberação dos vírus. Catalisa a clivagem de ligações α -2,3 e α -2,6 cetosídicas entre um resíduo terminal de AS e um resíduo adjacente de açúcar, tendo como função facilitar a mobilidade dos vírus em direção ao sítio de infecção e a partir dele para um próximo sítio.

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA DA NA DO VÍRUS FLUA



FONTE: Adaptado de MCAULEY *et al.* (2019).

LEGENDA: Cada monômero consiste em quatro domínios estruturais distintos, conhecidos como cabeça catalítica, haste, região transmembrana e cauda citoplasmática. Os monômeros de domínio de cabeça são mostrados em verde, cinza, roxo e laranja (informações estruturais retiradas do banco de dados da proteína A / Tanzania / 205/2010 N2- NA, gerado pelo software Pymol).

A NA é também um importante indutor da produção de anticorpos pelo hospedeiro, onde o sítio ativo localizado na cabeça da espícula se liga ao AS e apresenta uma estrutura altamente conservada, sendo alvo de fármacos antivirais em desenvolvimento (CHEUNG, *et al.*, 2007; FERRARIS, *et al.*, 2008). Até o momento foram descritos 11 tipos de NA, 9 (N1-9) identificados em aves e dois adicionais em morcegos (N10-11).

2.1.3 Variabilidade Genética dos vírus Influenza A

Diferentes processos estão relacionados as mudanças evolutivas dos vírus de RNA, são elas: mutação, recombinação ou rearranjo gênico, seleção, deriva gênica e migração. Os vírus FluA estão em constante evolução e apresentam variações antigênicas significativas nas suas glicoproteínas, HA e NA. Como forma de adaptação, para manter-se circulante e para escapar da imunidade natural os vírus FluA dependem de dois importantes mecanismos evolutivos:

a) Mutações pontuais (*antigenic drifts*): são mutações do material genético que apresentam alterações discretas introduzidas nos principais epítomos virais, causando a evolução gradual dos vírus e que originam novas estirpes dentro do mesmo subtipo. Devido à falta de mecanismos de revisão associados com a RNA polimerase dependente de RNA codificada pelo vírus, mutações frequentes são introduzidas no genoma do vírus influenza durante o ciclo de replicação. São responsáveis pelos surtos da gripe sazonal e também explica porque as vacinas da gripe se tornam menos eficazes ao longo do tempo, sendo reformuladas a cada ano de acordo com a estirpe que potencialmente será a circulante (WEBSTER *et al.*, 2014; TEWAWONG *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2018).

b) Rearranjo genético ou mudança antigência (*antigenic shift*): resulta em uma troca completa de genes HA e/ou NA e estão associados com o aparecimento de novos subtipos de FluA. O rearranjo genético acontece quando o vírus influenza de cepas distintas coinfetam a mesma célula hospedeira e geram descendência com um genoma misto. Os vírus presentes hoje em humanos são todos descendentes de cepas pandêmicas anteriores que evoluíram através da deriva em humanos (WEBSTER *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2018). São responsáveis por pandemias, pois não há imunidade cruzada entre os diferentes subtipos de FluA, uma vez que a imunidade

é subtipo-específica (COX *et al.*, 1999; NOAH, *et al.*, 2005; CHRISTMAN, 2011; CDC, 2019).

As mutações genômicas do vírus FluA podem conferir características que permitem trazer maior capacidade de infecção e transmissão, resistência a medicamentos e agravamento do quadro clínico dos pacientes. As mutações mais comumente observadas são nas regiões da HA, associadas a virulência e gravidade; vários estudos têm observado substituições de resíduos em seus quatro sítios antigênicos (Sa, Sb, Ca e Cb) (NGUYEN *et al.*, 2015; ADAM *et al.*, 2019). Segundo Barde e colaboradores (2017), a taxa de mutação do gene da HA é estimada em $6,7 \times 10^3$ substituições por sítio por ano (BARDE *et al.*, 2017). Para a NA, as mutações podem conferir sensibilidade reduzida ou possibilitar o aparecimento de resistência aos inibidores da neuraminidase (INAs) como: oseltamivir, peramivir e zanamivir (TAKASHITA *et al.*, 2015; VIDAÑA *et al.*, 2020).

As variantes dos vírus FluA do subtipo H3N2 (H3N2v) com o gene da matriz (M) do vírus FluA (H1N1)pdm09, foram detectados pela primeira vez em humanos em 2011. Nos últimos anos cerca de sete clados do H3N2 (1 a 7) e vários subclados foram encontrados. O clado 3 é o grupo dominante, e se diferenciou em três subclados principais designados: 3A, 3B e 3C (HAVERI *et al.*, 2015). Em 2014, os clados 3C.2a e 3C.3a do FluA (H3N2) surgiram e contribuíram para reduzir a eficácia da vacina (SUNTRONWONG *et al.*, 2021). Para os vírus do subtipo A(H1N1)pdm09, em estudos realizados em 2009 nos EUA, no primeiro semestre de circulação mundial desse subtipo, foram encontrados 7 grupos filogenéticos, G1 a G7 (QUADRO 2). No Brasil e na Índia foram encontrados circulando nesse período, os grupos: G5, G6 e G7 (POTDAR *et al.*, 2010; GOÑI *et al.*, 2012). No período pós-pandêmico, de 2011 a 2014, o grupo de vigilância do Centro Europeu para Controle e Prevenção de Doenças (ECDC) relatou a circulação na Europa de pelo menos 6 grupos filogenéticos (G2 - G7) e 3 subgrupos (6A - 6C). O clado 6B que surgiu a partir de 2013 e foi associado a altas taxas de hospitalizações entre adultos com idade entre 50 a 64 anos (HSIEH *et al.*, 2018). Nas temporadas de 2015-2016, os vírus do clado 6B divergiram em 6b.1 e 6b.2, sendo esses dois clados predominantes em países da Europa, América do Norte e Oceania, somente a partir de 2016 que o clado 6b.1 tornou-se predominante mundialmente (WEDDE *et al.*, 2013; ECDC, 2015;). Na figura 4 estão listadas as mutações que caracterizam o clado 6 e seus subclados dos vírus FluA (FIGURA 4).

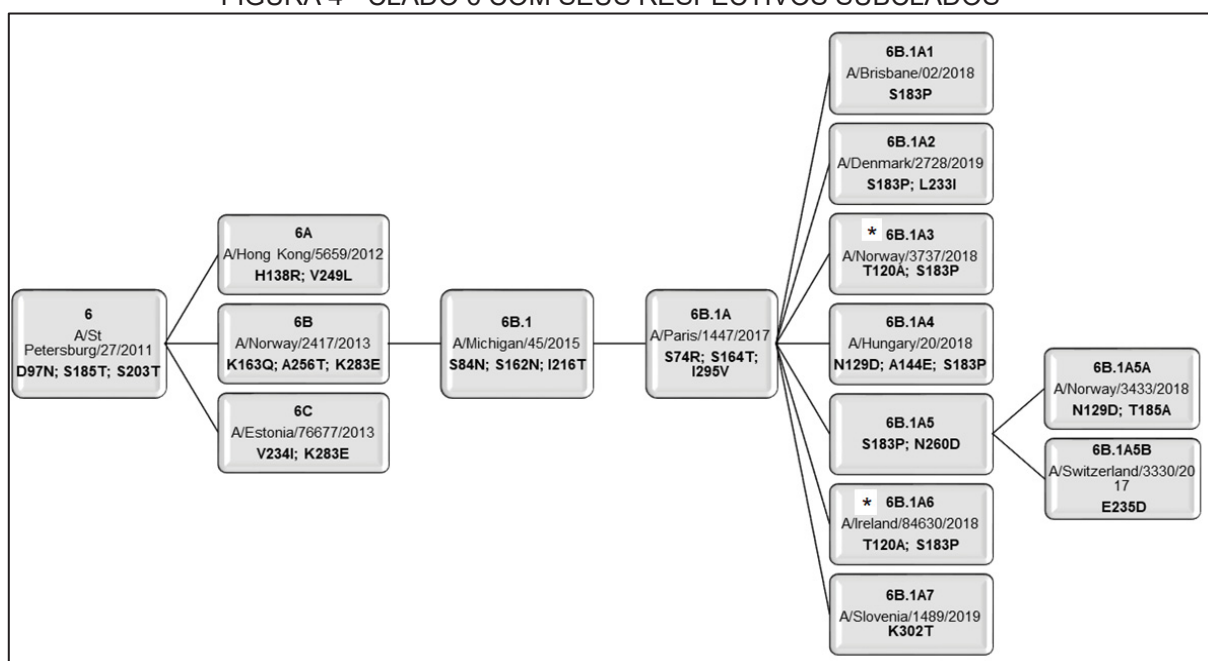
QUADRO 2 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DO VÍRUS FLUA

Clado e subclados	Sequência Referência	*Substituições (aminoácidos)
1	A/California/7/2009	NENHUMA
2	A/Czech Republic/32/2011	N31D, A186T, S162N
3	A/Hong Kong/3934/2011	A134T; S183P
4	A/Christchurch/16/2010	N125D
5	A/Astrakhan/1/2011	D97N; R205K; I216V; V249L
6	A/St Petersburg/27/2011	D97N; S185T; S203T
7	A/St Petersburg/100/2011	S143G; A197T

FONTE: Adaptado do ECDC (2021).

LEGENDA: *Substituições em HA1.

FIGURA 4 - CLADO 6 COM SEUS RESPECTIVOS SUBCLADOS



FONTE: Adaptado do ECDC (2021).

LEGENDA: *mesmas substituições do subclado 6B.1A3, porém emergindo próximo ao subclado 6B.1A5.

2.1.4 Transmissão e Manifestações Clínicas

A transmissão dos vírus influenza pode ser direta, de pessoa a pessoa por meio de gotículas respiratórias e aerossóis que contêm partículas virais ao espirrar, falar ou tossir ou indireta e, por meio das mãos que após o contato com fluidos corporais, objetos (fômites) ou superfícies contaminadas carregam o vírus para a boca, nariz e olhos (LINDSLEY *et al.*, 2016; CDC, 2018). Os vírus da gripe infectam as células epiteliais do trato respiratório superior e inferior, onde ocorre o primeiro ciclo de replicação. O período de incubação da influenza é em média de 1 a 4 dias e os indivíduos adultos infectados podem transmitir o vírus antes do início de sintomas, porém é no período sintomático, entre as primeiras 24 até 72 horas do início da doença, que ocorre o período de maior transmissibilidade devido à alta concentração de vírus eliminados (SHAW; PALESE, 2013; CDC, 2018).

2.1.4.1 Síndrome Gripal (SG)

A SG é caracterizada pelo indivíduo que apresente quadro respiratório agudo, caracterizado por pelo menos dois dos seguintes sinais e sintomas: febre (mesmo que referida) $\geq 38^{\circ}\text{C}$, calafrios, dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza, com início nos últimos sete dias. A maioria das pessoas tem a doença sem complicações, apresentando melhora em torno do sexto dia de evolução, porém em crianças menores de dois anos de idade, gestantes, adultos com mais de 65 anos, indivíduos com doenças crônicas e imunossuprimidos, a gripe pode evoluir para a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) (NICHOLSON *et al.*, 2011; WHO, 2011b; CDC, 2020).

2.1.4.2 Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG)

Para a OMS, a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), é definida como uma doença respiratória aguda com história de febre ou febre aferida $\geq 38^{\circ}\text{C}$ e tosse, e presença de sinais de insuficiência respiratória (dispneia, esforço respiratório), exigindo hospitalização, podendo ocorrer em todas as faixas etárias (WHO, 2015). A complicação mais grave é a pneumonia, causada pelo próprio vírus ou pela infecção

secundária com bactérias, podendo levar à hospitalização e à morte. Outras alterações, como linfopenia, alterações radiológicas de tórax e complicações cardíacas graves também podem ser encontradas (TAVARES *et al.*, 2017; FICA *et al.*, 2019). Além do influenza, outros vírus como o vírus sincicial respiratório (VSR), adenovírus, hantavírus e coronavírus e outros agentes como pneumococcus, *Legionella sp.*, *Leptospira sp.*, podem estar envolvidos na causa da SRAG (RIBEIRO *et al.*, 2010).

2.1.5 Patogenicidade e Gravidade

A capacidade do vírus em causar doença grave está relacionada a fatores virais - como a virulência, mutações, fatores do hospedeiro - como a resposta imunológica e com fatores sócio-ambientais - como acesso ao tratamento, vacinação, condições nutricionais e manejo clínico correto (HORBY *et al.*, 2012; HORBY *et al.*, 2013, HEATON *et al.*, 2014).

2.1.5.1 Virulência

A rapidez e a gravidade com que um patógeno produz lesões ou sintomas no hospedeiro ou em um tecido são chamadas de virulência (RYAN; RAY, 2014; SUMBRIA *et al.*, 2019). As proteínas virais HA e NA, desempenham importante papel na virulência e as alterações sofridas nestas moléculas podem levar ao aumento da especificidade do vírus a determinados receptores, à ruptura de barreiras protetoras do hospedeiro, ou ainda, à potencialização da capacidade replicativa e de adaptação viral (SCHRAUWEN *et al.*, 2014). A mutação em um único aminoácido da HA pode aumentar o tropismo e a propagação do vírus para o trato respiratório inferior e causar uma infecção mais grave (LIU *et al.*, 2010; CLOHISEY; BAILLIE, 2019).

Estudos anteriores indicaram que mutações no gene da NA, permitem o recrutamento de uma protease alternativa (plasminogênio/plasmina) para ativação de HA. Elas também podem interferir no processo de infectividade, principalmente na etapa de liberação do vírus da célula hospedeira (ZAMBON, 2001; SUN *et al.*, 2010). Estudos genéticos demonstraram que a NA liga-se ao plasminogênio, aumentando a

concentração local deste precursor de proteases, permitindo o aumento da clivagem da HA (GOTO *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2010).

Outro importante contribuinte para a patogenicidade viral descrito na literatura é o complexo de polimerase viral, PB2, provavelmente pela função de controlar diretamente os níveis de replicação de RNA viral. Foram demonstradas que muitas substituições na proteína viral PB2 podem aumentar a virulência e a replicação viral do vírus H5N1, da gripe aviária (MASE *et al.*, 2006; TSCHERNE *et al.*, 2011; CAI *et al.*, 2020).

2.1.5.2 Resposta Imunológica do Hospedeiro

Além da virulência intrínseca do vírus, o risco de desenvolver infecção grave por influenza, vem sendo relacionado a alguns fatores clínico-epidemiológicos presentes no hospedeiro, como a idade (idosos com mais de 65 anos e crianças menores de cinco anos), gestação, imunossupressão e as comorbidades (doenças respiratórias crônicas, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doenças renais, hepáticas, cardíacas, neoplasias, diabetes mellitus e obesidade). Indivíduos que apresentam esses fatores são reconhecidos pela OMS como grupo de risco para desenvolvimento de SRAG e no Brasil são o alvo da vacinação nacional de influenza (LAU *et al.*, 2014; MS, 2016; WHO, 2020).

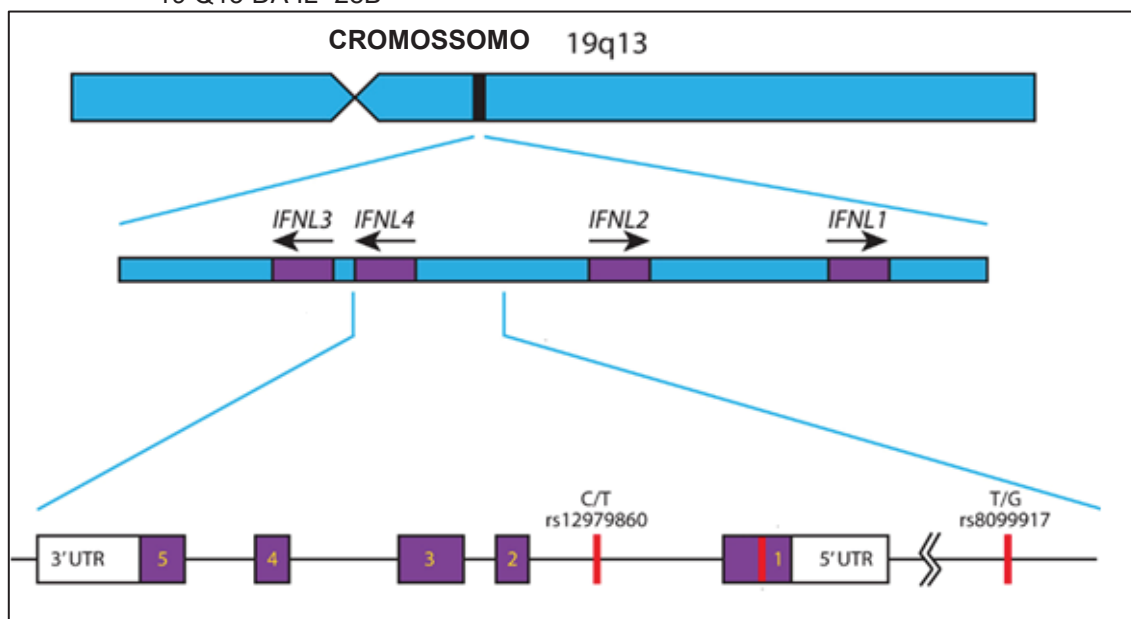
Entre os fatores imunológicos relacionados à resposta do hospedeiro às infecções causadas por vírus, destaca-se o sistema imune inato, primeira linha de defesa do organismo humano e que possui mecanismos eficientes que atuam como barreira no combate a uma ampla variedade de vírus (KALFASS *et al.*, 2013; SUMBRIA *et al.*, 2019). Dentre estes mecanismos estão as citocinas, grande grupo de glicoproteínas, produzidas por diversos tipos de células, estimuladas antigenicamente e responsáveis por sinalizar e regular a resposta imune. Entre os sinalizadores celulares naturais, estão os interferons (IFN), glicoproteínas que pertencem à classe das citocinas e que possuem atividades antivirais, antiproliferativas e imunomoduladoras. Os IFN humanos são classificados como tipo I, II e III, com base no tipo de receptores usados para a sinalização. Os do tipo III, também conhecidos como IFN- λ (interferon lambda), são compostos pelo IFN- λ 1 (interleucina 29), IFN- λ 2 (interleucina 28A) e IFN- λ 3 (interleucina 28B). A interleucina

28B (IL-28B) está localizada no cromossomo 19 e está envolvida no controle de infecções virais (SHEPPARD *et al.*, 2003; ABBAS *et al.*, 2015; TEIJARO *et al.*, 2015). Os IFN- λ são os IFNs predominantes, induzidos em células epiteliais pelos vírus respiratórios (KESHAVARZ *et al.*, 2019). Estudos sugerem que a resposta induzida pelo IFN- λ da mucosa seja o principal responsável pela proteção do trato respiratório contra os vírus (JEWELL *et al.*, 2010; PLANET *et al.*, 2016).

A variação genética individual influencia diretamente na resposta imune, contribuindo para o aumento na suscetibilidade e desfecho de doenças infecciosas, autoimunes e câncer (OLIVEIRA, *et al.*, 2011). A função dos genes e sua habilidade de regular a imunidade, principalmente em epitélios, podem sofrer impacto com os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do termo em inglês *single nucleotide polymorphism*), que são mutações onde ocorre a substituição de um único nucleotídeo. Os genes humanos possuem um grande número de SNP que foram identificados por meio das técnicas de sequenciamento e bioinformática, porém a função e o significado biológico da maioria desses, ainda são desconhecidos. Os SNP podem estar em diferentes regiões dos genes, como nas regiões promotoras, nas regiões de íntrons ou regiões não codificantes (UTRs), promovendo mudanças na expressão gênica e de sequências de proteínas. Esta variabilidade genética identificadas pelos SNP frequentemente são utilizadas para compreensão de doenças presentes na população (SACHIDANANDAM *et al.*, 2001; SILVA, 2015; SYEDBASHA; EGLI, 2017).

Foram descritos para o gene da IL-28B, relacionados à infecção viral, em estudos envolvendo o HCV, os SNP que ocorrem nas regiões rs12979860 e rs8099917 (FIGURA 5). Os alelos principais desses SNP foram associados com maior rapidez na resolução da infecção (*clearance*) e na melhor resposta ao tratamento com ribavirina (JIMENÉZ-SOUSA *et al.*, 2013).

FIGURA 5 - LOCALIZAÇÃO DOS SNP RS12979860 E RS8099917 NA REGIÃO DO CROMOSSOMO 19 Q13 DA IL- 28B



FONTE: Adaptado de O'BRIEN *et al.*, 2014.

LEGENDA: Localização da família de genes do interferon lambda 1-4 (IFN- λ 1-4) são mostrados em sua orientação e posição correta na região do cromossomo 19 q13. O SNP rs12979860 está localizado dentro do íntron 1 do IFNL4 e o rs8099917 está localizado entre os genes IFNL2 e IFNL3. IFNL4 está localizado na fita reversa do cromossomo 19, com 5 exons e regiões 3' / 5' não traduzidas.

Para outros vírus, o papel dos SNP da IL-28B não estão bem estabelecidos e muitos estudos estão sendo realizados para uma melhor compreensão da sua importância. Em estudos com pacientes que realizaram transplante de medula óssea, foi observada uma incidência menor de infecção ativa pelo citomegalovírus (CMV) em doadores que apresentaram SNP rs12979860 na IL-28B, genótipo T/T, alelo menos frequente (BRAVO *et al.*, 2014; EGLI *et al.*, 2014a). Em estudos realizados em crianças com bronquiolite, provocada pelo vírus sincicial respiratório (VSR), foi encontrada uma frequência para o genótipo C/C para o SNP rs12979860, de 35% e para o genótipo T/T, para o SNP rs8099917 de 63%, porém não foi encontrada nenhuma correlação com gravidade de doença para ambos os SNP (SCAGNOLARI *et al.*, 2012). Outro estudo realizado com uma coorte de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), os que possuíam o SNP rs8099917 com genótipo G/G (alelo menos frequente), apresentaram uma maior taxa de exacerbação grave da doença (EGLI *et al.*, 2018). Outro estudo envolvendo pacientes diabéticos e com hepatite, o SNP rs8099917 genótipo G/G foi considerado de risco e o rs12979860 genótipo C/C protetor (TILLMANN *et al.*, 2011). Em estudos envolvendo pacientes

infectados com o vírus FluA, não foi observada associação do SNP rs8099917 com severidade da doença (KESHAVARZ *et al.*, 2019). Outro estudo mostrou que pacientes com os genótipos rs8099917 TG/GG estavam associados com uma maior soroconversão, após serem vacinados para o vírus influenza (EGLI *et al.*, 2014b). Na população Americana de acordo com Projeto 1000 genomas, onde são apresentados dados mais abrangentes da variação genética, são encontradas as frequências para o alelo principal C do SNP rs12979860 de 60% e de 40% para o alelo T (ENSEMBL.ORG, 2021a). Para o SNP rs8099917, a frequência para o alelo principal T é de 92% e de 8% para o G, alelo menor (ENSEMBL.ORG, 2021b).

Outros exemplos de SNP relacionados com a gravidade de infecção causada por influenza já foram encontrados. Em um estudo italiano, crianças infectadas pelo vírus FluA(H1N1)pdm09 que apresentaram um SNP adicional, rs5743313 (genótipo C/T) no TLR3 (receptores do tipo *Toll* - pertencente à família de proteínas transmembranas) desenvolveram pneumonia (ESPOSITO *et al.*, 2012; NETEA *et al.*, 2012). Outro estudo multicêntrico realizado na China, com adultos infectados com influenza subtipo H7N9 e (H1N1)pdm09, associou este mesmo SNP a casos fatais (LEE *et al.*, 2017). O SNP rs34481144, localizado na região 5'-UTR do gene IFITM3 (proteína transmembrana induzida por interferon 3) foi associado ao risco de influenza grave em humanos nos Estados Unidos (EISFELD; KAWAOKA, 2017). Também foi encontrado o SNP rs16944 localizado no motivo TATA box da região promotora do gene IL-1beta (IL-1 β), afetando a sua atividade de transcrição. O aumento dessa interleucina pode causar dano pulmonar durante a infecção pelo FluA (KESHAVARZ *et al.*, 2019).

2.1.6 Epidemiologia

O vírus influenza é um vírus zoonótico, possui grande potencial de transmissão, ocorre globalmente com uma taxa de incidência anual estimada de 5% a 10% entre adultos e de 20% a 30% em crianças.

Dentre todas as possíveis combinações entre HA e NA para o surgimento de novas cepas, apenas três subtipos de FluA (H1N1, H2N2 e H3N2) apresentam transmissão inter-humano sustentada. Atualmente, co-circulam na população humana causando a gripe sazonal, os subtipos de FluA(H1N1)pdm09 e H3N2 (SHAW;

PALESE, 2007; TONG *et al.*, 2012; TONG *et al.*, 2013; CDC, 2019). Já os subtipos como H5N1, H7N3, H7N7, H7N9, H7N2, H9N2, H10N8 e H6N1 (de origem aviária), também podem infectar humanos, provocando doenças graves. Porém não se adaptaram ainda a ponto de manter uma transmissão inter-humana eficiente e são considerados possíveis ameaças para uma futura pandemia (BELLEI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2017; CDC, 2018).

A infecção pelo vírus da gripe pode resultar desde casos assintomáticos até hospitalizações e mortes, principalmente entre os grupos com fatores de risco. Em todo o mundo, calcula-se que estas epidemias anuais resultem em cerca de 3 a 5 milhões de casos de doenças graves e cerca de 250.000 a 500.000 mortes (WHO, 2014).

A gripe apresenta padrão sazonal com picos marcados no inverno, no hemisfério Norte a sazonalidade está associada aos meses de dezembro a abril, enquanto no hemisfério Sul, de junho a setembro. As regiões tropicais e subtropicais com invernos suaves também estão sujeitas a oscilações sazonais na incidência da influenza e permanecem ainda pouco caracterizadas. No Brasil, nas áreas de clima temperado como Sul e Sudeste, a incidência dos vírus influenza apresenta padrão sazonal com picos nos meses de outono e inverno (ALONSO, *et al.*, 2007; RABONI *et al.*, 2018). Na região Nordeste a incidência está relacionada às estações chuvosas e ao aumento da umidade relativa do ar (MOURA *et al.*, 2009).

Ao longo da história, ocorreram numerosas pandemias de gripe. A primeira descrição que sugere tratar-se de influenza, foi atribuída a Hipócrates, por volta do século V (A.C.) (COSTA;MERCHAN-HAMANN, 2016). Há relatos de surtos e epidemias de gripe nos séculos XIV e XV (POTTER, 2001). No século XX, as principais pandemias foram: a Gripe Espanhola de 1918, que provocou a morte de aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente de jovens, sendo considerada a pandemia mais grave da história da humanidade; a Gripe Asiática, em 1957 e a de Hong Kong, em 1968, que introduziu na população humana um vírus recombinante aviário do subtipo H3N2 que causou a morte de mais de um milhão de pessoas em todo o mundo (GLEZEN, 1996; TAUBENBERGER *et al.*, 2006; COSTA;MERCHAN-HAMANN, 2016).

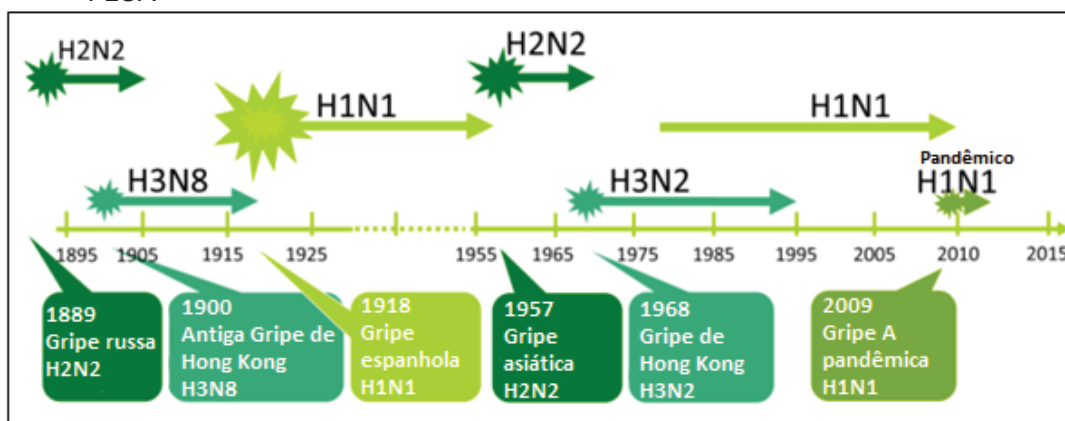
Desde sua introdução em 1968, em humanos, os vírus FluA H3N2 passaram por longa evolução genética e antigênica, causando várias epidemias sazonais,

levando a OMS a recomendar 28 alterações na cepa da vacina durante esse período. Os vírus FluA H3N2 também alteraram suas propriedades de ligação ao receptor ao longo do tempo e apresentaram uma afinidade reduzida para análogos de oligossacarídeos de receptores de superfície celular (LIN *et al.*, 2017). Estudos realizados recentemente com a vacina da gripe H3N2 nos EUA e na Europa, a partir da temporada 2016/2017, demonstraram uma baixa eficácia, aproximadamente 28 a 42% para todas as faixas etárias (MELIDOU *et al.*, 2017). Em julho de 2011, foi detectada pela primeira vez em humanos a variante H3N2v, que possui o gene M do vírus FluA (H1N1)pdm09. Essa variante já havia sido observada anteriormente em suínos, porém não houve transmissão comunitária (CDC, 2014a).

O primeiro surto registrado de FluA aviária subtipo H5N1 em humanos, ocorreu em Hong Kong em 1997, foram 18 casos confirmados e seis óbitos (CHAN *et al.*, 2002). Na Europa e Estados Unidos, de 1997 a 2014 foram reportadas algumas infecções, sem maior importância epidemiológica, como casos de conjuntivite e infecções respiratórias pelos subtipos FluA H7N2, H7N3 e H7N7 (PUZELLI *et al.*, 2014). Entretanto, em 2013 na China, emergiu o subtipo aviário FluA H7N9 encontrado somente em pássaros, causando 453 casos de infecção humana e 175 mortes (GAO *et al.*, 2013; WHO, 2014). Essas infecções estão sendo monitoradas e notificadas pela OMS (GODOY, 2006; LIU *et al.*, 2013). Apesar destas infecções por vírus interespecies terem mostrado capacidade de provocar quadros clínicos graves e com elevada mortalidade em humanos, não se mostraram capazes de transmissão pessoa a pessoa de forma eficaz e sustentada.

Em 2009, um novo subtipo de vírus FluA, de origem suína, denominado de (H1N1)pdm09, produto de rearranjo genético de diferentes origens como de dois genes da polimerase (PA e PB2), da linhagem aviária norte-americana, outro gene da polimerase (PB1) da linhagem sazonal humana H3N2, três genes (HA, NP e NS) da linhagem clássica norte-americana da gripe suína e dois genes (NA e M) da linhagem suína euro-asiática, foi inicialmente detectado no México, porém espalhou-se rapidamente pelo mundo, levando a OMS a declarar o primeiro evento pandêmico do século XXI (FIGURA 6) (SMITH *et al.*, 2009).

FIGURA 6 - REGISTRO EM ORDEM CRONOLÓGICA DAS PANDEMIAS CAUSADAS PELO VÍRUS FLUA



FONTE: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2009).

No mundo, ocorreram aproximadamente 18.500 óbitos causados pelo (H1N1)pdm09 (WHOa, 2011), no Brasil, foram 2.060 óbitos confirmados (QUADRO 3). As maiores taxas registradas de incidência e mortalidade ocorreram nas regiões Sul (Paraná) e Sudeste (São Paulo), em crianças menores de 2 anos e adultos com idade entre 20 e 29 anos (RABONI *et al.*, 2011; BELLEI: MELCHIOR, 2011).

QUADRO 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS ÓBITOS POR SRAG POR FLUA(H1N1)PDM09 EM 2009 NO BRASIL

REGIÃO	CASOS DE (H1N1)PDM09	Nº DE ÓBITOS
NORTE	868	50
NORDESTE	846	62
SUDESTE	12104	992
SUL	35397	789
CENTRO-OESTE	2267	167
TOTAL	50482	2060

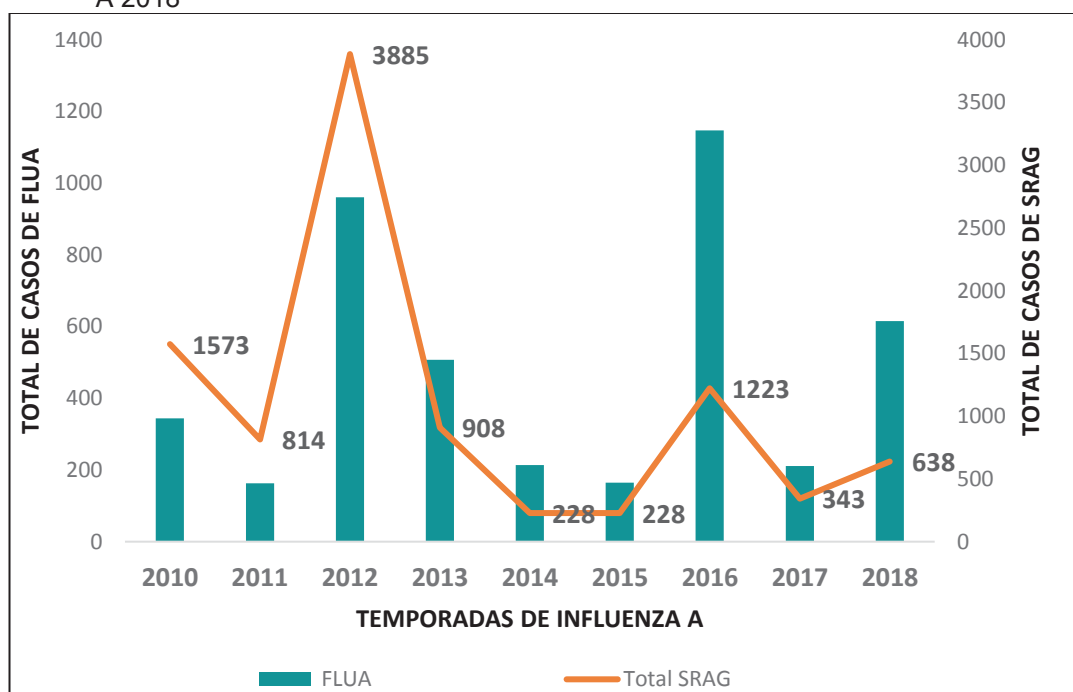
Fonte: SINAN Influenza Web/SVS/MS. Dados atualizados em 08/01/2012 (acesso em 01/07/2021).

Desde então, o subtipo FluA(H1N1)pdm09 substituiu a cepa sazonal H1N1 e co-circula na atualidade com o subtipo H3N2 (FINEBERG, 2014).

Em cada temporada há um predomínio de subtipo e esse padrão epidemiológico depende de vários fatores, incluindo a transmissibilidade, a suscetibilidade da população e a sazonalidade do vírus (CHADHA *et al.*, 2015). Durante os anos de 2011 a 2013, o vírus FluA(H1N1)pdm09 foi o subtipo

predominante, nos anos de 2014, 2015 e 2017, foi observado que o subtipo H3N2 circulou com maior intensidade. Em 2016, o subtipo (H1N1)pdm09 fez seu maior número de vítimas, desde a pandemia de 2009, foram mais de 1.900 casos fatais, sendo que uma das explicações foi a antecipação da sazonalidade do vírus, o que deixou a população vulnerável, já que a vacinação teve seu início em abril. Na região Sul, ele foi identificado desde a primeira semana do ano, diferente do observado em anos anteriores (MS, 2016). Na figura 6 está a distribuição dos casos de SRAG e de FluA no período de 2010 a 2018 no estado do Paraná.

FIGURA 7 – DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE SRAG E DE FLUA NO PARANÁ NO PERÍODO DE 2010 A 2018



FONTE: SINAN Influenza Web. Atualizado em 02/10/2018 (acesso em 10/07/21).

LEGENDA: No eixo primário estão representado o total de casos de FluA e no eixo secundário o total de casos de SRAG.

2.1.7 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico precoce é um instrumento importante para controlar a disseminação da doença e para orientar o tratamento. Atualmente existem numerosos métodos laboratoriais que permitem a identificação das infecções virais. Para os vírus influenza, os testes de diagnóstico disponíveis incluem o cultivo viral, ensaios imunoenzimáticos (EIE), teste rápido de antígeno, reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), testes de imunofluorescência direta e indireta (IFI

e IFD) e testes moleculares rápidos (DREXLER *et al.*, 2009; SELVARAJU; SELVARANGAN, 2010; CDC, 2020). As amostras clínicas do trato respiratório superior utilizadas para o diagnóstico de infecções virais são: aspirado de nasofaríngeo (ANF), aspirado nasal, swabs combinado (nasal/oral) (SWAB), lavado de garganta, preferencialmente coletados até sete dias do início dos sintomas (fase aguda da doença), e amostras do trato respiratório inferior como o lavado broncoalveolar (BAL) e aspirado traqueal (MS, 2016; CDC, 2020). A cultura do vírus influenza a partir de amostras respiratórias permitem a caracterização genotípica e fenotípica das cepas circulantes e podem demorar de 7 a 14 dias para o desenvolvimento de efeitos citopáticos, sendo utilizado principalmente em laboratórios de pesquisas e centros de vigilância epidemiológica. Envolve a inoculação do vírus em linhagens celulares estabelecidas, como a linhagem MDCK (*Madin-Darby Caninespaniel Kidney*- rim canino), usada para o isolamento e replicação do vírus influenza para o diagnóstico e em estudos epidemiológicos (HERRMANN *et al.*, 2001; GREGERSEN *et al.*, 2011; TSENG *et al.*, 2011). Os testes para detecção de antígenos, como os testes de IFI, IFD e EIE, utilizam anticorpos específicos e possuem moderada sensibilidade e alta especificidade, além de rapidez, baixo custo e fácil execução. A PCR é atualmente a metodologia mais utilizada para a identificação viral em laboratórios clínicos e de pesquisa, com uma ampla variedade de aplicações (MELLO, 2010; MACHADO *et al.*, 2016). Com sua introdução, a obtenção do diagnóstico para detecção de diferentes patógenos ganhou maior rapidez, sensibilidade e especificidade (ÖZDEMIR *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2013). A variante da PCR, a PCR em tempo real (qPCR), possibilita acompanhar a amplificação do segmento alvo durante a realização do método, além de permitir a quantificação da carga viral da amostra a partir de padrões pré-estabelecidos (HIGUCHI *et al.*, 1993; HEID, *et al.*, 1996). Atualmente o Ministério da Saúde recomenda a realização da metodologia de RT-qPCR para o diagnóstico de influenza, e em laboratórios onde não seja possível a realização desta técnica, o teste de IFI continua sendo utilizado (MS, 2014).

2.1.8 Vigilância Epidemiológica

Os vírus influenza afetam todos os grupos sociais e etários e constitui-se em uma das grandes preocupações das autoridades sanitárias mundiais, pois causam grande impacto na economia, devido aos gastos diretos e indiretos nos serviços de saúde, ocasionando importantes perdas na produtividade da força de trabalho durante as epidemias (NOAH *et al.*, 2013). Visto a alta transmissibilidade e a alta taxa mutacional, faz-se necessário o constante monitoramento epidemiológico e molecular desses vírus, sobretudo aqueles do tipo A (RUSSEL *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2013).

O Sistema Global de Vigilância e Resposta à Gripe, existe desde 1952, sob o nome de Rede de Vigilância da Gripe. As informações obtidas sobre a circulação do vírus influenza no passado desempenharam um papel crítico no desenvolvimento da compreensão atual da circulação global do vírus (WHO, 2019). Após a ameaça da gripe aviária de alta patogenicidade, a OMS, em 2004, iniciou um programa mundial, com o objetivo de promover o fortalecimento da rede de diagnóstico laboratorial para detectar os vírus influenza emergentes e sazonais e monitorar os casos de doenças semelhantes à influenza e SRAG (WHO, 2013; POLANSKY *et al.*, 2016). A SRAG passou a ser uma preocupação global quando uma epidemia de SARS coronavírus (SARS-CoV) foi detectada pela primeira vez no fim de 2002 na China e se espalhou afetando mais de 8000 pessoas, com 916 mortes em 29 países (YIN; WUNDERINK, 2018). A OMS recomenda o monitoramento constante das infecções que possam resultar em SRAG e doenças com potenciais pandêmicos (WHO, 2011c; CHENG *et al.*, 2013). A Rede de Vigilância da Gripe consiste em mais de 140 Centros Nacionais de Influenza (CNI) em todo o mundo que coletam, testam amostras clínicas e determinam dados epidemiológicos dos subtipos circulantes, para minimizar os impactos causados pela doença (WHO, 2014). Os principais objetivos do sistema de vigilância de influenza são monitorar mudanças na antigenicidade do vírus, orientar a seleção de cepas para a vacina anual e fornecer amostras de vírus para uso na produção de vacinas. Juntamente com o vírus influenza, outros vírus respiratórios frequentes também são monitorados. Em 2011, a OMS organizou uma consulta técnica com os países participantes da vigilância de influenza com o objetivo de revisar as práticas existentes de vigilância. Um dos assuntos discutidos foram as definições para casos SG e SRAG. A necessidade de reduzir várias definições para uma única

global surgiu com a pandemia de influenza de 2009, onde ficou evidente que a falta de padronização dificultava o monitoramento de eventos de larga escala (WHO, 2011c).

No Brasil, a rede nacional de laboratórios para vigilância de influenza faz parte do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (Sislab) e é constituída por 27 Laboratórios Estaduais Centrais de Saúde Pública (Lacens), dois Laboratórios de Referência Regional (LRR), o Instituto Adolfo Lutz (IAL), em São Paulo/SP, e o Instituto Evandro Chagas (IEC), em Ananindeua/PA, e um Laboratório de Referência Nacional (LRN), na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro/RJ. Os dois LRR e o LRN, são credenciados na OMS como centros de referência para influenza (NIC, do inglês *Nacional Influenza Center*), os quais fazem parte da rede global de vigilância da influenza (WHO, 2014). Os Lacens são responsáveis pela identificação do agente etiológico, tipagem e subtipagem dos vírus influenza circulantes. Também são responsáveis pelo envio de amostras processadas para os LR para realização de análises complementares. A caracterização antigênica e genética dos vírus circulantes e identificação de novos subtipos, bem como o monitoramento da resistência aos antivirais são realizadas pelos LR, que como parte da rede global, enviam, anualmente, isolados virais e amostras clínicas para o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Atlanta, EUA), para contribuir na seleção das estirpes virais para a composição da vacina anual. O monitoramento se faz por meio da Vigilância Sentinela da Influenza para SG e SRAG em unidade de terapia intensiva (UTI); Vigilância Universal de SRAG de casos hospitalizados e óbitos por SRAG; monitoramento de hospitalização e mortalidade e investigação de surtos, óbitos e eventos incomuns suspeitos para influenza. Todas estas informações estão em um boletim disponibilizado pelo sistema de informação e agravos de notificação (SINANWEB). A cada semana epidemiológica os novos dados são adicionados ao boletim, que destaca os principais agentes associados à SG e SRAG, seus percentuais e distribuição, assim como perfil epidemiológico e prevalência por região (MS, 2019). O Lacen do Paraná realiza a detecção laboratorial de 14 diferentes vírus respiratórios pela técnica de RT-qPCR, e as informações são integradas à vigilância do vírus influenza (MS, 2019). Em Curitiba, Paraná, o Serviço de Epidemiologia do CHC/UFPR realiza a vigilância epidemiológica desde a pandemia do vírus FluA(H1N1)pdm09 e faz as notificações de todos os casos de pacientes com SRAG.

Além disso, têm participado da Rede de Vigilância da Influenza Baseada em Hospitais (*GIHSN – Global Influenza Hospital Surveillance Network*), contribuindo com dados epidemiológicos sobre o vírus influenza e outros vírus respiratórios. O laboratório de Virologia do CHC-UFPR atualmente realiza a detecção laboratorial de 14 diferentes vírus respiratórios pela técnica de RT-qPCR e realiza o sequenciamento dos vírus influenza detectados em pacientes hospitalizados, a fim de verificar mutações, gerando dados que possam auxiliar a atualização vacinal, novas abordagens terapêuticas, entre outras.

2.1.9 Vacinação

A imunização é a maneira mais eficaz de prevenir a infecção e a evolução para casos graves das infecções causadas pelos vírus influenza. Consequentemente, ela reduz o uso de medicamentos e de hospitalizações. No Brasil, a vacinação contra a influenza foi introduzida no Programa Nacional de Imunizações em 1999 e, desde 2011, ocorre anualmente a Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza antes do período de circulação do vírus, no inverno do hemisfério sul (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013). A campanha compreende a imunização coletiva de diversos grupos de risco, como idosos > 60 anos, crianças < 5 anos de idade, gestantes, portadores de doenças crônicas e outras condições clínicas especiais, indígenas, indivíduos com privação de liberdade, além de profissionais que tenham contato direto com os grupos de risco, como os da saúde, da educação e do sistema carcerário (MS, 2019).

Anualmente, com base nas informações epidemiológicas fornecidas pelos laboratórios de referência para influenza da OMS, espalhados em todo o mundo e juntamente com o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) a composição da vacina é escolhida. As vacinas disponibilizadas atualmente são compostas por partículas virais fragmentadas e inativadas. Existem dois tipos de vacinas, a trivalente, disponibilizada anualmente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e a tetravalente, disponível somente na rede privada. A vacina trivalente, contém partículas dos vírus FluA (H1N1)pdm09, H3N2 e de uma das linhagens da influenza B, Victoria ou Yamagata. A vacina tetravalente, protege contra os dois subtipos de FluA citados e das duas linhagens da influenza B (BEIRIGO *et al.*, 2017). As novas abordagens para a geração de vacinas universais têm se concentrado em regiões

altamente conservadas nos antígenos virais dos subtipos de FluA, na expectativa de proporcionar ampla imunidade, não só para os vírus sazonais, mas também a potenciais cepas pandêmicas que possam se disseminar rapidamente e causar alta mortalidade (SCHOTSAERT *et al.*, 2013; ADAMI, 2017).

2.1.10 Antivirais e Resistência

Em casos graves de influenza ou pandemias, o uso de antivirais é fundamental. Com a pandemia de 2009, o oseltamivir (Tamiflu®), medicamento antiviral, inibidor da NA, foi amplamente utilizado para o tratamento de pacientes infectados com o FluA(H1N1)pdm09 (MILLER *et al.*, 2013; WEBSTER; GOVORKOVA, 2014). O tratamento com o antiviral quando indicado, deve ser iniciado o mais rápido possível após o início da doença, se possível dentro de 48 horas após o início dos sintomas. No entanto, em pacientes com doença grave, complicada ou progressiva e em pacientes hospitalizados, o tratamento antiviral pode ter alguns benefícios quando iniciado após 48 horas do início da doença (VENKATESAN *et al.*, 2020). Além do oseltamivir, os fármacos usados atualmente no tratamento contra a influenza e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) são o zanamivir (Relenza®), peramivir (Rapivab®), laninamivir (aprovado para o tratamento da gripe somente no Japão) inibidores da NA (INA) e o último antiviral aprovado, baloxavir marboxil (Xofluza®) - inibidores da endonuclease (PA) do complexo da polimerase do vírus (SHAW; PALESE, 2013; O'HANLON *et al.*, 2019; CDC, 2020b).

As drogas amantadina e rimantadina, foram os primeiros fármacos na terapia contra os vírus influenza, no entanto, a recombinação entre o vírus e o uso excessivo dessas drogas resultou em alta resistência, não sendo mais recomendado seu uso (CDC, 2016; GUBAREVA *et al.*, 2017). Os INAs são as drogas de escolha para o tratamento e prevenção de infecções por influenza, pois bloqueiam a atividade da enzima viral NA. Estes inibidores previnem que novas partículas virais sejam liberadas pelas células infectadas (HURT *et al.*, 2016). Durante a pandemia de 2009-2010, o vírus resistente H1N1 foi substituído pelo vírus (H1N1)pdm09, sensível ao oseltamivir (WHITLEY *et al.*, 2013; CDC, 2020b). No Brasil, o Ministério da Saúde disponibiliza pelo SUS, os medicamentos, oseltamivir e zanamivir (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Apesar do recente desenvolvimento do medicamento baloxavir, estudos já

demonstraram resistência com taxa de 23,4% para o subtipo H3N2, em crianças de 11 anos de idade, o que levanta preocupações sobre a viabilidade da droga como monoterapia em longo prazo (HAYDEN *et al.*, 2018; GUBAREVA *et al.*, 2019). Apesar disso, surgem perspectivas estimulantes para a terapia combinada com os INA (O'HANLON *et al.*, 2019). O aparecimento de novos vírus e de variantes resistentes traz a necessidade do desenvolvimento de novos antivirais. Alternativas já estão sendo desenvolvidas, como o Fludase® (DAS181), proteína recombinante que cliva os receptores de ácido siálico na superfície da célula impedindo a ligação do vírus, o favipiravir (T-705) que inibe a polimerase viral, o nitazoxanide, antiviral de amplo espectro em ensaios de Fase 3 para o tratamento da gripe que reduziu a duração dos sintomas clínicos e a eliminação viral, inibidores de hemaglutinina, inibidores de nucleoproteínas, inibidores da polimerase viral e terapia imunomodulatória (ROSSIGNOL, 2014; NAESENS; ZOULIM, 2017).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICATIVA

A maneira mais eficaz de prevenir infecções pelos vírus influenza se faz por meio de imunização específica. Além da vacina, o antiviral mais utilizado para o tratamento da influenza é o oseltamivir. Mesmo com a adoção das medidas de prevenção, a infecção ocasionada pelos vírus influenza leva anualmente milhões de pessoas com complicações graves aos hospitais. A detecção precoce e quantitativa do vírus influenza em amostras de pacientes com suspeita clínica de SRAG por meio de técnicas moleculares, como a qPCR, pode oferecer um diagnóstico diferencial rápido. Além disso pode orientar o manejo clínico para diminuir a transmissão nosocomial do vírus e implementar condutas terapêuticas para reduzir a gravidade das infecções, o tempo e os custos com o internamento e medicamentos. A identificação e monitoramento das mutações virais que ocorrem, podem auxiliar na adoção de medidas rápidas de combate e controle de novas variantes, com potencial pandêmico que possam surgir. Em relação ao hospedeiro, a variação genética individual, influencia diretamente na resposta imune e informações sobre maior suscetibilidade as doenças podem evitar desfechos desfavoráveis.

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os fatores associados à gravidade de doença em pacientes infectados por influenza A.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a metodologia de PCR em tempo real quantitativo (RT-qPCR) para quantificar a carga viral do vírus influenza A em amostras clínicas respiratórias;
- Realizar a caracterização clínico-epidemiológica dos pacientes infectados pelo vírus influenza A;

- Avaliar a carga viral dos pacientes infectados pelo vírus influenza A;
- Descrever o perfil de infecção de acordo com os subtipos de influenza A: (H1N1)pdm09 e H3N2;
- Identificar as mutações no gene da Hemaglutinina (HA) em pacientes com o subtipo influenza A (H1N1)pdm09;
- Identificar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) rs12979860 e rs8089917 no gene da IL28B em pacientes infectados com o vírus influenza A;
- Correlacionar as variáveis clínico-epidemiológicas, virais e imunológicas com a gravidade da doença.
- Propor um escore de prognóstico de gravidade da doença para a identificação de prováveis casos com necessidade de admissão em UTI

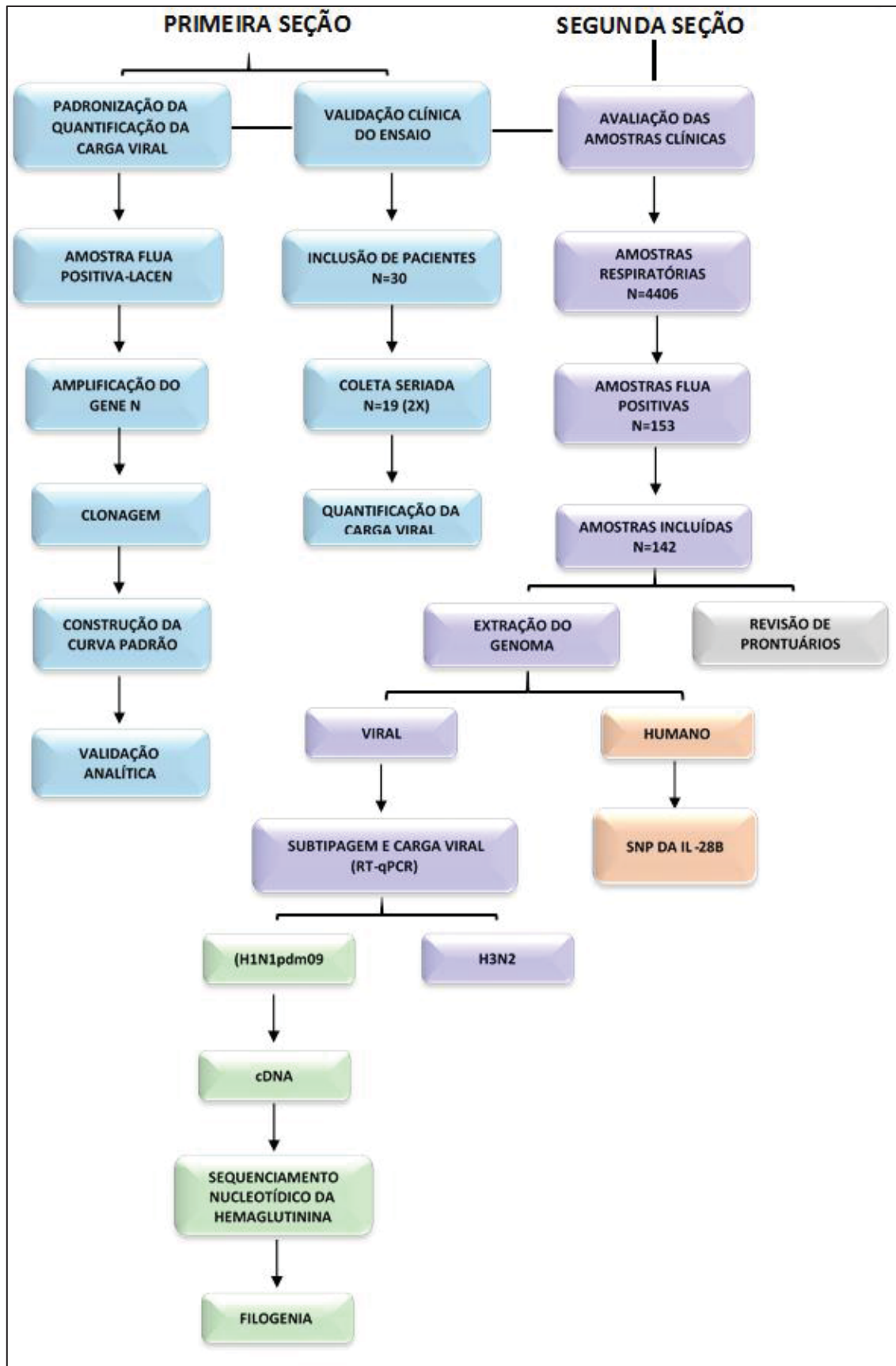
4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é parte do projeto “Síndrome respiratória aguda grave: epidemiologia molecular das infecções respiratórias virais e vigilância da emergência de variantes resistentes aos antivirais” que possui aprovação no Comitê de Ética, CAAE: 18714013.4.0000.0096 - 20/08/2013 – no Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR).

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental e transversal, com coleta de dados retrospectivo, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2018. A figura 8 sintetiza os diversos protocolos e etapas do presente estudo, cuja metodologia e resultado serão apresentados em duas seções. A primeira seção, onde é apresentada a padronização do ensaio de quantificação absoluta de carga viral e a segunda seção, onde é feita a avaliação das características clínico-epidemiológicas.

FIGURA 8 – DESENHO DO ESTUDO



FONTE: A autora, 2018.

4.2 PRIMEIRA SEÇÃO: PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DA CARGA VIRAL

A padronização seguiu diretrizes preconizadas por um protocolo que contém um conjunto de informações mínimas para publicações de experimentos quantitativos de PCR em tempo real (qPCR) (BUSTIN *et al.*, 2009).

4.2.1 Obtenção de controle positivo

O material genético do vírus de uma amostra de FluA positiva fornecida pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR) foi extraído e submetido a RT-qPCR com os iniciadores e sondas denominados InfA, do gene da proteína da matriz (região M), baseados em regiões genômicas altamente conservadas dos vários subtipos do vírus FluA (posição nucleotídica 146 a 251 no NC 026431.1). Para controle interno da reação, foi utilizado o conjunto de iniciadores e sonda do alvo da Ribonuclease P (RP) humana (gene constitutivo, expresso em todas as células humanas) (QUADRO 4) (WHO, 2009).

Os testes de RT-qPCR foram realizadas utilizando a *SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit* (Invitrogen) em um volume total de 15 µL. A concentração final dos iniciadores e sonda foi de 670 nM e 170 nM, respectivamente. As condições da reação de termociclagem foram: transcrição reversa a 50°C por 30 minutos; desnaturação do DNA e ativação da Taq DNA polimerase a 95°C por dois minutos, seguidos de 45 ciclos de amplificação por PCR, incluindo uma etapa a 95°C por 15 s e uma etapa a 55°C por 30 s (alongamento da hibridação) (WHO, 2009 com modificações). As reações foram realizadas com o corante de referência passivo ROX (*carboxi-X-rodamina*) como aditivo inerte para normalizar o sinal repórter fluorescente ao longo da RT-qPCR. O equipamento utilizado para os ensaios foi o *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

QUADRO 4 - INICIADORES E SONDAS UTILIZADAS PARA DETECÇÃO DO VÍRUS FLUA

Iniciadores e Sonda	Sequência 5'- 3'	Número de bases
InfA - senso	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGAC	22
InfA - anti-senso	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA	24
*InfA - sonda	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG	24
RP - senso	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	19
RP - anti-senso	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	20
*RP - sonda	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	23

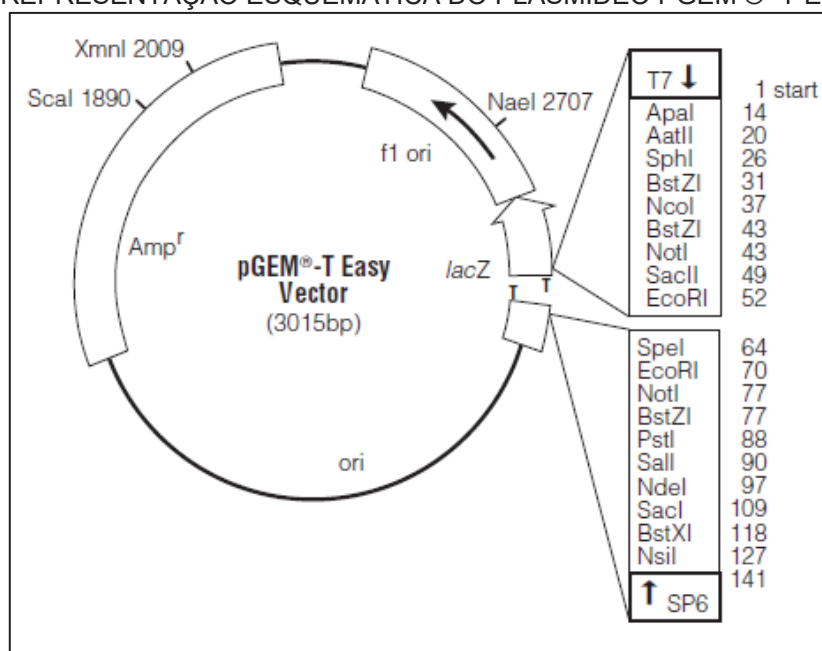
FONTE: WHO, 2009.

LEGENDA: *As sondas TaqMan® são marcadas na extremidade 5' com a molécula repórter 6-carboxifluoresceína (FAM) e com o inibidor, Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) na extremidade 3'. RP (Ribonuclease P Humana).

4.2.2 Produção de controle positivo em larga escala

A fim de produzir um controle positivo em larga escala, com estabilidade, para ser utilizado na padronização da técnica de quantificação, foi realizada a clonagem do fragmento de 105pb amplificado com os primers descritos no item 4.2.1, que correspondente à região M (matrix) do vírus FluA, em sistema procarionte utilizando o vetor plasmidial *pGEM®- T Easy* (Promega Inc). O vetor *pGEM®- T Easy* já se encontra linearizado. A representação esquemática do vetor *pGEM®- T Easy* encontra-se ilustrado na figura 9.

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDEO PGEM®-T EASY



FONTE: PROMEGA, 2010.

Legenda: F1 ori: origem; lacZ: gene para metabolismo de lactose (β -galactosidase); Amp^r: gene de resistência à ampicilina.

O produto alvo foi purificado utilizando o *kit PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen Inc). A purificação é baseada na afinidade DNA/sílica e o produto purificado foi ligado ao sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A ligação obtida foi transformada em células de *E. coli* (Top10F') cálcio-competentes através de choque térmico. Após serem semeadas em placa com X-gal, as colônias brancas (que poderiam conter o inserto) foram transferidas para um microtubo, lisadas por aquecimento e a análise dos clones recombinantes foi realizada pelo gel de eletroforese e por PCR de colônia. Com a confirmação de que a bactéria continha o plasmídeo, foi realizada a expansão das colônias positivas em 3 mL de meio LB e 100 μ g/mL de ampicilina a 37°C por 16 horas. A purificação de DNA plasmidial foi realizada com o *kit Plasmid DNA Purification, NucleoSpin® Plasmid* (MACHEREY-NAGEL) seguindo as orientações do fabricante.

Para a confirmação da identidade do clone, foi realizado o sequenciamento nucleotídico (SANGER *et al.*, 1977). As reações foram preparadas utilizando os iniciadores universais T7 e SP6 do vetor *pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega, Madison, WI, EUA) e o *Big Dye Terminator, V.3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências de consenso foram obtidas usando o programa *DNASTAR Lasergene*

SeqMan Program version 7.0 (Inc., Madison, WI), alinhado com *Clustal W* na plataforma *Mega versão 7.0* (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). As mutações de aminoácidos foram mostradas por WebLogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>).

4.2.3 Construção da Curva Padrão

Para a construção da curva padrão, o controle positivo foi quantificado no espectrofotômetro, marca DeNovix DS-11. Após a determinação da concentração de DNA, o número de cópias de moléculas de DNA padrão foi calculado por meio da fórmula descrita no quadro 5. Para o cálculo foi utilizado o tamanho do plasmídeo completo, 3015 pares de base (pb) mais o tamanho do inserto, que foi de 105 pb (total de 3120 pb).

QUADRO 5 - FÓRMULA DO CÁLCULO EQUIVALENTES GENÔMICOS

$$\text{Número de cópias} = \frac{X \text{ ng} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{N \times * \text{ g/mol} \times 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Onde:

X ng: quantidade de DNA em nanogramas (ng)

$6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol: número de Avogadro

N: tamanho do amplicon em pares de base

* 650 g/mol: peso molecular de 1 par de base de DNA dupla fita em Daltons

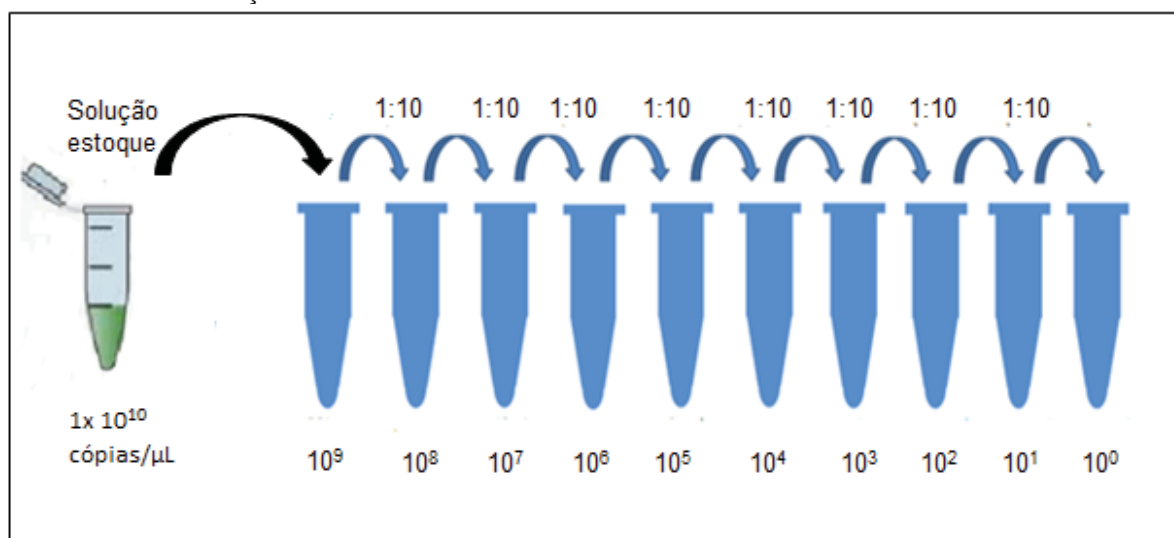
* ou 340 g/mol do RNA

1×10^9 : fator de conversão para nanogramas

FONTE: Adaptado de Lee *et al.*, 2006.

A solução estoque foi preparada em uma concentração final de 1×10^{10} cópias/ μL . Os pontos utilizados na construção da curva padrão foram preparados a partir da diluição em série de 10 vezes da solução de trabalho (10 μL do plasmídeo + 90 μL de água ultrapura), em triplicata (FIGURA 10).

FIGURA 10 - DILUIÇÃO SERIADA DO PLASMÍDEO



FONTE: A autora (2016).

4.2.4 Validação Analítica

Para a validação analítica do método diagnóstico baseado em RT-qPCR, foram utilizados os conceitos previamente preconizados pelo MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment*), que é um guia contendo informações para desenvolvimento de experimentos quantitativos de qPCR (BUSTIN *et al.*, 2009).

4.2.4.1 Efeito da matriz e presença de inibidores

Para verificar se o uso do DNA plasmidial como padrão poderia ser uma fonte de interferência nos resultados de quantificação absoluta, os efeitos da matriz foram avaliados pelos resultados do coeficiente angular (*slope*) dos três tipos de matrizes biológicas (DNA plasmidial, RNA transcrito do plasmídeo e amostra representativa (aspirado nasofaríngeo- ANF) (FDA, 1996; CLSI / NCCLS, 2003; CLSI / NCCLS, 2004; CHESHER, 2008).

Para construir a curva padrão do RNA transcrito, o plasmídeo foi submetido à transcrição reversa com o *Kit MEGAscript®* (kit de transcrição in vitro) de acordo com as instruções do fabricante. O número de cópias da amostra representativa (ANF) e do RNA transcrito, foram calculados pela fórmula descrita no quadro 5 do item 4.2.3. Em seguida, diluições em série de 10 vezes da solução de trabalho foram realizadas

para obter concentrações de 10^2 a 10^6 cópias / uL. Para a curva padrão de DNA de plasmídeo foram realizadas as diluições conforme descrita no quadro 5 do item 4.2.3.

4.2.4.2 Precisão do Método

A avaliação da variação intra ensaio (repetibilidade) foi realizada testando 20 réplicas técnicas da amostra padrão a uma concentração de 5 e 25 cópias / reação e após foram submetidos a RT-qPCR simultaneamente. O ensaio foi repetido duas vezes, pelo mesmo analista em dias diferentes. A avaliação da variação inter ensaio (reprodutibilidade) foi realizada por 20 réplicas técnicas da amostra padrão em uma concentração de 50 cópias / reação por dois operadores, em diferentes dias.

4.2.4.3 Faixa Dinâmica Linear e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites da faixa dinâmica linear foram determinados por meio de uma curva de calibração que incluía pelo menos 10 concentrações de $\log_{10}$ (10^1 a 10^{10}), estabelecendo os limites mínimo e máximo da quantificação (LQ), ou seja, a concentração mais baixa que um analito pode ser quantificado com precisão aceitável (repetitividade e exatidão). Foram realizadas três repetições para cada ponto de diluição. O LQ foi calculado pela fórmula abaixo:

$$\frac{10\sigma}{S}$$

- Onde: - “ σ ” é o desvio padrão das respostas e,
 - “S” é a inclinação de nove curvas padrão.

4.2.4.4 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) é determinado pela menor quantidade de cópias do alvo que pode ser detectado pelo sistema de ensaio com intervalo de confiança de 95%. Para este teste foram realizadas 20 diluições com concentração de cinco cópias do plasmídeo e após foram submetidas à RT-qPCR. O LD foi calculado pela fórmula abaixo:

3.3σ
S

Onde: - “ σ ” é o desvio padrão das respostas e,
 - “S” é a inclinação de nove curvas padrão.

4.2.5 Validação Clínica do Ensaio

Para a validação clínica do ensaio foi realizada a quantificação seriada da carga viral de pacientes hospitalizados por SRAG no CHC-UFPR. Foram incluídos pacientes com o diagnóstico laboratorial positivo para FluA e internados no período entre 2015 e 2018.

4.2.5.1 Quantificação seriada de amostras clínicas

Foram realizadas duas quantificações seriadas para verificar se a variação da CV durante a infecção seguia a história natural da doença. Para esta avaliação, foram delineados 3 grupos:

- Grupo I (n= 5) - Pacientes imunocompetentes com 2ª coleta até 72 horas após a primeira coleta;
- Grupo II (n= 7) - Pacientes imunocompetentes com 2ª coleta mais de 72 horas após a primeira coleta;
- Grupo III (n= 7) - Pacientes imunossuprimidos com 2ª coleta mais de 72 horas após a primeira coleta.

Foram considerados pacientes imunossuprimidos aqueles com infecção pelo HIV, neoplasias hematológicas e/ou que fazem uso de corticosteroides sistêmicos e/ou imunossupressores. As amostras foram selecionadas por conveniência com base na presença de infecção por FluA, confirmada laboratorialmente e com hospitalização até a segunda coleta de amostra.

A CV foi determinada comparando o ciclo de quantificação (Cq) da amplificação do gene M da amostra alvo com uma curva padrão obtida plotando seis padrões variando de 10^1 a 10^6 cópias/reação em triplicatas. Um Cq de 0,1 foi definido para todas as reações. Os resultados brutos são apresentados em cópias/reação

(quantidade) e foram convertidos em cópias/mL pela fórmula apresentada no quadro 6. Todos os resultados da quantificação de CV foram apresentados em Log10 cópias/mL.

QUADRO 6 – FATOR DE CONVERSÃO

Quantidade * [volume de eluição da amostra (µL) / volume da amostra na extração (mL)].

4.2.6 Análise Estatística da Primeira seção

Os dados clínicos e epidemiológicos foram revisados nos formulários de notificação. A análise estatística foi realizada usando *R versão 3.6.1*. Variáveis contínuas não normalmente distribuídas foram analisadas usando o teste de *Mann-Whitney*, ANOVA de dois fatores, teste *Kruskal Wallis Rank Sum*, comparações múltiplas *post hoc de Tukey* e regressão linear. A análise de regressão linear multivariada foi realizada para avaliar as covariáveis relacionadas às alterações de CV. Todos os testes estatísticos foram bilaterais com significância estabelecida em $p < 0,05$. Para estabelecer o LQ e LD foram levadas em consideração a linearidade, faixa dinâmica e reprodutibilidade do ensaio adotando um intervalo de confiança de 95% (VALDERRAMA *et al*, 2009). Os parâmetros das curvas padrão foram considerados adequados quando os valores de eficiência de PCR ficaram entre 90-110%, o coeficiente de correlação (R^2 0,99-1) e coeficiente de variação (CV) $\leq 5\%$ (ANVISA, 2019).

4.3 SEGUNDA SEÇÃO: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS

Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes foram coletados nos prontuários médicos e no banco de dados da Vigilância Epidemiológica do CHC-UFPR, em formulários padronizados e inseridos nos sistemas online: Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Gripe (SIVEP- Gripe) e no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – *SINAN Web*. Os pacientes foram separados de acordo com a gravidade em: - Pacientes ambulatoriais: pacientes investigados para SG devido a consulta ambulatorial; - Pacientes internados: pacientes com SRAG, de serviços de atenção primária e secundária.

4.3.1 Avaliação da Carga Viral em Amostras Clínicas

4.3.1.1 *Casuística*

O estudo foi realizado com amostras de conveniência, compostas por swabs nasofaríngeos ou ANF, coletados de pacientes ambulatoriais e internados, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2018. Foram 4.406 amostras investigadas para detecção de vírus respiratórios no Laboratório de Virologia do CHC-UFPR, das quais 153 (3,3%) foram positivas para FluA e destas 142 (92,8%) foram incluídas neste estudo. As amostras com volume insuficiente ou que não foram armazenadas corretamente foram excluídas. Os testes das amostras positivas foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos do CHC-UFPR/IBMP.

Desfechos: primário: admissão na unidade de terapia intensiva (UTI);e secundário: tempo de internação, suporte de ventilação mecânica e óbito. Preditores: subtipo de vírus, mutações de hemaglutinina, carga viral, gênero, grupo étnico, SNPs de IL-28B e fatores de risco. Fatores de risco: doenças de base, gravidez, idade (< de dois e > 60 anos) e imunodepressão (pacientes com infecção pelo HIV, neoplasias hematológicas e uso de corticoide sistêmico e/ou imunossupressor). Potenciais fatores de confusão: transplante de células-tronco hematopoéticas. Efeitos modificadores: imunossupressão, coinfeções, tratamento antiviral e amostragem > 48h da admissão.

4.3.1.2 Extração do Genoma

As amostras foram processadas em tubos tipo *Falcon*, agitadas em vórtex durante 10 segundos e centrifugadas a $2000 \times g$ durante 15 min. Alíquotas de 1mL do sobrenadante em frascos identificados foram armazenadas a -80°C até a extração do material genético. Para a extração foram utilizados dois kits comerciais durante o período do estudo:

1) *Mini kit de RNA viral QIAamp* (Qiagen, Hilden, Alemanha) - O método deste kit baseia-se na propriedade de ligação das moléculas de RNA a uma membrana de sílica gel (colunas de rotação *QIAamp*) durante os passos de lavagem. O RNA viral foi extraído de 140µL da amostra clínica. Primeiro a amostra é lisada em condições desnaturantes (tampão AVL) para inativar RNases e garantir a liberação do RNA da amostra. As condições de tamponamento são então ajustadas para permitir a ligação ótima de RNA à membrana *QIAamp*. Os contaminantes são eliminados em duas etapas de lavagem sucessivas usando os tampões AW1 e AW2. O RNA é então eluído com 80µL do tampão AVE.

2) *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche®) - O RNA viral foi extraído de 200 µL da amostra clínica. Após a lise viral durante a incubação com tampão na presença de proteinase K, a amostra foi misturada com um sal caotrópico e aplicada em tubo coletor acoplado a coluna contendo filtro de fibra de vidro (*High Pure Spin*). Sob as condições dos tampões usados neste procedimento, os ácidos nucleicos virais se ligam à fibra de vidro, enquanto os contaminantes (sais, proteínas, nucleotídeos, óleo mineral e outros contaminantes) não se ligam. Etapas sucessivas de lavagem e centrifugação removem esses contaminantes. Uma vez purificado, o RNA viral é eluído em 80 µL de água ultrapura.

4.3.1.3 Identificação e subtipagem viral

A fim de validar os iniciadores e as sondas para diagnóstico e subtipagem de FluA, amostras previamente confirmadas como (H1N1)pdm09 e H3N2, cedidas pelo Lacen-PR foram confirmadas pela RT-qPCR utilizando os oligos descritos no quadro 7. Todas as amostras foram submetidas à RT-qPCR sob as mesmas condições de

ciclagem descritas no item 4.2.1 (WHO, 2017). Todas as sondas foram marcadas com o fluoróforo *FAM* e sintetizadas juntamente com os iniciadores pela Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA). Os testes de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)*. As reações de RT-qPCR foram realizadas conforme descrito no item 4.2.1, da primeira seção. Para a subtipagem do vírus FluA, foi utilizado um conjunto de iniciadores e sondas, referente a região do gene da NP (nucleoproteína) de FluA de origem suína, denominado *pdm InfA* e outro referente a região do gene da HA (hemaglutinina), específico para o (H1N1)pdm09, denominado *pdm H1*. São considerados positivos para FluA(H1N1)pdm09 aqueles que obtêm amplificação nas 4 regiões (região universal + proteína de superfície NP + proteína de superfície HA + RP). Quando há amplificação da região universal e de apenas uma proteína, o ensaio deve ser repetido, obtendo o mesmo resultado, a subtipagem não pode ser definida. Os conjuntos de iniciadores para o H3N2 foram desenvolvidos para detecção do gene da Hemaglutinina.

QUADRO 7 - PAINEL DE INICIADORES E SONDAS PARA SUBTIPAGEM DO FLUA

Subtipo	Nome	Sequência 5'- 3'	Nº de bases
(H1N1)pdm09	pdm InfA - senso	TTG CAG TAG CAA GTG GGC ATG A	22
	pdm InfA - anti-senso	TCT TGT GAG CTG GGT TTT CAT TTG	24
	* pdm Infa -sonda	TGA ATG GGT C" T" A TCC CGA CCA GTG AGT AC	29
	pdm H1 - senso	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TCC CAT T	25
	pdm H1 - anti-senso	AGA CGG GAY ATT CCT CAA TCC TG	23
	* pdm H1 - sonda	ATA CAT CCG A" T" C ACM ATT GGA AAA TGT CC	29
H3N2	H3 -senso	ACCCTCAGTGTGATGGCTTTCAAA	24
	H3 -anti-senso	TAAGGGAGGCATAATCCGGCACAT	24
	* H3 -sonda	ACGAAGCAAAGCCTACAGCAACTGTT	26

FONTE: WHO (2009 e 2017), com modificações.

LEGENDA: * "T" indica a posição do supressor. As sondas precisam ser marcadas na extremidade 5' com a molécula repórter 6-carboxifluoresceína (FAM) e internamente em um resíduo "T" modificado, com um fosfato terminal na extremidade 3' (BHQ1) para evitar a extensão da sonda pelo DNA polimerase.

4.3.1.4 Quantificação da carga viral

A quantificação absoluta da carga viral foi realizada por RT-qPCR conforme padronizado na primeira seção, conforme descrito por Pereira *et al.* (2021). A CV em cópias/reação (quantidade) foi convertido em cópias/mL usando a fórmula: $[\text{Quantidade/reação do volume RT-qPCR}] * [\text{volume de eluição da amostra } (\mu\text{L}) / \text{volume da amostra na extração (mL)}]$. Os dados foram apresentados como Log10 cópias/mL. Todas as amostras foram avaliadas juntamente com um controle interno, a RP (Ribonuclease P humana), para testar a qualidade das amostras.

4.3.2 Identificação das mutações no gene da HA do vírus FluA (H1N1)pdm09

4.3.2.1 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA das amostras do subtipo (H1N1)pdm09 foi realizada seguindo as especificações do kit *SuperScript RT II/III Invitrogen®*, que inclui uma transcriptase reversa e um conjunto de reagentes projetados para uma síntese de DNA a partir de um mRNA poli (A). Para isso foi adicionado em um microtubo os seguintes reagentes: 9 μL de RNA (até 5 μg na dosagem), 2 μL de random primer (100 ng/ μL) e 1 μL de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (10 mM cada) e incubado a 65°C por 5 minutos. Após foi colocado no gelo por 2 minutos. Em seguida foi acrescentado 4 μL de tampão (5x), 2 μL 0,1 M de DTT e 1 μL RNase out (40 U/ μL) e incubado por 25°C por 2 minutos. Após foi adicionado 1 μL da Superscript (200 U/ μL) e incubado por 25°C por 10 minutos, a seguir por 42°C por 50 minutos e para inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. O cDNA recém-sintetizado foi armazenado a -20°C até a realização da PCR convencional.

4.3.2.2 PCR convencional

Para análise das mutações nas amostras pertencentes ao subtipo (H1N1)pdm09, foram utilizados os iniciadores para amplificar parcialmente o gene da HA, gerando um fragmento de 380pb (abrangendo posições 190 e 222), cujas sequências foram previamente descritas por CHEN e colaboradores (2010) e estão

representadas no quadro 8 (CHEN *et al.*, 2010). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 5µL de cDNA, 2,5µL de tampão para PCR (10x), 0,5µL de dNTPs (2,5mM, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Applied Biosystems), 0,75µL de Cloreto de Magnésio 50mM (Invitrogen), 1µL de cada iniciador senso e anti-senso (5µM cada) e 0,125µL da enzima *Platinum® Taq DNA polimerase* (1,25U) (*Invitrogen™, Life Technologies, EUA*). A amplificação foi realizada em termociclador *Veriti® (Applied Biosystems)* na seguinte ciclagem: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30s e 72°C por 2min. Após cada reação de PCR, 5µL dos produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo. O corante utilizado na amostra foi azul de bromofenol e o padrão de massa molecular foi de 1Kb (1Kb Plus DNA Ladder – *Invitrogen*). O tampão de corrida utilizado foi o TBE pH 8,4 (89mM Tris-Borato, 2mM EDTA (*Reagen/Merck*). O gel foi submetido a uma corrente constante de 120V por aproximadamente 40 minutos e visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em aparelho para foto e documentação (*Vilber Lourmart*) para posterior análise.

QUADRO 8 - PAINEL DE INICIADORES USADOS PARA AMPLIFICAR 380 PB DO GENE DA HEMAGLUTININA

Nome	Sequência dos iniciadores	Nº de bases
(5'-3' – <i>senso</i>)	GTTTCATGGCCCAATCATGAC	20
(5'-3' – <i>anti-senso</i>)	GATTTCCAGTTGCTTCGAATG	21

FONTE: CHEN *et al.*, 2010.

4.3.2.3 Sequenciamento

A reação de sequenciamento de nucleotídeos foi realizada utilizando os mesmos iniciadores descritos no item 4.3.2.2 desta seção e preparadas com o *kit Big Dye Terminator, V.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)* de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.2.4 Análise filogenética do subtipo de FluA (H1N1)pdm09

As sequências consenso foram obtidas na ferramenta *DNAStar Lasergene SeqMan Program version 7.0* (DNASTAR, Inc., Madison, WI), alinhadas pelo *Clustal M* (SIEVERS *et al.*, 2011). A árvore filogenética foi construída pelo método de Máxima Verossimilhança e realizada através do *IQ-TREE 1.6.12* (NGUYEN *et al.*, 2015), no servidor online (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (TRIFINOPOULOS *et al.*, 2016, com *bootstrap* ultrarrápido (UFBoot) (HOANG *et al.*, 2018) e 1.000 repetições e teste SH-aLRT (-aLRT 1000) (GUINDON *et al.*, 2010) usando uma descoberta de modelo automática - *ModelFinder* (KALYAANAMOORTHY *et al.*, 2017). A escolha do modelo evolutivo é realizada automaticamente pelo próprio *IQ-Tree* por meio da plataforma *ModelFinder*: (HKY + G4 + F -BB 1000 -ALRT 1000) (RAMBAUT *et al.*, 2010). Para ilustração da árvore filogenética foi usado o programa *FigTree V1.4.4* e para a ilustração das mutações de aminoácidos foi utilizada a ferramenta *WebLogo 3* (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>) e *highlighter* (KEELE, 2008).

4.3.3 Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) da IL-28B

Para avaliar os fatores genéticos do hospedeiro associados à resposta imune à infecção FluA, foram avaliados em relação à internação em UTI, os SNP da IL-28B rs12979860 (composto pelos genótipos C/C, C/T e T/T) e o rs8099917 (G/G, G/T e T/T) (HAYES, 2012; JIMENÉZ-SOUSA *et al.*, 2013; BAÑOS, 2015). As frequências de alelo e genótipo foram calculadas usando o equilíbrio de HARDY-WEINBERG.

Foi utilizado o protocolo padrão de qPCR para as reações utilizando um conjunto de ensaios *TaqMan® SNP Genotyping* (AppliedBiosystems, Carlsbad, CA, EUA), para os SNP rs12979860 e rs8099917, seguindo as especificações do fabricante. Os ensaios *TaqMan® Genotyping* para os respectivos SNPs em estudo, incluem dois iniciadores (*senso* e *anti-senso*) para a amplificação das regiões de interesse e duas sondas para detecção de polimorfismos específicos no DNA genômico. As sondas *MGB* (*minor groove binder*) possuem um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' (*VIC™* para detecção do alelo 1 ou *FAM™* para detecção do alelo 2), e um *Quencher* não fluorescente (NFQ) na terminação 3' da sonda (QUADRO 9).

QUADRO 9 - SEQUÊNCIAS E DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA DOS SNP DA IL-28B

SNP	Contexto da Sequência Amplificada	SNP alelo	VIC™ - alelo	FAM™ - alelo
rs12979860	TGAACCAGGGAGCTCCCCGAAG GCG[C/T]GAACCAGGGTTGAATT GCACTCCGC	C/T	C	T
rs8099917	TTTTGTTTTCTTTCTGTGAGCAA T[G/T]TCACCCAAATTGGAACCAT GCTGTA	G/T	G	T

FONTE: www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping

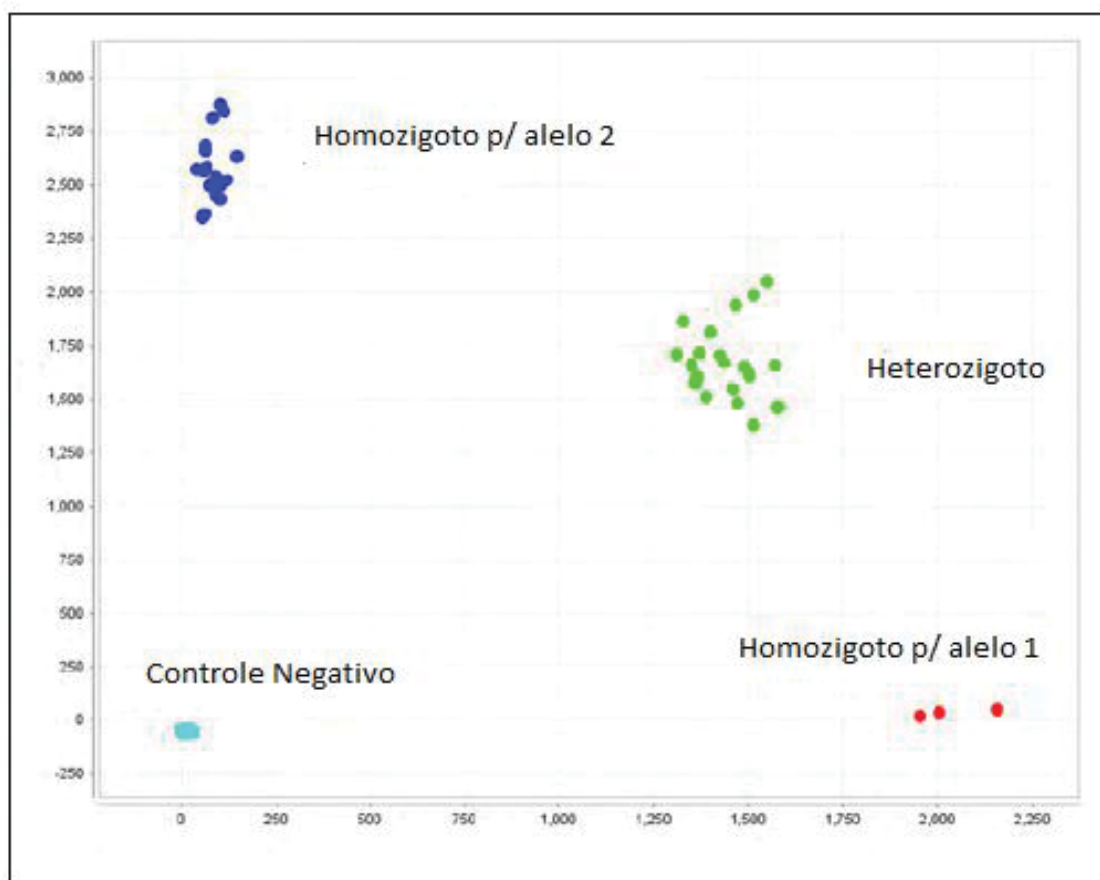
As amostras foram analisadas individualmente de acordo com as características de amplificação apresentadas em duas ferramentas: *ViiA 7 Software Version 1.2.4 (Applied Biosystems)* e *TaqMan Genotyper Software, Version 1.4.0 (Applied Biosystems)*, utilizando a análise por *autocalling* (algoritmos internos da plataforma), conforme indicação do fabricante (QUADRO 10; FIGURA 11).

QUADRO 10 - CRITÉRIOS PARA DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS

Amostra	SNP(alelo)	Localização no gráfico
Alelo 1 (homozigoto), marcado com VIC™	CC e GG	Ponto no canto inferior direito
Alelo 2 (homozigoto), marcado com FAM™	TT	Ponto no canto superior esquerdo
Alelos 1 e 2 (heterozigoto)	CT e TG	Aproximadamente entre os <i>clusters</i> de alelos 1 e 2
Controle Negativo		Sem amplificação (canto inferior esquerdo)

FONTE: Adaptado de *TaqMan® SNP Genotyping Assays - USER GUIDE*

FIGURA 11 – GRÁFICO TÍPICO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA



FONTE: TAQMAN® SNP GENOTYPING ASSAYS - USER GUIDE.

4.3.4 Análise Estatística da segunda seção

As análises estatísticas foram realizadas usando o *R* versão 3.6.1. A análise univariada foi realizada usando os testes exato de Fisher e qui-quadrado para variáveis categóricas e os testes de soma de postos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* com múltiplas comparações *post hoc* de *Tukey* para variáveis contínuas, conforme apropriado. O coeficiente de correlação de *Spearman* foi utilizado para avaliar a correlação entre CV e tempo de internação, CV e tempo de coleta desde a admissão hospitalar. Um modelo de regressão linear *stepwise* foi usado para determinar se a CV estava associada às características do paciente. A análise de regressão logística multivariada foi realizada para avaliar as covariáveis relacionadas à infecção por (H1N1)pdm09 e admissão na UTI. *Odds ratio* (OR) ajustado (aOR) foi calculado usando o modelo multivariado com seleção gradual de variáveis, com um ponto de corte de $p < 0,2$. *Pearson* e análises de desvio residual foram realizadas para testar o modelo de ajuste. A análise da curva *ROC* (*Receiver operating characteristic*)

foi realizada para avaliar o desempenho da CV dos pacientes e o escore de prognóstico de gravidade da doença na identificação de prováveis casos de admissão na UTI. O escore foi obtido a partir de valores de aOR de cada preditor de gravidade da doença divididos por um fator de correção (o menor valor de aOR entre os preditores). Todos os testes estatísticos foram bilaterais, com significância estabelecida em $p < 0,05$. Foi utilizado um intervalo de confiança (IC) de 95% para ajustar as estimativas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta tese foi escrita no modelo recomendado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, sendo que os resultados e discussão serão apresentados na forma de dois artigos.

5.1 ARTIGO 1 – Publicado no *Journal of Virological Methods*.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Protocols

Standardization of a high-performance RT-qPCR for viral load absolute quantification of influenza A

L.A. Pereira^a, B.A. Lapinski^a, M.C. Debur^b, J.S. Santos^c, R.R. Petterle^d, M.B. Nogueira^c, L.R. R. Vidal^c, S.M. De Almeida^c, S.M. Raboni^{c,e,*}^a Graduate Program in Internal Medicine and Health Science, Universidade Federal, do Paraná, Curitiba, Brazil^b Public Health Laboratory, Curitiba, Brazil^c Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil^d Sector of Health Sciences, Medical School, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil^e Infectious Diseases Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Viral load
Absolute quantification
Standard
Influenza A
MIQE

ABSTRACT

Influenza is an acute viral infectious respiratory disease worldwide, presenting in different clinical forms, from influenza-like illness (ILI) to severe acute respiratory infection (SARI). Although real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) is already an important tool for both diagnosis and treatment monitoring of several viral infections, the correlation between the clinical aspects and the viral load of influenza is still unclear. This lack of clarity is primarily due to the low accuracy and reproducibility of the methodologies developed to quantify the influenza virus. Thus, this study aimed to develop and standardize a universal absolute quantification for influenza A by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR), using a plasmid DNA. The assay showed efficiency (Eff%) 98.6, determination coefficient (R^2) 0.998, linear range 10^{-1} to 10^{-10} , limit of detection (LOD) 6.77, limit of quantification (LOQ) 20.52 copies/reaction. No inter and intra assay variability was shown, and neither was the matrix effect observed. Serial measurements of clinical samples collected at a 72h interval showed no change in viral load. By contrast, immunocompetent patients have a significantly lower viral load than immunosuppressed ones. Absolute quantification in clinical samples showed some predictors associated with increased viral load: (H1N1)pdm09 (0.045); women ($p = 0.049$) and asthmatics ($p = 0.035$). The high efficiency, precision, and previous performance in clinical samples suggest the assay can be used as an accurate universal viral load quantification of influenza A. Its applicability in predicting severity and response to antivirals needs to be evaluated.

1. Introduction

Influenza is an acute infectious respiratory disease with high transmissibility and global distribution. It is associated with seasonal epidemics that reach all social and age groups, representing a significant concern for global health authorities and a substantial economic burden. The (H1N1)pdm09 and H3N2 influenza A (FluA) subtypes are the most relevant to public health (WHO, 2018).

Clinical manifestations of influenza vary in intensity, from mild to severe disease, and serious complications have been reported, especially in immunocompromised, the elderly, children < 5years, pregnant women, and people with chronic conditions. The most common

complications are pneumonia and severe acute respiratory infection (SARI) (Lalueza et al., 2019).

In recent years, molecular biology has advanced significantly in diagnosing viral respiratory diseases through reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR), a highly sensitive, specific, fast, and low-cost methodology that allows quantitative evaluation of results (Bustin et al., 2005). Viral quantification has been applied to monitoring therapy and prognosis of several diseases, such as cytomegalovirus, HIV, hepatitis B infection. Its applicability has been mainly in treating transplant patients (Kessler et al., 1998; Watzinger et al., 2004; Razonable and Hayden, 2013; WHO, 2013; Warkad et al., 2018).

Findings of viral load (VL) of FluA and the disease's severity

* Corresponding author at: Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná Rua Padre Camargo, n° 280, Alto da Glória, Curitiba, Paraná, Zip Code 82060-240, Brazil.

E-mail address: sraboni@ufpr.br (S.M. Raboni).

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114439>

Received 12 February 2021; Received in revised form 13 December 2021; Accepted 17 December 2021

Available online 20 December 2021

0166-0934/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

correlation are controversial, and more studies on the viral dynamics and the role of the VL are needed (Noh et al., 2014; Clark et al., 2016). Furthermore, there is no consensus on how to quantify and interpret the VL of respiratory viruses. Currently, systematic standardization studies have been scarcely reported, and for the results of a VL quantification to be robust, it is necessary to define the limitations and include appropriate standards (Whelan et al., 2003; Bustin and Nolan, 2004; Wong and Medrano, 2005; Hou et al., 2010; Bustin et al., 2013; Svec et al., 2015; Bustin, 2017). Thus, this study aimed to standardize an absolute quantification of the VL of influenza A by RT-qPCR and evaluate VL predictors in a series of patients.

2. Materials and methods

2.1. Study design

The study followed the guidelines proposed in The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments – MIQE (Bustin et al., 2009) and was approved by the Ethics Committee of the Complexo Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR) (#18714013.4.0000.0096).

2.2. Standard construction

The production of positive universal control for the VL quantification tests was carried out using FluA sample provided by the Paraná Public Health Laboratory (LACEN-PR).

2.2.1. RNA extraction

Viral RNA was isolated from 200 µL of the clinical sample using the QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. The RNA was quantified in the DeNovix DS-11 spectrophotometer equipment and stored at -80 °C during the study period. The level of purity was evaluated, and A260/280 absorbance ratio between 1.9 and 2.1 was considered adequate.

2.2.2. Standard construction

At first, the M matrix gene and RnaseP (a constitutive gene used as an internal control of assay) were amplified by RT-qPCR in the ViiA™ 7

Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), following the World Health Organization (WHO) protocol (2009) (WHO, 2009). The RT-qPCR was carried out with Invitrogen SuperScript III Platinum One-Step quantitative RT-PCR kits (Life Technologies) according to manufacturer's instructions and an annealing temperature of 55 °C. The total volume of the reaction was 15 µL, using 5 µL of RNA, 760 nM, and 170 nM of the primer and probe, respectively.

According to the manufacturer's instructions, the amplicon of the gene M was inserted into pGEM®-T Easy Vector Systems kit, a linearized plasmid (Promega, Madison, WI, USA).

To verify the similarity between the cloned segment and the M gene of FluA strains from other hosts and seasons, the nucleotide sequencing of the insert was performed using the universal primers T7 and SP6 with BigDye Terminator, V.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The consensus sequences were obtained using the DNASTAR Lasergene SeqMan program v.7.0 (DNASTAR, Inc., Madison, WI), aligned with Clustal W on the Mega v.7.0 platform. Amino acid mutations were shown by WebLogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>).

Subsequently, the purified plasmid DNA was quantified and the number of DNA copies was calculated using the genome equivalents formula: $[\text{DNA amount (g)} \times 6.022 \times 10^{23} \text{ (copy/mol)}] / [\text{length vector} + \text{insert (bp)} \times 650 \text{ (g/mol/bp)}]$ (Lee et al., 2006). A stock solution of 10^{10} copies/µL was prepared, and working solutions were obtained by 10-fold serial dilutions.

2.3. Assay analytical validation

The validation included analytical measurement range, determination of detection (LOD) and quantitation (LOQ) limits, precision, and matrix effects. The LOD was calculated by the formula: $\frac{3.3s}{S}$ and LOQ by the formula: $\frac{10s}{S}$ where “s” is the standard deviation of responses and “S” is the slope from nine standard curves.

The intra-assay variation evaluation was performed by testing 20 technical replicates of the standard sample at a concentration of 5 and 25 copies/reaction by the same operator in different days, and inter-run was performed by 20 technical replicates of the standard sample at a concentration of 50 copies/reaction by two operators on separate days. To evaluate the matrix effects, the slopes of the standard curves of plasmid DNA, the representative sample - nasopharyngeal aspirate (NPA), and the plasmid RNA transcript were evaluated (FDA, 1996; CLSI/NCCLS, 2003, 2004; Chesher, 2008). The RNA transcription was using the MEGAscript® Kit (Thermo Scientific, Mississauga, ON). To construct the standard curves of the representative sample and transcribed RNA, the number of copies of respective samples were calculated by genome equivalents formula (using 105dp amplicon length as reference), and then, 10-fold serial dilutions were performed to obtain 10^{-2} to 10^{-6} copies/µL working solutions, as performed to the plasmid DNA standard curve in Section 2.2.2. The following standard curve parameters were considered suitable: PCR efficiency between 90–110 %, R_2 0.99–1, and coefficient of variation (CV) ≤5% (ANVISA, 2019).

2.4. Absolute quantification

The VL was determined by comparing the quantification cycle (Cq) of the M gene amplification of the target sample with a standard curve obtained by plotting six standards ranging from 10^1 to 10^6 copies/reaction in triplicates. A threshold of 0.1 was defined for all reactions. The raw results are presented in copies/reaction (quantity) and were converted into copies/mL by the formula: $[\text{quantity}/\text{RT-qPCR reaction volume}] \times [\text{sample elution volume (µL)}/\text{sample input to extraction (mL)}]$. All results of VL quantification were presented in Log10 copies/mL.

2.5. Viral load of clinical samples

The proposed assay was applied to a cohort of patients infected with FluA treated at CHC-UFPR. The convenience sampling method was used, respecting the inclusion criteria in the study groups. Samples were collected by trained professionals in an appropriate medium according to the WHO (2009) recommendations, being sent refrigerated to the virology laboratory after collection.

2.5.1. Serial quantification

Due to the impossibility of comparing the results obtained in the absolute quantification with the viral plaque titration, two serial quantifications were carried out to verify whether the variation of VL during the infection was following the natural history of the disease. For this evaluation, 3 groups were designed: (i) Immunocompetent patients with 2nd collection up to 72 h after the first collection; (ii) Immunocompetent patients with 2nd collection more than 72 h after the first collection; (iii) Immunosuppressed patients with 2nd collection more than 72 h after the first collection. Immunosuppressed patients included: HIV infection, hematological neoplasms, using systemic corticosteroids, or other immunosuppressive drugs. Patients were included between Jan/2015 and Dec/2018.

2.5.2. Viral load clinical assessment

A total of 153 specimens from outpatients and inpatients with a FluA RT-qPCR diagnosis between 2010 and 2018 were retrospectively selected for viral load quantification for assessing assay performance in clinical specimens.

2.6. Data analysis

Clinical and epidemiological data were reviewed in the reporting forms. Statistical analysis was performed using R version 3.6.1. Non-normally distributed continuous variables were analyzed using the Mann-Whitney test, two-way ANOVA, Kruskal Wallis Rank Sum test, Tukey post hoc multiple comparisons and linear regression. Multivariate linear regression analysis was performed to assess covariates related to VL alterations. All statistical tests were two-sided with a significance set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Standard control

As illustrated in Fig. 1, the colony PCR showed an insert with a length close to the expected (105bp). The cloned segment showed high similarity with the M gene segment between (H1N1)pdm09, H3N2 and avian FluA sequences of the seasons.

3.2. Assay validation

The assay performance was evaluated from nine standard curves

where three replicates supported each point. The Eff% ranged from 95.96 to 108.99, the R_2 from 0.991 to 1.000, Y-intercept from 36.49 to 40.34. The CV for all parameters was less than 5%. There was no significant difference among the slopes. The assay presented a linear range from 10^{-1} to 10^{-10} , LOD 6.77, and LOQ 20.52 copies/reaction (Fig. 2).

In addition, the method precision was assessed by inter-, and intra-assay carried out with replicates, and the CVs were below 5% (Table 1).

The matrix effect test showed no statistically significant difference between the slopes of the standard curves ($p = 0.307$). The Eff% ranged from 94.56 to 104.40, the R_2 from 0.997 to 0.999, the Y-intercept ranged from 37.144 to 37.763 and the CVs were less than 4.95 % (Fig. 3).

3.3. Viral load serial quantification

We performed VL serial quantification in samples of 19 patients hospitalized for SARI at the CHC-UFPR. Patients non-immunosuppressed were divided into those who were at the exponential phase of viral replication (group I, $n = 5$), and those in the clearance phase (group II, $n = 7$); patients immunosuppressed, who usually present prolonged VL, were in group III, ($n = 7$).

There were no significant differences between the epidemiological characteristics of the groups, except for the frequency of the subtype. All

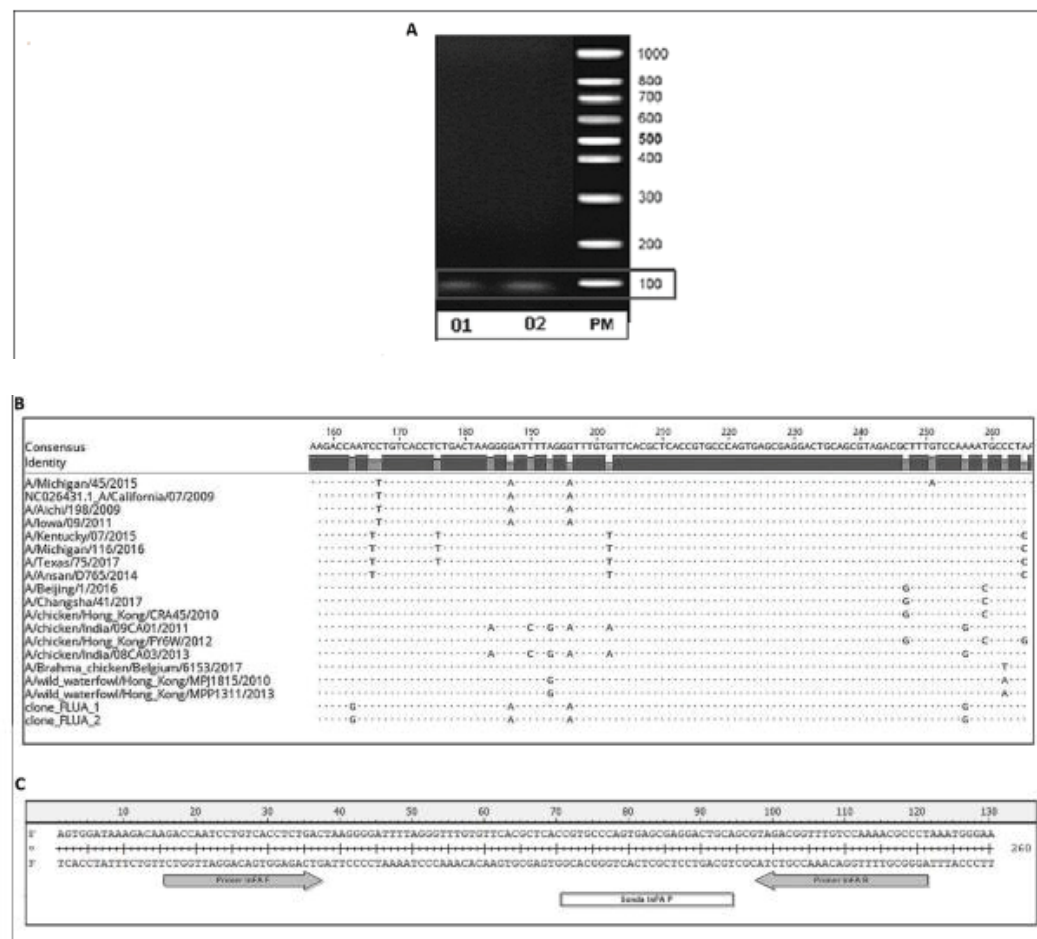


Fig. 1. Evaluation of the cloned insert. A) Colony PCR electrophoresis gel. Lines 01 and 02 refer to the products of cloning. The line on the right refers to the 1000bp ladder. B) Alignment of cloning products (clone FluA_1 and clone FluA_2) and human and avian FluA samples between 2013 and 2017 deposited in the GenBank. The region refers to the segment of the M gene between nucleotides 157 and 266. C) Location of primers and probe annealing in M gene segment.

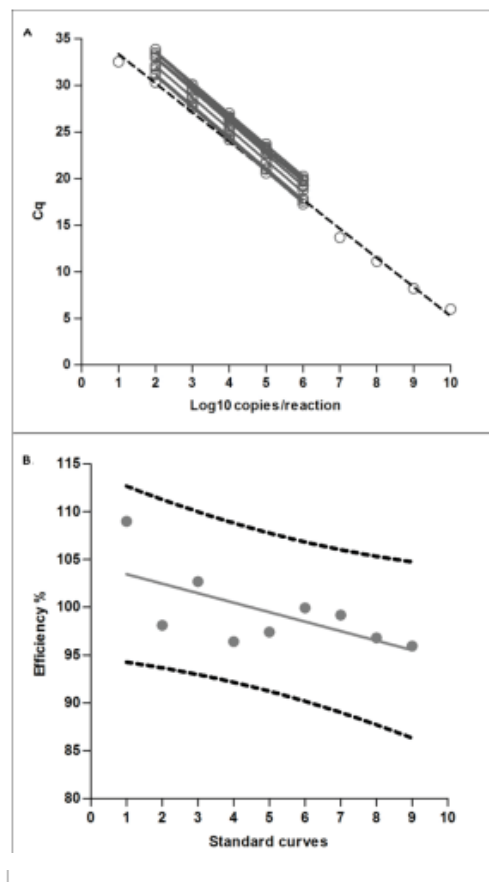


Fig. 2. a) Linear regression of nine standard curves (three replicates supported each point). The dotted line represents the linear range assay; the solid lines represent the range chosen for the standard curves for viral load quantification. b) Efficiency distribution of each standard curves. Dotted lines represent CV of 5%. Cq: quantification cycle.

patients in group I were infected with (H1N1)pdm09, while H3N2 prevailed in other groups ($p = 0.008$) (Table 2). In groups III and II, in which the intervals between the first and second sample collection were greater than 3 days, there is a substantial reduction in the viral load, which is more pronounced in group II than in group III (immunocompetent and immunosuppressed, respectively) ($p = 0.0031$).

In Fig. 4, the two-way ANOVA showed that there is a time effect statistically significant between quantifications ($p < 0.0001$) and groups ($p = 0.003$) on VL. There was no decrease in VL between the first and second samples in the group in which the two collections were performed in periods of less than 72 h. However, the VLs of the immunocompetent group were 2.4 times lower than those of the immunosuppressed group, in collections over 72 h ($p < 0.0001$).

Table 1

Inter and intra-assays test performance.

	Standard (copies/reaction)	Replicates (n)	Cq 1 (mean)	Cq 2 (mean)	CV (%)	SD
Intra-assay	5	20	36.57 ^{1a}	35.43 ^{1b}	2.24	0.81
	25	20	34.27 ^{1a}	32.81 ^{1b}	3.09	1.04
Inter-assay	50	20	33.56 ^{1a}	33.68 ^{2a}	1.13	0.08

1: operator 1; 2: operator 2; a: day 1; b: day 2.

Cq: quantification cycle; CV: coefficient of variation; SD: standard deviation.

3.4. Viral load clinical assessment

The median (IQR) VL from 142 patients with laboratory diagnosis of FluA during the study period was 5.4 (4.3–6.7). Table 3 shows the assessment of VL according to subtype and clinical-epidemiological characteristics of FluA infected patients. Of the predictors related to risk factors, only asthmatics showed an increase in VL ($p = 0.035$). There was no difference in VL in immunosuppressed patients, regardless of the presence of risk factors or antivirals use.

Multiple linear regression analyses showed that the (H1N1)pdm09 infection ($p = 0.045$); females ($p = 0.017$); asthma ($p = 0.027$); nasopharyngeal aspirate ($p = 0.016$) and fever ($p = 0.014$) were independent factors associated with viral load increase.

4. Discussion

In the present study, an RT-qPCR was developed using plasmid DNA as the universal absolute quantification template to assess the VL of FluA in respiratory samples. This method showed excellent performance in its operational characteristics analysis and can be used for comparative studies on the dynamics and impact of VL in patients infected with FluA. This quantitative assay was designed, optimized, and validated following the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009).

Previous studies have found low correlations between the clinical characteristics of FluA and VL. Still, the primary protocol used in those studies was relative quantification, which generally is calculated by Cq with a reference gene (Pabbaraju et al., 2009; Giannella et al., 2011; Hijano et al., 2019). However, reference genes may not be homogeneously expressed in all samples and may lose relevant information. Therefore, this quantification can be biased if the protocol uses just one reference gene (Gullett and Nolte, 2015).

On the other hand, absolute quantification is considered a more reliable and reproducible method. The quantification carried out qPCR by a standard curve, constructed from known concentrations of

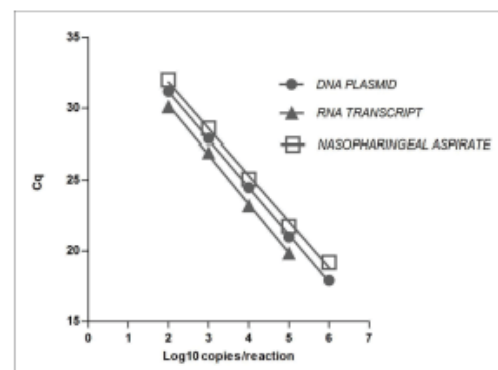


Fig. 3. Comparison between the slopes of the standard curves performed with plasmid DNA (circle), representative sample (square) and plasmid RNA transcript (triangle) in the range 10^{-2} to 10^{-6} . Three replicates supported each point. Cq: quantification cycle.

Table 2
Viral load serial quantification.

*Group	Year Sample collection	Gender	Age (years)	Immuno-suppressed	Underlying disease	Coinfection	Subtype	Symptom onset until 1 st sample (days)	Symptom onset until 2 st sample (days)	1 st VL (Log10 copies/reaction)	2nd VL (Log10 copies/reaction)
I	2016	m	55	No	yes	none	(H1N1) pdm09	0	1	7.6	8.5
	2016	m	7	No	yes	none	(H1N1) pdm09	0	1	7.7	8.8
	2016	m	72	No	yes	none	(H1N1) pdm09	0	2	7.7	6.4
	2016	f	20	No	no	none	(H1N1) pdm09	0	1	4.9	4.7
	2016	f	71	No	yes	CoV-OC43	(H1N1) pdm09	0	1	4.0	4.5
II	2015	f	39	No	yes	none	H3N2	1	4	7.2	undetected
	2017	m	3	No	yes	none	H3N2	3	17	5.4	undetected
	2018	f	65	No	yes	none	H3N2	0	6	7.4	2.6
	2018	f	36	No	yes	none	H3N2	2	5	5.8	undetected
	2018	f	70	No	yes	none	H3N2	2	9	4.8	2.4
	2018	f	1	No	no	none	H3N2	2	13	6.7	1.3
	2018	m	68	No	yes	none	(H1N1) pdm09	3	6	3.3	1.6
	2015	m	22	Yes	yes	none	H3N2	1	4	5.5	1.9
III	2017	m	1	Yes	yes	none	H3N2	4	20	6.0	5.5
	2017	f	20	Yes	yes	none	H3N2	0	7	7.9	3.4
	2017	f	30	Yes	yes	none	H3N2	1	5	4.3	3.6
	2018	m	23	Yes	yes	none	H3N2	1	4	4.0	3.0
	2018	m	2	Yes	yes	none	(H1N1) pdm09	3	9	4.7	4.5
	2018	m	68	Yes	yes	hRV	(H1N1) pdm09	12	20	4.2	1.2

VL: viral load. CoV-OC43: Human coronavirus OC43; hRV: Human rhinovirus.

* Group definition: (I) Immunocompetent patients with 2nd collection up to 72 h after the first collection; (II) Immunocompetent patients with 2nd collection more than 72 h after the first collection; (III) Immunosuppressed patients with 2nd collection more than 72 h after the first collection.

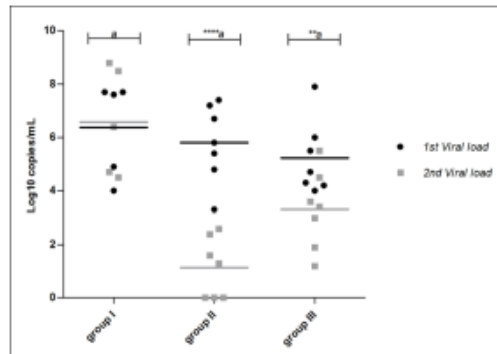


Fig. 4. Two-way ANOVA test of the VL variation in the serial collection of each group.

Intra-assay: groups II and III showed a statistical difference between the first and second viral load (**** p-value ≤ 0.0001 ; ** p-value ≤ 0.01 , respectively). Inter-assay - *the group differs from the others two in terms of viral clearance profile (p = 0.0031).

Group definition: (I) Immunocompetent patients with 2nd collection up to 72 h after the first collection; (II) Immunocompetent patients with 2nd collection more than 72 h after the first collection; (III) Immunosuppressed patients with 2nd collection more than 72 h after the first collection.

benchmarks to calculate the most accurate copy numbers of a target, is the method more established. The use of a standard template is a crucial requirement for obtaining accurate VL and, given the lack of commercially available quantitative standards, inserting RT-qPCR into the diagnostic routine is a significant challenge (Dhanasekaran et al., 2010; Duchamp et al., 2010).

Another method to perform absolute quantification is digital PCR (dPCR). This method does not require standard curves, and it looks like a promising new tool for clinical microbiology. However, its increased complexity, slower throughput of dPCR platforms, lower sensitivity, false-positive partitions, the need for additional validations, and cost are significant drawbacks to their incorporation into clinical laboratories. (Sanders et al., 2013; Huggett et al., 2015; Vynck et al., 2016; Kuypers and Jerome, 2017).

These methods are based on molecular biology and have advantages over the gold standard (plate titration) in sensitivity, speed, cost, and the possibility of implementation in routine diagnostics. However, all PCR assays can detect non-viable viruses, unlike cell cultures. For genome DNA, there are protocols to minimize the detection of non-viable targets. However, as RNA is much more unstable and degradable, there are still no viable solutions for routine adoption. Thus, the quantification of viral load in acute infections is recommended for use in respiratory samples while the patient is in clinical conditions or immunocompromised patients until viral clearance (Kim et al., 2021).

The primers selected to obtain the gene segment amplification in this study are those used in the international influenza epidemiological surveillance network (Shu et al., 2011), and *in silico* analysis showed that this M gene is as highly conserved in human FluA subtypes as in different wild birds, and the plasmid replication process did not change the amino acid sequences at the hybridization sites of the primers and probe. Therefore, this methodology can be applied to seasonal FluA infections and to potentially pandemic variants.

There are many challenges in developing an RNA virus absolute viral load quantification assay. One of them is that several factors can affect the quantity and quality of viral RNA - for example, collection, handling, method of viral isolation of the sample - which can make quantification impossible or underestimated. Thus, it is necessary to standardize sample collection, transport, storage, and processing and validate viral isolation assays through RNA quantification and fragment analysis

Table 3
Influenza A viral load and clinical assessment.

	n(%)	Viral load median (IQR)	p	B (95 % CI)	p
Subtype					
H3N2	89 (63)	5.1 (4.1–6.4)	0.0453	+0.53 (1.06 – 0.01)	0.045
(H1N1)pdm09	53 (37)	5.8 (4.8–7.0)			
Gender					
Male	69 (49)	5.1 (3.6–6.7)	0.0498	+0.62 (0.12–1.13)	0.017
Female	73 (51)	5.7 (4.6–6.7)			
Pregnancy					
Pregnant women	6 (9)	4.45 (3.0–5.4)	0.0525		
No pregnant women	63 (91)	5.80 (4.7–6.7)			
Age group					
≤2 y	30 (21)	5.5 (4.1–6.5)	0.3201		
2–18 y	29 (20)	6.0 (4.8–7.3)			
19–60y	56 (40)	5.3 (4.1–6.5)			
> 60y	27 (19)	4.8 (4.0–6.7)			
Ethnic group					
African descendant	124 (87)	4.6 (4.0–6.1)	0.1802		
Caucasian	18 (13)	5.5 (4.3–6.7)			
Presenting risks factors					
1 risk factor	123 (87)	5.6 (4.1–6.7)	0.5533		
> 1 risk factor	86 (61)	5.6 (4.1–6.8)			
	37 (26)	4.8 (4.1–6.3)			
Underlying diseases					
Asthma	98 (69)	5.4 (4.2–6.7)	0.8310	+0.89 (0.10–1.67)	0.027
Cardiac disorders	21 (15)	6.0 (4.8–8.0)			
Diabetes	29 (20)	5.0 (4.2–6.1)	0.4098		
Neuromuscular disorders	6 (4)	5.8 (4.2–7.8)			
Lung diseases	8 (6)	5.0 (3.5–6.4)	0.4789		
HSCT	20 (14)	4.8 (4.0–6.9)			
Immunosuppressed	34 (24)	5.6 (4.0–6.5)	0.7330		
	51 (36)	5.5 (4.0–6.5)			
Sample					
Nasopharyngeal aspirate	84 (59)	5.7 (4.6–6.8)	0.040	+0.64 (1.15 – 0.12)	0.016
Swab nasopharyngeal	58 (41)	4.8 (4.0–6.0)			
Viral coinfection					
	16 (11)	4.1 (3.3–6.6)	0.0896		
Symptoms					
Fever	123 (87)	5.6 (4.6–6.8)	0.006	+1.28 (0.27–2.29)	0.014
Sore throat			0.195		

Table 3 (continued)

	n(%)	Viral load median (IQR)	p	B (95 % CI)	p
Myalgia					
	113 (80)	5.8 (4.7–7.0)	0.122		
	23 (16)	5.6 (4.2–7.4)			
Antiviral treatment					
Yes	90 (63)	5.5 (4.4–6.8)	0.1945		
No	52 (37)	5.1 (4.0–6.5)			

Viral loads and β (95 % CI) are presented as Log10 copies/mL.

* HSCT – hematopoietic stem cells transplantation.

whenever there is a change in methodology. In addition, the extraction volume of each viral isolation kit and the input used in the RT-qPCR reaction are also taken into account to calculate the result in copies/mL (Bai et al., 2021).

Meanwhile, the main challenge is the selection and production of the standard control. It should have a matrix that corresponds as closely as possible to the clinical samples, so that both the standard and the sample are exposed to the same interference factors (Burd, 2010). For some specific viruses, there are commercial standards available to measure the VL, but they are not usually accessible for inclusion in the diagnostic routine due to their high cost. The availability of this standard control in our laboratory will allow studies to be carried out that include the impact of FluA viral load on the severity and outcome of this disease in both seasonal and pandemic periods. Additionally, to expand knowledge about the pathogenesis of this disease and evaluate the effect of potential antiviral drugs.

Viral RNA and transcribed RNA can be used as alternative sources of standards, but both are degradable and depletable sources. Moreover, transcribed RNA requires more steps after cloning, increasing the turn-around time and costs of the test (Bustin et al., 2015; Granados et al., 2017). Besides, the performance comparison between the standard control of plasmid DNA, transcribed RNA, and viral RNA showed no effect on the plasmid matrix or inhibition of the test. As the three standard curves behaved in the same way, regardless of the matrix used, the choice of the plasmid as a standard was due to its intrinsic characteristics: (i) stability, (ii) not degrading after long periods of storage, (iii) inexhaustible source, and (iv) requiring less preparation than the transcribed RNA. In this way, a reproducible inter- and intra-assay standard was obtained, with an easy and large-scale production that reduces costs, making the test more accessible (Duchamp et al., 2010; Lee et al., 2010; Formisano-Tréziny et al., 2012; Behzadi et al., 2016; Sanders et al., 2018).

The RT-qPCR standardized presented a wide dynamic range and high sensitivity and specificity. The LOD obtained enables its application in different periods of FluA infection. The minimal intra- and inter-assay variability demonstrated guarantees repeatability and supports reproducibility at all concentrations in various diagnostics and research facilities (Bowers and Dhar, 2011; Forootan et al., 2017). Furthermore, in all parameters, the CV were <5%, indicating the homogeneous and robust nature of the results (CLSI/NCCLS, 2003). Lastly, the successful generation of a FluA standard control will allow the application of this test to compare the VL with other samples collection simultaneously (Suslov and Steindler, 2005).

Some risk factors are associated with the worse evolution of influenza infection. But, the relationship between VL and risk factors is not well described. In this analysis, only asthmatic patients had higher VL ($p = 0.035$). Currently, three studies reported any change in VL associated with risk factors, Giannella et al. (2011) showed an inverse correlation between VL and age, and increased VL in pregnant women with

(H1N1)pdm09 infections; Lee et al. (2013) reported highest VL in patients with comorbidities; and Granados et al. (2017) showed an increase VL in H3N2 infected patients with <1 year and > 65 years. Regarding VL and gender, just one study also has observed an association. Wang et al. (2017) showed a VL decrease in women, opposite to what we observed in our population. It is well established in the literature that adult women are associated with worse outcomes in FluA infection than men (WHO, 2010), not by changes in viral replication, but by increased pro-inflammatory immune responses due to its hormonal composition (Robinson et al., 2011). As the difference in VL was not due to the pregnancy and the effect-modifying variables: age, comorbidity, use of antiviral before sample collection, symptom duration, and sample type, it is possible that the association between VL and gender is more related to variables that could not be evaluated because they lack in the medical records (e.g., vaccination status). However, more studies are needed to understand this mechanism.

This study has some limitations: (i) the performance of the quantitative assay was not compared with viral plaque titration, but when the assessment was performed on clinical samples, the results obtained were according to previous reports (Kunisaki and Janoff, 2009; ECDPC, 2017). It was observed that the average VL in samples collected in the first 72 h after the onset of symptoms is higher than in those with a long time of infection and that, even with the use of antiviral, there is no decrease in VL in the first three days of symptoms, the exponential period of viral replication (ECDPC, 2017). In addition, in long-term infections, the immunosuppressed group showed less change in VL than the immunocompetent ones, which is due to the characteristic of prolonged viral replication in immunosuppressed individuals (Kunisaki and Janoff, 2009); (ii) in this analysis, there is no control of the reverse transcription steps. In the diagnosis of respiratory viruses, human genes are used as reaction controls due to the heterogeneity and instability of viral genes. Thus, this is an inherent limitation to all assays proposed for respiratory RNA viruses. In the present study, we used the Rnase P gene as a PCR reaction control; and (iii) the use of different samples (swab and NPA) in VL quantification demonstrated significant differences, which can impact comparative studies. Although previous studies have not shown such a difference between both samples (Chan et al., 2008; Lambert et al., 2008; Irving et al., 2012). The heterogeneity of specimens is a significant limitation to evaluate VL of respiratory viruses. Authors who have been reporting similar operational characteristics of these tests, independently of specimen type, usually evaluate qualitative studies. However, for quantitative tests, the findings are controversial.

We believe that it is one of the strengths of our research, as now with the influenza VL standardized, we might evaluate these heterogeneous samples and find how to normalize them, which is not known yet.

As shown, the VL in FluA infection varies depending on several factors, so the assessment of VL can contribute to the understanding of virulence and pathogenesis, which makes it an excellent candidate as a tool in assessing the patient's prognosis and in clinical management (Gullett and Nolte, 2015). Therefore, the perspective of this study is that the standardized methodology can be applied to the development of new treatments and to assess the impact of FluA infection on clinical practice.

5. Conclusion

We report relevant assay parameters, which demonstrate the great potential that RT-qPCR has as a tool for the absolute quantification of FluA virus. In addition to the precision shown by the model developed, its stability, cost, and accessibility make it a viable instrument for including universal FluA viral load quantification in diagnostic laboratories.

Author statement

Pereira LA: Methodology, Data Analysis, Writing- Original draft preparation; Lapinski BA: Data Analysis, Writing- Original draft

preparation; Santos JS: Methodology, Data Analysis; Petterle RR: Data Analysis; Nogueira MB: Conceptualization, Methodology; Vidal LRR: Conceptualization, Methodology; De Almeida SM: Data Analysis, Reviewing and Editing; Raboni SM: Conceptualization, Supervision, Data Analysis, Writing- Reviewing and Editing.

Funding information

This work was supported by Fundação Araucária. Project number: 059/2017.

Data availability

Data will be made available on request.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Academic Publishing Advisory Center (Centro de Assessoria de Publicação Acadêmica – CAPA – www.capa.ufpr.br) of the Universidade Federal do Paraná (UFPR) for assistance with English language editing.

References

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Farmacopeia Brasileira. Farm. Bras. 1 e 2 (60–9), 72–85. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000100002>, 6a edição.
- Bai, H., Zhao, J., Ma, C., et al., 2021. Impact of RNA degradation on influenza diagnosis in the surveillance system. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 100 (4), 115388 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115388>.
- Behzadi, M.A., Ziyayyan, M., Alborzi, A., 2016. A diagnostic one-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction method for accurate detection of influenza virus type A. *Arch. Med. Sci.* 12 (6), 1286–1292. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.62914>.
- Bowers, R.M., Dhar, A.K., 2011. Effect of template on generating a standard curve for absolute quantification of an RNA virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 25 (1), 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.12.002>.
- Burd, E.M., 2010. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (3), 550–576. <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09>.
- Bustin, S., 2017. The continuing problem of poor transparency of reporting and use of inappropriate methods for RT-qPCR. *Biomol. Detect. Quantif.* 12 (May), 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.05.001> [Internet].
- Bustin, S.A., Nolan, T., 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 15 (3), 155–166. PMID: 15331581.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W., 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 597–601. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01755> (Bustin).
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55 (4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., et al., 2013. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat. Methods* 10 (11), 1063–1067. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2697>.
- Bustin, S., Dhillon, H.S., Kirvell, S., Greenwood, C., Parker, M., Shipley, G.L., et al., 2015. Variability of the reverse transcription step: practical implications. *Clin. Chem.* 61 (1), 202–212. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230615>.
- Chan, K.H., Peiris, J.S.M., Lim, W., Nicholls, J.M., Chiu, S.S., 2008. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children. *J. Clin. Virol.* 42 (1), 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.12.003>.
- Chesher, D., 2008. Evaluating assay precision. *Clin. Biochem. Rev.* 29 (Suppl. 1 (August)), S23–6 [Internet] PMID: PMC2556577.
- Clark, T.W., Ewings, S., Jo, Medina M., Batham, S., Curran, M.D., Parmar, S., et al., 2016. Viral load is strongly associated with length of stay in adults hospitalized with viral acute respiratory illness. *J. Infect.* 73 (December (6)), 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.09.001>.

- CLSI/NCCLS, 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach. Approved Guideline. CLSI Document EP6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI/NCCLS, 2004. Protocols for Determination for Limits of Detection and Limits of Quantitation. Approved Guideline. CLSI Document EP17-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Dhanasekaran, S., Doherty, T.M., Kenneth, J., 2010. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J. Immunol. Methods* 354 (1–2), 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.01.004>.
- Duchamp, M.B., Casalegno, J.S., Gillet, Y., Frobert, E., Bernard, E., Escuret, V., et al., 2010. Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin. Microbiol. Infect.* 16 (4), 317–321. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03169>.
- ECDC – EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017. Expert Opinion on Neuraminidase Inhibitors for the Prevention and Treatment of Influenza: Review of Recent Systematic Reviews and Meta-analyses. Stockholm. Available in: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Scientific-advice-neuraminidase-inhibitors-2017.pdf>.
- FDA – US Food and Drug Administration, 1996. Guidance for Industry: Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. Rockville, MD: Nov.
- Formisano-Tréziny, C., Feliciano, M., Gabert, J., 2012. Development of plasmid calibrators for absolute quantification of miRNAs by using real-time qPCR. *J. Mol. Diagn.* 14, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.02.008>.
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögren, B., Linz, L., Kubista, M., 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* 12 (September 2016), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>.
- Giannella, M., Alonso, M., de Viedma, D.G., Roa, P.L., Catalán, P., Padilla, B., et al., 2011. Prolonged viral shedding in pandemic influenza A(H1N1): clinical significance and viral load analysis in hospitalized patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 17 (8), 1160–1165. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03399>.
- Granados, A., Petrich, A., McGeer, A., Gubbay, J.B., 2017. Measuring influenza RNA quantity after prolonged storage or multiple freeze/thaw cycles. *J. Virol. Methods* 247 (May), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.05.018>.
- Gullett, J.C., Nolte, F.S., 2015. Quantitative nucleic acid amplification methods for viral infections. *Clin. Chem.* 61 (1), 72–78. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.223289>.
- Hijano, D.R., Brazelton de Cardenas, J., Maron, G., Garner, C.D., Ferrolino, J.A., Dallas, R.H., et al., 2019. Clinical correlation of influenza and respiratory syncytial virus load measured by digital PCR. *PLoS One* 14 (9), e0220908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220908>.
- Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L., Lin, S., 2010. Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal pcna as the model gene. *PLoS One* 5 (March (3)), e9545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009545>. PMID: 20221433; PMCID: PMC2832698.
- Huggett, J.F., Cowen, S., Foy, C.A., 2015. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin. Chem.* 61, 79–88. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221366>.
- Irving, S.A., Vandermouse, M.F., Shay, D.K., Belongia, E.A., 2012. Comparison of nasal and nasopharyngeal swabs for influenza detection in adults. *Clin. Med. Res.* 10 (November (4)), 215–218. <https://doi.org/10.3121/cmr.2012.1084>. Epub 2012 Jun 21. PMID: 22723469; PMCID: PMC3494547.
- Kessler, H.H., Pierer, K., Dragon, E., Lackner, H., Santner, B., Stünzner, D., et al., 1998. Evaluation of a new assay for HBV DNA quantitation in patients with chronic hepatitis B. *Clin. Diagn. Virol.* 9, 37–43. [https://doi.org/10.1016/s0928-0197\(97\)10008-3](https://doi.org/10.1016/s0928-0197(97)10008-3).
- Kim, J.Y., Bae, S., et al., 2021. Diagnostic usefulness of subgenomic RNA detection of viable SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 [published online ahead of print, 2021 Aug 13]. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.08.009>. S1198-743X(21)00466-3.
- Kunisaki, K.M., Janoff, E.N., 2009. Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect. Dis.* 9 (8), 493–504. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70175-70176](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70175-70176).
- Kuyper, J., Jerome, K.R., 2017. Applications of digital PCR for clinical microbiology. *J. Clin. Microbiol.* 55 (6), 1621–1628. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17>.
- Laluzza, A., Folgueira, D., Muñoz-Gallego, I., Trujillo, H., Laureiro, J., Hernández-Jiménez, P., et al., 2019. Influence of viral load in the outcome of hospitalized patients with influenza virus infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38 (April (4)), 667–673. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03514-1>.
- Lambert, S.B., Whitley, D.M., O'Neill, N.T., Andrews, E.C., Canavan, F.M., Bletchly, C., Siebert, D.J., Sloots, T.P., Nissen, M.D., 2008. Comparing nose-throat swabs and nasopharyngeal aspirates collected from children with symptoms for respiratory virus identification using real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics* 122 (September (3)), e615–620. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-0691>. Epub 2008 Aug 25. PMID: 18725388.
- Lee, N., Chan K., P., Rainer H., T., Hui, D., Choi W., K., Cockram S., C., 2013. Influenza virus load in hospitalised patients. *Hong Kong Med. J.* 19 (4), 15–18.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S.G., Hwang, S., 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 123 (3), 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.014>.
- Lee, H.K., Lee, C.K., Loh, T.P., Tang, J.W., Chiu, L., Tambyah, P.A., Sethi, S.K., Koay, E.S., 2010. Diagnostic testing for pandemic influenza in Singapore: a novel dual-gene quantitative real-time RT-PCR for the detection of influenza A/H1N1/2009. *J. Mol. Diagn.* 12 (September (5)), 636–643. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.100010>. Epub 2010 Aug 5.
- Noh, J.Y., Song, J.Y., Hwang, S.Y., Choi, W.S., Heo, J.Y., Cheong, H.J., et al., 2014. Viral load dynamics in adult patients with A(H1N1)pdm09 influenza. *Epidemiol. Infect.* 142 (4), 753–758. <https://doi.org/10.1017/S0950268813001672>.
- Pabbaraju, K., Wong, S., Wong, A.A., Appleyard, G.D., Chui, L., Pang, X.L., et al., 2009. Design and validation of real-time reverse transcription-PCR assays for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus. *J. Clin. Microbiol.* 47 (11), 3454–3460. <https://doi.org/10.1128/JCM.01103-09>.
- Razonable, R.R., Hayden, R.T., 2013. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin. Microbiol. Rev.* 26 (4), 703–727. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-13>.
- Robinson, D.P., Lorenzo, M.E., Jian, W., Klein, S.L., 2011. Elevated 17 β -estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. *PLoS Pathog.* 7 (7), e1002149. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002149>.
- Sanders, R., Mason, D.J., Foy, C.A., Huggett, J.F., 2013. Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification. *PLoS One* 8 (9), e75296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075296>. Published 2013 Sep 20.
- Sanders, R., Bustin, S., Huggett, J., Mason, D., 2018. Improving the standardization of mRNA measurement by RT-qPCR. *Biomol. Detect. Quantif.* 15 (February), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2018.03.001> [Internet].
- Shu, B., Wu, K.H., Emery, S., Villanueva, J., Johnson, R., Guthrie, E., et al., 2011. Design and performance of the CDC real-time reverse transcriptase PCR Swine Flu Panel for detection of 2009 A (H1N1) pandemic influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 49 (July (7)), 2614–2619. <https://doi.org/10.1128/JCM.02636-10>.
- Suslov, O., Steindler, D.A., 2005. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Res.* 33 (20), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gni176>.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M.W., Kubista, M., 2015. How good is a PCR efficiency estimate: recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol. Detect. Quantif.* 3, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>.
- Vynck, M., Trypsteen, W., Thas, O., Vandekerckhove, L., De Spiegelaere, W., 2016. The future of digital polymerase chain reaction in virology. *Mol. Diagn. Ther.* 20 (October (5)), 437–447. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0224-1>. PMID: 27351921.
- Wang, B., Russell, M.L., Fonseca, K., et al., 2017. Predictors of influenza a molecular viral shedding in Hutterite communities. *Influenza Other Respir. Viruses* 11 (3), 254–262. <https://doi.org/10.1111/irv.12448>.
- Warkad, S.D., Nimse, S.B., Song, K.S., Kim, T., 2018. HCV detection, discrimination, and genotyping technologies. *Sensors (Basel)* 18 (October (10)), 3423. <https://doi.org/10.3390/s18103423>.
- Watzinger, F., Suda, M., Preuner, S., Baumgartner, R., Ebner, K., Baskova, L., et al., 2004. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J. Clin. Microbiol.* 42 (November (11)), 5189–5198. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5189-5198.2004>.
- Whelan, J.A., Russell, N.B., Whelan, M.A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods* 278 (July (1–2)), 261–269. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(03\)00223-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(03)00223-0). PMID: 12957413.
- WHO – World Health Organization, 2009. Influenza (Seasonal). CDC Protocol of Realtime RT-PCR for Influenza A (H1N1) Characterization of Swine Influenza (version 2009) General Comments. Control, 1 (April). [Cited 2021 March 2]. Available from: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/collaborating_centres/list/en/index.html.
- WHO – World Health Organization, 2010. Sex, Gender and Influenza in Achieving Gender Equality and Health Equity. Available from: Institutional Repository for Information Sharing <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44401>.
- WHO – World Health Organization, 2013. Consolidated ARV Guidelines 2013, Vol. 14. World Health Organization, Geneva.
- WHO – World Health Organization. Influenza (Seasonal). Geneva: WHO; 6 November 2018. [Cited 2021 March 2]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
- Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39 (July (1)), 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>. PMID: 16060372.

5.2 ARTIGO 2 - Submetido ao *Journal of Medical Virology*

INFLUENZA A INFECTIONS – Predictors of disease severity

Pereira LA^a, Lapinski BA^a, Debur MC^b, Santos JS^c, Petterle RR^d, Nogueira MB^c,

Vidal LRR^c, De Almeida SM^c, Raboni SM^{*c,e}

^aGraduate Program in Internal Medicine and Health Science, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

^bPublic Health Laboratory, Curitiba, Brazil.

^cVirology Laboratory, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

^dSector of Health Sciences, Medical School, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

^eInfectious Diseases Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil.

*Corresponding author:

Sonia Mara Raboni.

Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Federal University of Paraná

Rua Padre Camargo, nº 280, Alto da Glória, Curitiba, Paraná, Zip Code 82060-240 –

Brasil. E-mail: sraboni@ufpr.br

ABSTRACT

Background

Influenza affects approximately 10% of the world population annually. It is associated with high morbidity and mortality rates due to its propensity to progress to severe acute respiratory infection, leading 10–40% of the hospitalized patients to need intensive care. Characterizing the multifactorial predictors of poor prognosis is essential for the development of strategies against this disease. Thus, this study aimed to identify predictors of disease severity in FluA-infected patients to create a prognostic score.

Methods

A retrospective cross-sectional study was conducted with 142 FluA-infected out-and-inpatients treated at a tertiary hospital between 2010 and 2018. The viral subtypes, hemagglutinin mutations, viral load, IL-28B SNPs, and clinical risk factors were evaluated according to the patient's ICU admission.

Results

Multivariate analysis identified the following risk factors for disease severity: neuromuscular diseases (OR= 7.02; 95% CI= 1.18- 41.75; $p= 0.032$), cardiovascular diseases (OR= 5.47; 95% CI = 1.96-15.27; $p= 0.001$), subtype (H1N1)pdm09 infection (OR= 2.29; 95% CI= 1.02-5.15; $p= 0.046$), and viral load (OR= 1.43; 95% CI= 1.09-1.88; $p= 0.009$). The prognosis score for ICU admission proposed based on these severity predictors presented ROC curve AUC= 0.812 ($p< 0.0001$).

Conclusions

Our results identified viral and host predictors of disease severity in FluA-infected patients, which made up a prognostic score that presented a high performance in predicting the FluA patients' ICU admission and better results than viral load value alone. However, its implementation in health services needs to be validated in a broader population.

KEYWORDS: viral load, IL-28B, SNP, ICU, SARI, score, index, influenza A.

1 BACKGROUND

Influenza is an acute respiratory viral infection with high transmissibility and global distribution, which presents seasonal epidemics and affects all social and age groups, accounting for approximately 10% of the worldwide population annually. It has a substantial burden on the economy due to direct spending on health services during the epidemic.¹

Influenza can present from upper respiratory tract infection (influenza-like illness) to lower respiratory tract involvement, leading to severe acute respiratory infection (SARI). Patients with chronic diseases, children, the elderly, and pregnant women are at risk of developing severe illness. However, in 20% of patients who progress to SARI, no clinical risk factors are found, suggesting that other viral and host factors may be associated with this outcome.²

The innate immune response is an essential feature of the host and affects the progression of the disease. It has efficient mechanisms, such as cytokine induction, to control the most diverse types of viral infections.³ Among them, lambda interferon (IFN- λ), whose family includes interleukin-28B (IL-28B) or interferon- λ 3 (IFN- λ 3), are important cytokines in response to viral infection, especially in FluA infection.⁴ IL-28B expression can be affected by single nucleotide polymorphisms (SNPs). Several SNPs have been studied, but their role in respiratory viral infections remains unclear. In contrast, studies in hepatitis C infections have already established the SNPs rs12979860 and rs8099917 as genetic factors related to spontaneous viral shedding and response to ribavirin.⁵

Viral load (VL) and mutations can also be considered possible predictors of disease severity. But although it is well established that mutations can confer an increase in viral fitness, virulence, transmission and, therefore, be associated with worse outcomes⁶, the role of FluA VL in the infection progress is still unclear, requiring further investigation on this infection pathogenesis.^{7,8}

Vaccines and neuraminidase inhibitor antivirals are the tools to reduce influenza impact. Immunization is available to high-risk groups, and its effectiveness depends on vaccine coverage. The use of antivirals within 48h of symptom onset has been recommended; but due to the high cost that limited access to this drug, specific treatment is usually not frequent.⁹

In this scenario, identifying novel human and viral biomarkers for disease severity would aid in tracking the cases and identifying patients at an increased risk for complication, thereby leading to the optimization of clinical management practices. Thus, this study aimed to identify predictors of disease severity in FluA-infected patients to create a prognostic score.

2 METHODS

2.1 Study Design

A retrospective cross-sectional study was conducted at Complexo Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), a tertiary academic hospital in Paraná, southern Brazil. The Institutional Ethics Committee board approved the study (N#18714013.4.0000.0096).

2.2 Samples

The study was carried out with convenience samples consisting of nasopharyngeal swabs or nasopharyngeal aspirates (NPA) collected from the outpatients and inpatients admitted at CHC-UFPR between January 2010 and December 2018. These clinical specimens were submitted for routine diagnostic testing and were positive for FluA infection. During the study, 4,406 samples were investigated to detect respiratory virus at the Virology Laboratory of CHC-UFPR, out of which 153 (3.3%) samples were positive for FluA and 142 were included. Samples with insufficient volume or those that were not stored correctly were excluded. Clinical and epidemiological data were reviewed from the medical records of the patients.

2.3 Detection and molecular characterization of FluA

Viral RNA was extracted from 200µL of clinical samples using the QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. FluA subtyping was performed by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) with SuperScript™ III Platinum™ One-Step RT-qPCR Kit (Invitrogen, CA, USA) following the WHO protocol (2017).¹⁰

To evaluate mutations in regions with potential receptor binding properties in virus (H1N1)pdm09, the partial segment of hemagglutinin (aa122-247 according to H1 numbering, after signal peptide) was sequenced using primers described by Chen *et al.* (2010)¹¹ using

BigDye Terminator V. 3.1 Kit Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). The consensus sequences were obtained using the DNASTAR Lasergene SeqMan program v.7.0 (DNASTAR, Inc., Madison, WI), aligned with Clustal W in the Mega v.7.0 platform. Clinical association analyses were performed only for mutations that appeared in more than three (H1N1)pdm09 patients.

2.4 Influenza A viral load

The absolute quantification of VL was performed using RT-qPCR as previously described by Pereira *et al.* (2021)¹². The VL in copies/reaction (quantity) was converted into copies/mL using the formula: [Quantity/RT-qPCR volume reaction] * [sample elution volume (μL)/sample volume in the extraction (mL)]. Data were presented as Log₁₀ copies/mL.

2.5 IL-28B genotyping

To assess the host's genetic factors associated with the immune response to FluA infection, the IL-28B SNP rs12979860 and rs8099917 were characterized by RT-qPCR using the SNP TaqMan™ Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's specifications. In rs12979860, the allele C > T and in rs8099917, the allele T > G. The allele and genotype frequencies were calculated using HARDY-WEINBERG equilibrium.

2.6 Definitions

Outpatients: Individuals presenting influenza-like illnesses during outpatient appointments. Inpatients: SARI patients from primary and secondary care services. Risk factors: underlying diseases, pregnancy, age (≤ 2 and >60 years old), immunosuppression (HIV infection patients, hematological neoplasms, and use of systemic corticosteroids). Outcomes: primary: intensive care unit (ICU) admission; secondary: length of stay, mechanical ventilation support, and death. Predictors: virus subtype, hemagglutinin mutations, viral load, gender, ethnic group, IL-28B SNPs, and risk factors. Potential confounders: hematopoietic stem cell transplantation. Modifier

effects: immunosuppression, co-infections, antiviral treatment, and sampling >48h of admission. Biases: lack of uniformity in the sample type and time of illness until collecting samples and data obtained from medical records.

2.7 Data analysis

Statistical analyses were performed using the R version 3.6.1. Univariate analysis was performed using Fisher's exact and chi-square tests for categorical variables and the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis rank sum tests with Tukey's multiple post hoc comparisons for continuous variables, as appropriate. Spearman's correlation coefficient was used to assess the correlation between VL and length of stay, VL, and collection time since hospital admission. A stepwise linear regression model was used to determine whether the VL was associated with patient features. Multivariate logistic regression analysis was performed to assess covariates related to infection by (H1N1)pdm09 and ICU admission. Adjusted OR (aOR) was calculated using the multivariate model with stepwise selection of variables, with a cut-off point of $p < 0.2$. Pearson and residual deviance analyses were performed to test the fit model. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was performed to assess the performance of the patients' VL and the prognostic disease severity score in identifying probable cases of admission to the ICU. The score was obtained from the aOR values of each disease severity predictor divided by a correction factor (the lowest aOR value among the predictors). All statistical tests were two-sided, with significance set at $p < 0.05$. A confidence interval (CI) of 95% was used to adjust the estimates.

3 RESULTS

Of the 153 samples available, 142 (93%) were included in this study – 84 (59%) nasopharyngeal aspirates and 58(415) nasopharyngeal swabs. The study steps are outlined in the flowchart below (Fig. 1).

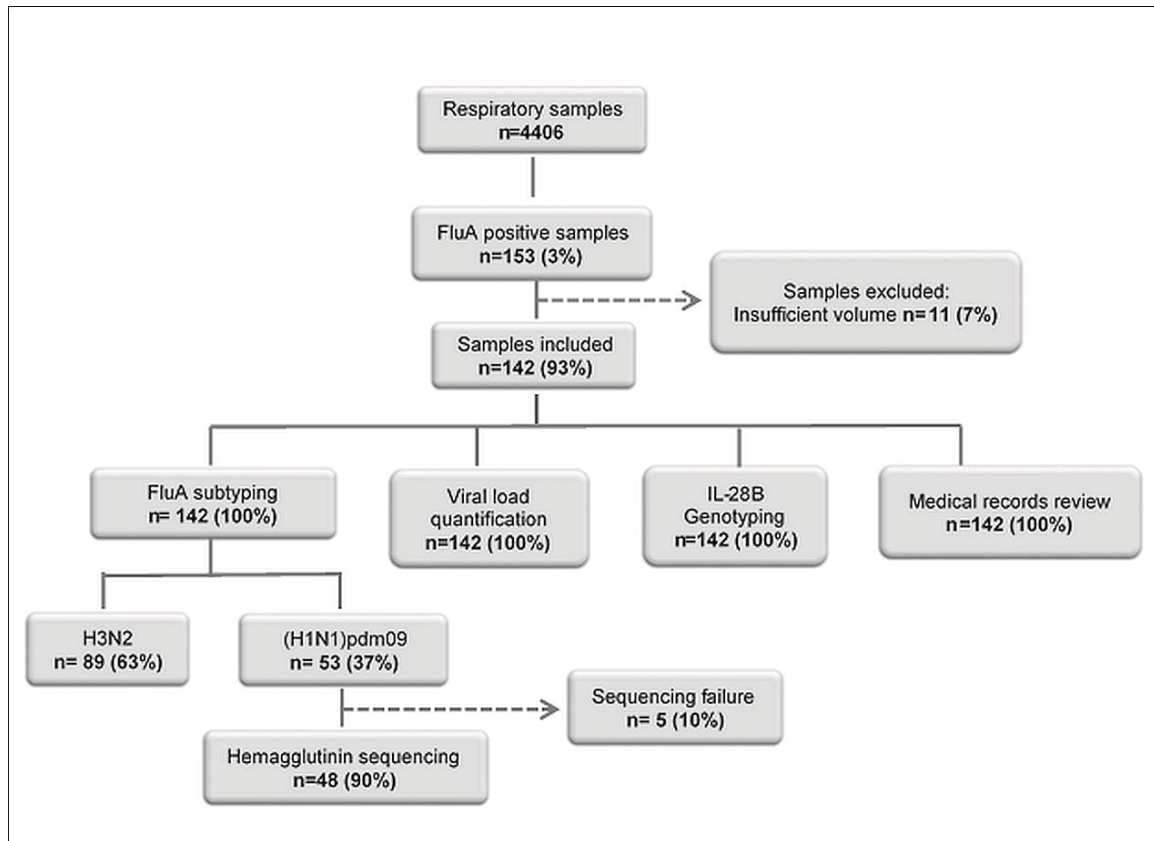


Figure 1. Flow diagram of the study.

3.1 Clinical-epidemiological characteristics

The patients included were young adults (median 22.8y; IQR 3.4 - 53.5), and 123 (87%) had risk factors, of which 98 (80%) were comorbidities, with hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and heart disease the most prominent. Antiviral therapy was performed in 77% (n=89) of SARIs and 63% (n=90) of the total cases, of which 85% (n=76) started antiviral therapy after 48 hours of admission to the hospital. SARI patients represented 82% (n= 116) of the population, of which 59 (51%) needed ICU, and 9 (15%) died. The univariate analyses showed that the patient profile in the ICU was aged over 60 years ($p = 0.004$), with cardiovascular diseases ($p = 0.001$) and HSCT ($p = 0.001$). In addition, the median length of stay was 3.5 times higher among patients enrolled in the ICU (median 11d; IQR 5.5-20; $p < 0.0001$) (Table 1).

Table 1. Clinical-epidemiological characteristics of influenza A patients admitted to the CHC-UFPR between 2010 and 2018.

	Total n= 142 (%)	^a ICU n= 59 (42)	Not ICU n= 83 (58)	P value
Clinical samples n (%)				
Nasopharyngeal aspirates	84 (59)	34 (58)	50 (60)	0.863
Nasopharyngeal swabs	58 (41)	25 (42)	33 (40)	
Median time between hospitalization and sample collection - days	2 (2-4)	2 (2-4)	2 (1-4)	0.635
Viral coinfection n (%)	16 (11)	8 (13)	8 (10)	0.592
Ethnic group n (%)				
Caucasian	124 (87)	52 (88)	72 (87)	0.496
African descendant	18 (13)	7 (12)	11 (13)	
Gender – male n (%)	69 (49)	31 (52)	38 (46)	0.496
Age median - years (IQR)	23 (3.4-53.5)	38 (3.4 - 64)	21 (3.2-41)	0.197
Age group n (%)				
≤2 y	30 (21)	11 (19)	19 (23)	0.004
2-18 y	29 (20)	15 (25)	14 (17)	
19-60y	56 (40)	15 (25)	41 (49)	
> 60y	27 (19)	18 (31)	9 (11)	
Risks factors n (%)				
Presenting any risk factors	123 (87)	52 (88)	71 (85)	0.804
Age group risk	58 (41)	30 (51)	28 (34)	0.059
Pregnancy	6 (4)	0	6 (7)	0.041
Presenting underlying diseases	98 (69)	42 (71)	56 (67)	0.714
Underlying diseases n (%)				
Asthma	21 (30)	12 (20)	9 (11)	0.211
Autoimmune	3 (2)	0	3 (4)	0.266
Cardiac disorders	29 (20)	19 (32)	10 (12)	0.001
Diabetes	6 (4)	5 (8)	1 (1)	0.082
^b HSCT	34 (24)	5 (8)	29 (35)	<0.001
Neuromuscular disorders	8 (6)	6 (8)	2 (1)	0.067
Other lung disorders	20 (14)	13 (22)	7 (8)	0.445
Influenza vaccine n (%)				
Yes	34 (24)	16 (27)	18 (22)	-

Not described	108 (76)	43 (73)	65 (78)	
Symptoms n (%)				
Cough	113 (80)	51 (86)	62 (75)	0.096
Dyspnea	94 (66)	51 (86)	43 (52)	< 0.0001
Fever	123 (87)	54 (91)	69 (83)	0.211
Myalgia	27 (19)	12 (20)	15 (18)	0.829
Sore throat	27 (19)	14 (24)	13 (15)	0.283
^c SpO2 ≤ 95%	95 (67)	54 (91)	41 (49)	< 0.0001
Oseltamivir therapy n (%)	90 (63)	40 (68)	50 (60)	0.382
Antiviral until 48hs of hospital admission n (%)	76 (85)	36 (61)	40 (48)	1.000
Disease severity n (%)				
ILI	26 (18)	0	26 (31)	< 0.0001
SARI	116 (82)	59 (100)	57 (68)	
Respiratory support n (%)	85 (60)	52 (88)	33 (40)	< 0.0001
None	57 (40)	7 (12)	50 (60)	
Oxygen supplementation	49 (35)	16 (27)	33 (40)	< 0.0001
Mechanical ventilation	36 (25)	36 (61)	0	
Median length of stay - days (IQR)	7 (2.0 – 13.5)	11 (5.5-20)	3 (0.0- 7.5)	< 0.0001
Death n (%)	9 (6)	9 (15)	0	-

^aICU – intensive care unit; ^bHSCT – hematopoietic stem cells transplantation; ^cSpO2 ≤ 95% – oxygen saturation ≤ 95%; ^dILI – influenza like illness; ^eSARI – severe acute respiratory infections.

Influenza A viral load

Patients with worse outcomes had higher VL, admission to the ICU ($p = 0.012$) and death rates ($p = 0.040$) (Table 2).

Table 2. Influenza A viral load and disease features, CHC/UFPR, 2010-2018.

Features	Presence (Log10 copies/mL)*	Absence (Log10 copies/mL)*	<i>P</i> value
Sample collection			
Nasopharyngeal aspirate	5.7 (4.6-6.8)	4.8 (4.0-6.0)	0.040
Sampling <48 hours of admission	5.7 (4.4-6.9)	4.8 (4.0-6.0)	0.022
Outcome			

^a ICU admission	5.9 (4.4-7.0)	5.3 (4.0-6.1)	0.012
ICU stay ≤ 7 days	5.7 (4.3-6.9)	6.5 (5.1-7.7)	0.123
Death	6.7 (5.4-7.4)	5.3 (4.2-6.6)	0.040

*Viral load values are presented in median (interquartile range).

^aICU

Patients were stratified between outpatients and inpatients with or without ICU need, and the VL was significantly higher between the inpatient groups ($p = 0.033$). A weak positive correlation was also found between VL and length of stay ($r = 0.171$; $p = 0.042$) (Figure 2). In addition, an inverse proportional correlation between VL and the time elapsed between sample collection and hospital admission was found ($r = -0.299$; $p = 0.001$).

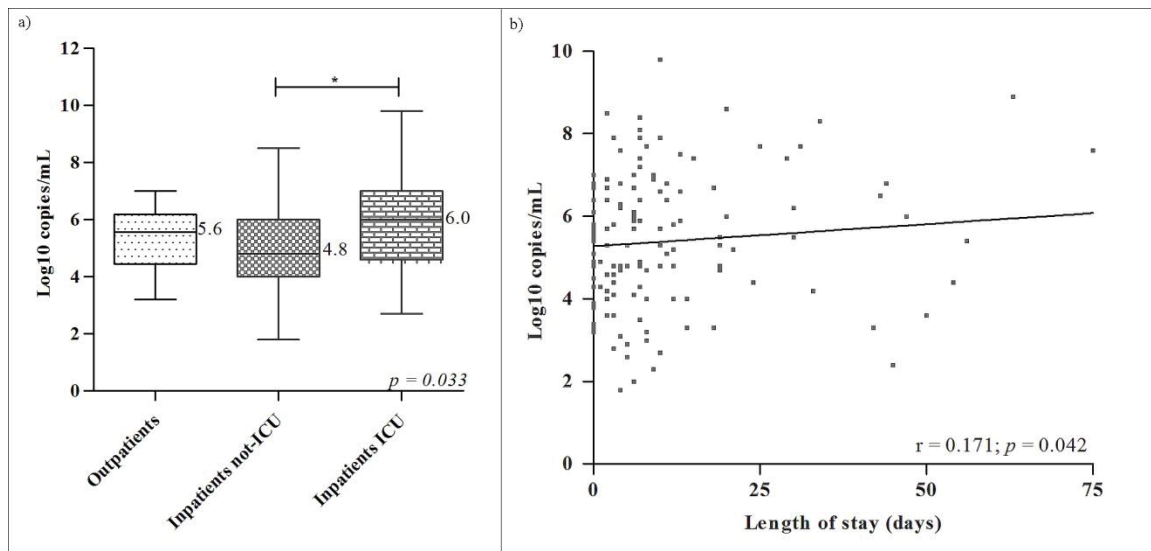


Figure 2. Viral load assessment in influenza A patients at the CHC-UFPR. a) Viral load according to disease severity; b) Spearman's correlation between the viral load and the length of hospital stay of patients.

Multiple linear regression analyses showed that progression to the ICU ($\beta = +0.63$ Log₁₀ copies/mL; 95% CI= 0.07-1.18; $p = 0.027$) was independent factor associated with VL increase, while samples collected 48 hours after admission to the hospital was associated with a VL decrease ($\beta = -0.64$ Log₁₀ copies/mL; 95% CI = -1.25 – -0.02, $p = 0.042$).

Virus subtyping

In Figure 3 we demonstrate the distribution of influenza A subtypes in the nine seasons evaluated; an alternating prevalence between (H1N1)pdm09 and H3N2 can be observed, with a higher frequency of infections by H3N2 (Figure 3).

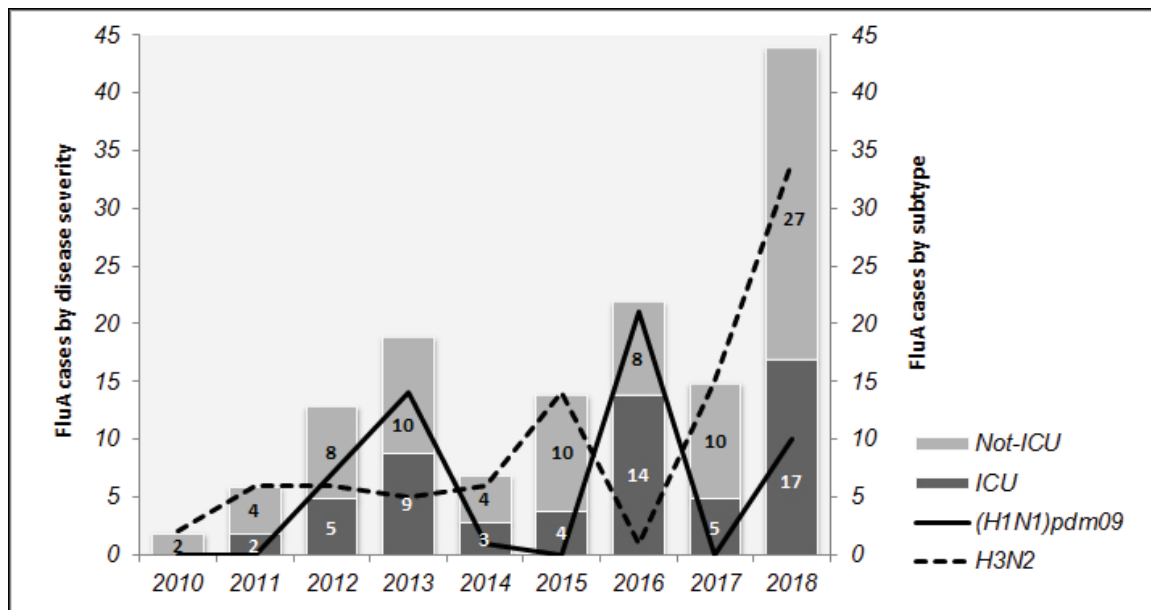


Figure 3 - Distribution of influenza A cases treated at CHC-UFPR between 2010 and 2018 according to disease severity (primary axis) and subtype (secondary axis).

Patients infected with (H1N1)pdm09 showed, in the univariate analysis, more viral co-infections ($p=0.013$), hospitalization in the ICU ($p=0.047$), and longer hospital stay ($p=0.022$), despite being associated with fewer risk factors ($p=0.046$) and higher antiviral use ($p=0.002$) (Table 3).

Table 3. Comparison of the clinical findings between H1N1(pdm09) and H3N2 influenza A subtypes.

	(H1N1)pdm09 n= 53 (37%)	H3N2 n= 89 (63%)	P value	*aOR (95% CI)	p
Risks factors n (%)	42 (79)	81 (91)	0.046		
1 risk factor	31 (58)	55 (62)		6.14 (1.68 – 22.46)	0.006
> 1 risk factor	11 (21)	26 (29)	0.137	7.70 (1.93 – 30.68)	0.004
None risk factor	11 (21)	8 (9)			
Symptoms n (%)					
Cough	49 (92)	54 (61)	0.008	11.55 (2.26 – 59.05)	0.003
Dyspnea	44 (83)	58 (65)	0.066		

Sore throat	14 (26)	13 (14)	0.160		
Viral Coinfection n (%)					
	11 (21)	5 (6)	0.013	5.79 (1.53 – 21.84)	0.010
Oseltamivir therapy n (%)					
Yes	42 (79)	47 (53)	0.002		
No	11 (21)	42 (47)			
Disease severity n (%)					
Outpatient	7 (13)	19 (21)			
Inpatient					
^a ICU admission	29 (55)	30 (34)	0.047		
Not ICU admission	17 (32)	40 (45)			
Respiratory support strategies n (%)					
None	17 (32)	40 (45)			
Oxygen supplementation	19 (36)	30 (34)	0.158		
Mechanical ventilation	17 (32)	19 (21)			
Length of stay, days (Median, IQR)	9 (3.3 - 19)	5 (1.5 - 11)	0.022	0.98 (0.96 – 0.99)	0.048

The data included in the table are composed of variables with a $p > 0.2$ in the univariate analyses.

^aICU - intensive care unit

*aOR – adjusted Odds Ratio.

Multivariate analysis showed that H3N2 infection was more likely to be present in patients with one or more risk factors (OR= 6.14; $p= 0.006$ and OR= 7.70; $p= 0.004$, respectively), without cough (OR= 11.55; $p= 0.003$), fewer viral co-infections (OR= 5.79; $p= 0.010$), and shorter hospital stay (OR= 0.98; $p= 0.048$) than H1N1(pdm09) infection.

(H1N1)pdm09 hemagglutinin sequencing

As infections by (H1N1)pdm09 were directly related to ICU admission and high length of stay, we investigated whether the presence of mutations in the hemagglutinin of this subtype would be associated with the modulation of VL and with worse outcomes. A total of 48 (92%) partial hemagglutinin segments (380bp) were sequenced. Hemagglutinin 122-247aa region sequencing revealed 16 amino acid substitutions at 15 positions - 14 mutations at the Sa, Sb, Ca1, and Ca2 antigenic sites, plus two changes at an undesignated site. (Supplementary material – Figure 1). No relationship was observed between the presence of mutation and disease severity.

IL-28B genotyping

The evaluation of IL-28B SNPs in rs12979860 showed a frequency of 28% for the major allele (C), and the frequencies of the CT and TT genotypes were 40% and 52%, respectively. In rs8099917, the major allele (T) frequency was 61%, and the frequencies of the TG and GG genotypes were 48% and 15%, respectively. There was no association between SNPs genotypes or haplotypes and VL or disease severity (Figure 4).

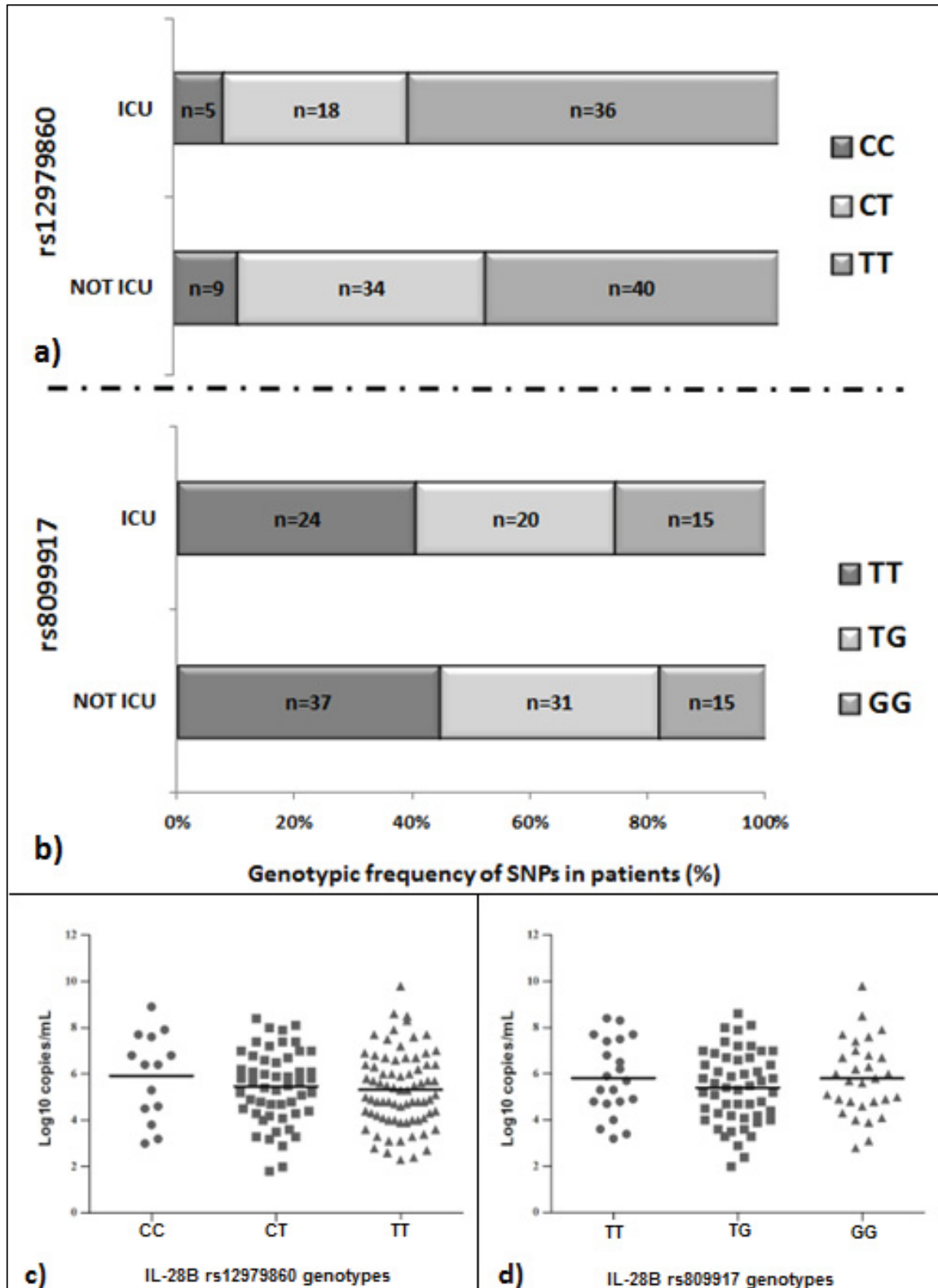


Figure 4. Evaluation of IL-28B SNPs of FluA-infected patients at CHC-UFPR: a) disease severity according to rs12979860 genotypes; b) disease severity according to rs8099917; c) genotypes VL according to rs12979860 genotype; d) VL according to rs8099917 genotypes.

Predictors of disease severity

Multivariate analysis identified (H1N1)pdm09 infection (OR= 2.29; 95% CI= 1.02-5.15; $p=0.046$), high VL (OR=1.43; 95% CI= 1.09-1.88; $p= 0.009$), cardiovascular disorders (OR= 5.47; 95% CI= 1.96-15.27; $p= 0.001$), and neuromuscular diseases (OR= 7.02; 95% CI= 1.18-41.75; $p= 0.032$) were independent factors associated with ICU admission. The presence of asthma was related to a higher frequency of invasive and non-invasive respiratory support ($p= 0.06$). Other pulmonary diseases also presented an association with ventilatory support ($p= 0.014$), and they had longer hospital stays (12d to 6d; $p= 0.012$). Among other lung diseases, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) was the most frequent ($n= 11/20$). Antiviral treatment was not associated with the primary outcome, but among patients who received treatment, it was observed an increase in the median length of stay (19d to 6.5d; $p < 0.0002$) in those who started the antiviral after 48h of admission hospital.

We sought to analyze the VL as a possible predictor of a worse prognosis. However, the ROC curve showed poor VL performance (AUC = 0.622; $p = 0.012$) and, therefore, a predictive prognostic index based on the following disease severity factors was proposed: VL greater than 6.45 Log₁₀ copies/mL (1 point), (H1N1)pdm09 infection (2 points), presence of cardiovascular diseases (4 points) and neuromuscular diseases (5 points). Since asthma was associated with increased FluA viral load in a previous study of our group²¹, it was also included in the score with the same viral load value (1 point), thus adding a total score of 13 points. The ROC index of the curve showed an AUC of 0.812 ($p < 0.0001$). The cut-off score > 3 showed 77.5% accuracy, 66.7% positive predictive value (PPV) and 91.1% negative predictive value (NPV). For scores > 4 , 72.5% accuracy, 73% PPV and 86.5% NPV (PPV and NPV values were calculated for a prevalence of 20%) (Figure 5).

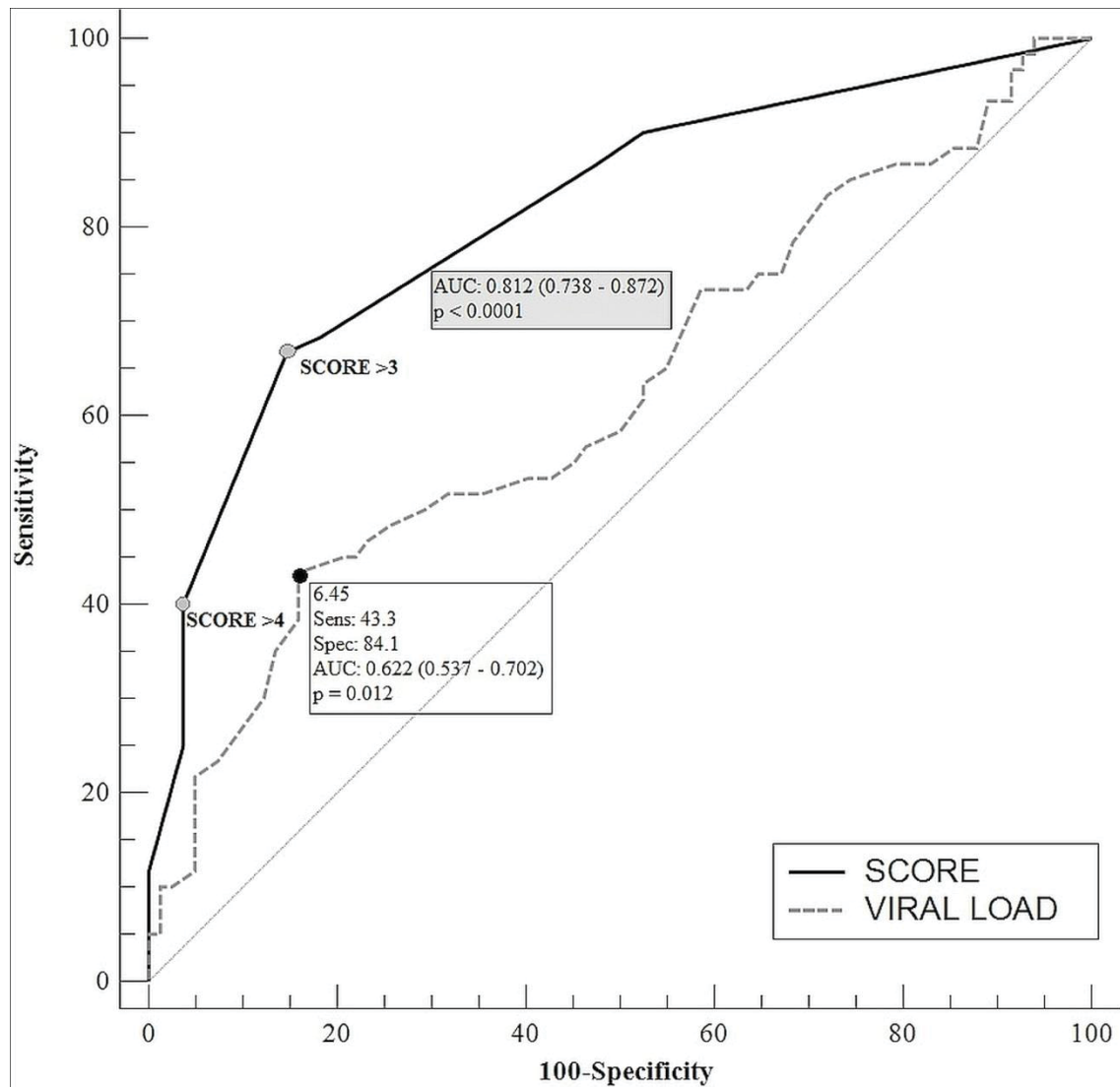


Figure 5. Comparison between the ROC curves for FluA infection predictive prognosis using the viral load (dotted line) and score (solid line) as severity predictors.

SCORE > 3 – Sensibility: 66.67; Specificity: 85.37. SCORE > 4 – Sensibility: 40.00; Specificity: 96.34.

4 DISCUSSION

In this cohort of FluA infected patients, we identified the VL, (H1N1)pdm09 infection, cardiac, neuromuscular, and lung diseases as factors associated with admission to ICU, more extended hospital stay, need of respiratory support, or death. Reducing vaccine coverage and restricting the early use of antivirals contribute to the increase in severe cases of influenza, so knowing the risk factors associated with SARI is essential for implementing early interventions to reduce the burden of disease.¹³

The characterization of the participants reflected the profile of a tertiary hospital; most were hospitalized for SARI and present comorbidities, constituting a risk group for severe outcomes. The low median age group and the high rate of ICU admission were at odds with the main profile of severe cases of influenza in non-pandemic periods.¹⁴ However, despite being a cohort of young patients with broad and rapid antiviral access, the considerable lethality of patients admitted to the ICU is in line with what has already been described.¹⁵

A positive correlation between VL and the length of hospital stay was observed, corroborating the findings of previous studies.^{16,17} Regarding the association of high VL and disease severity, Lee *et al.* (2013)¹⁸ described an increase of 1.5 Log₁₀ copies/mL in hospitalized patients ($p=0.003$), and Li *et al.* (2010)¹⁷ showed a higher VL in patients with SARI ($p<0.001$). In addition, a direct relationship between VL and death was also found, similar to Giannella *et al.* (2010)¹⁹. However, in contrast to our results, they did not observe any difference in the initial quantification of VL, but in the clearance profile ($p=0.040$).

A higher VL has also been demonstrated in infections by (H1N1)pdm09, another predictor of the disease severity.¹⁹ These patients had more ICU admission and longer hospital stay, despite having fewer risk factors and frequent oseltamivir use. This same profile was reported by Delgado-Sanz *et al.* (2020)²⁰ and other studies that evaluated the impact of this strain in the worse outcomes even after controlling for age differences and comorbidities.²¹

Moreover, Segaloff *et al.* (2019)²² reported that (H1N1)pdm09 affects young adults more severely, and Caini *et al.* (2018)²³ suggested that subtype knowledge might be an important tool for clinicians because (H1N1)pdm09 patients should be monitored more closely due to the increased risk of unfavorable outcomes, probably due to mutations accumulated by this subtype.⁷

In each seasonal period, influenza viruses accumulate mutations in their genome that can occur in essential epitopes, such as viral hemagglutinin, originating new strains. Such mutations can also result in increased viral fitness, greater virulence, and escape of immune responses impacting the outcome.²⁴ Although our samples have amino acid exchanges with previously reported viral antigenic properties modulating characteristics, no mutations were related to disease severity in this analysis.²⁵

As viral features have different impacts on the FluA infection outcomes according to the affected population, other factors, such as the genetic, clinical, and demographic factors must be evaluated.

Concerning immune response, the characterization of IL-28 SNPs has been extensively investigated in several viral infections. This gene is responsible for IFN- λ production that has antiviral activity, and can be found in pulmonary and hepatic tissues during viral infection. The occurrence of IL-28 SNPs can directly affect the production of interleukins, generating an imbalance in their functions, promoting a worsening of FluA infections.²⁶ In this study, we observed that major allele was found less frequently in our infected patients than in global population,^{27,28} Americans,^{27,28} and individuals with other viral infections, such as RSV.²⁹ For rs12979860 region, this difference is more prominent (28% vs. 58-64%), while for rs8099917 region the difference found was 61% vs. 72-87%. Giamberardino *et al.* (2021)³⁰ also observed a lower frequency of these alleles in a pediatric population hospitalized for RSV in the same region as our study. However, when comparing the SNP rs12979860 major allele results in our

cohort, the difference in the frequency is more significant than in pediatric population with RSV (28% vs. 45%). It may suggest that patients without major alleles in these SNPs are more susceptible to influenza A infection.

Regarding pathogenesis, our study found no association between the disease evolution and the presence of these SNPs in FluA infected patients, similar to other studies, such as those carried out in children with bronchiolitis caused by RSV³¹, and adults infected with FluA.³² However, other SNPs in IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IFITM1, and IFITM3 are involved in the viral infection pathogenesis.³³ Further investigations are necessary to understand better the role of interleukins and their SNPs in the severity of FluA infection.

High-risk groups for severe disease have been extensively reported³⁴. However, in this cohort, cardiovascular disorders ($p= 0.001$) and neuromuscular diseases ($p= 0.032$) were only the independent factors associated with higher odds of being admitted to the ICU. These findings aligned with other systematic reviews, which point to both diseases and obesity as factors associated with worse outcome.^{14,35}

Previously, our group reported an association between asthma and a VL increase (+0.89 Log10 copies/mL).¹² Although it was not shown an association with ICU admission, these groups correlated with oxygen supplementation ($p= 0.006$) and a higher length of stay ($p=0.012$). These findings agree with previous studies that asthmatics are more likely to be hospitalized for FluA infection than people without asthma; however, they do not have an increased risk of ICU admission or death. In contrast, COPD is associated as a risk factor for poor outcomes.^{14,36}

The early use of antiviral was associated with a shorter hospital stay but did not impact severity ($p < 0.0002$), as previously described.³⁷ In the same way, no association was observed between antiviral therapy's worst outcomes or reduced VL. Antiviral use in influenza has presented discrepant results, and more studies need to evaluate its impact.

Several screening scores of patients with bacterial community-acquired pneumonia (CAP) are available, such as PSI, CURB-65, and SMRT-CO, but they are ineffective in viral pneumonia.³⁸ Then, recent studies are focusing in evaluate other severity scores in viral CAP's (qSOFA, SIRS score)^{39,40} or in developing a derived index of severity disease predictors.^{41,42} However, the few proposed scores have shown a good correlation only in patients with advanced stages of the disease. Further, their applicability is exclusive to ICU patients and, therefore, they use variables that focus on severe physiological dysfunction.

In this study, we propose a prognostic disease severity score that performs well in identifying patients at high risk for severe disease. The scoring parameters are mostly easy to assess, being a potential tool in both primary and tertiary services, which could resolve late-onset antivirals, improve patient management through optimized triage, and achieve better clinical outcomes due information set for better decision making and early interventions, making up a potential tool in both tertiary and primary services. At the same time its implementation in public health programs is still challenging, depending on the availability of specific tests in primary care and the quantification of VL in tertiary services. Furthermore, the score proved to be a potential tool in a cohort mostly of patients with comorbidities and SARI FluA, therefore, it needs to be validated in a broader population^{43,44}

This study has some limitations: (i) the inclusion of samples was carried out for convenience, which resulted in samples mostly from patients with SARI; (ii) most SARI patients tend to undergo late hospitalization in a tertiary hospital, as it receives patients referred by the basic health units or emergency services, which delays the referral of patients; (iii) difficulty in standardizing the date of sample collection after admission (time between the onset of symptoms and sample collection). Previous studies^{17,18} also reported a negative correlation between collection time after symptom onset or hospitalization and VL; (iv) although previous analyses did not show significant differences in the VL between the swabs and NPA,⁴⁵ the use

of two types of samples in the quantification of VL showed some limitations, which may lead to the underestimation of the results of viral quantification. This fundamental criterion must be normalized for VL's future inclusion in the diagnostic procedures; (v) data on obesity were not mentioned in the medical records.⁴⁶ However, these findings reinforce the importance of looking for factors associated with a higher risk of adverse outcomes in individuals infected with influenza, allowing for faster intervention and, consequently, protection for these patients. In conclusion, our results identified viral and host predictors of disease severity in FluA-infected patients, which made up a prognostic score that presented a high performance in predicting ICU admission of flu patients treated at a tertiary hospital and better results than viral load value alone. However, its implementation in health services needs to be validated in influenza patients with more heterogeneous clinical and epidemiologic findings.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FUNDINGS

This work was supported by Fundação Araucária. Project number: 059/2017.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

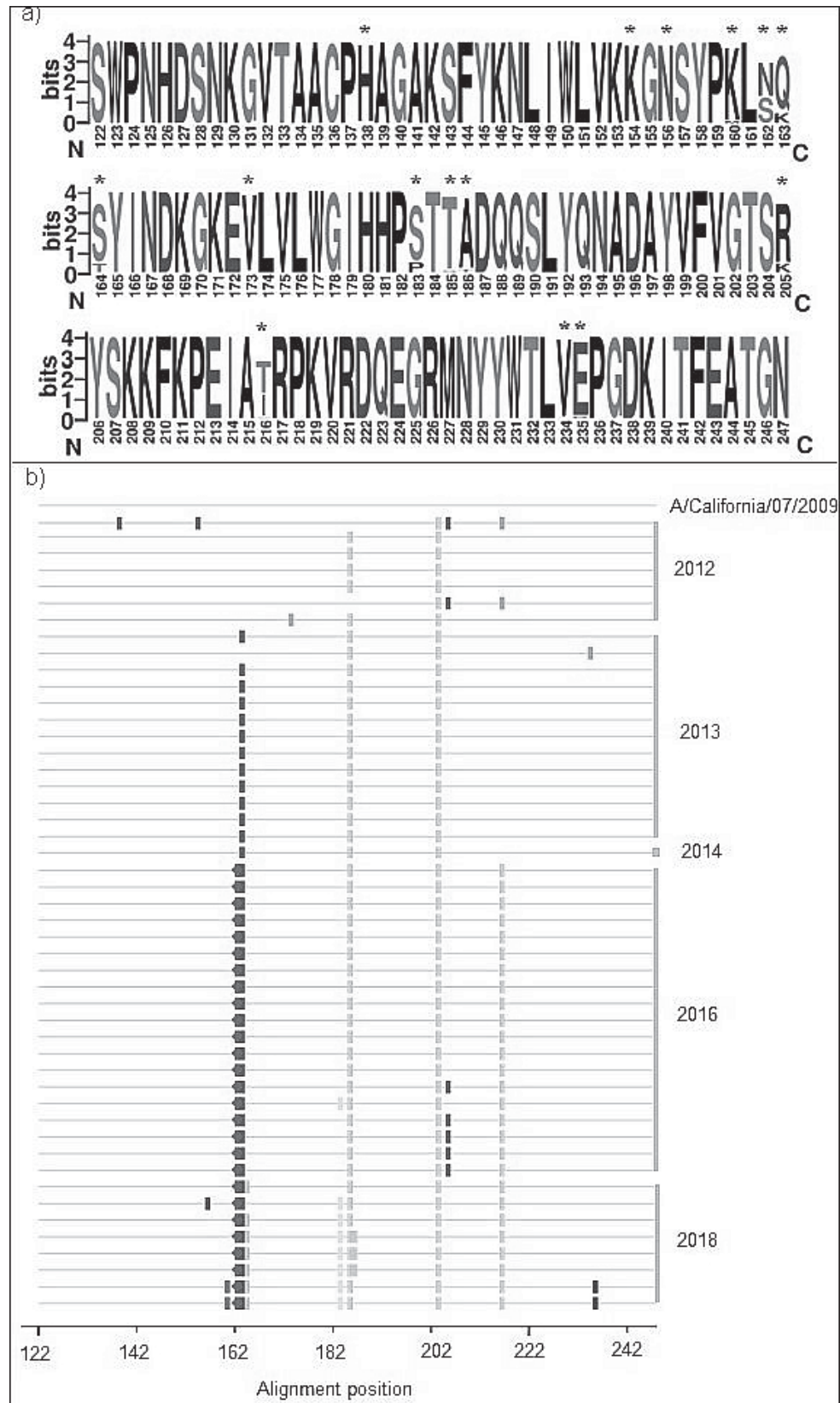


Figure 1 - The hemagglutinin region 122-247aa amino acid alignment in (H1N1)pdm09 patients: a) Amino acid sequence - *non-silent mutations (WebLogo 3 - <http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>); b) Amino acid alignment by year (Highlighter).

REFERENCES

1. WHO - World Health Organization. Influenza. A manual for estimating disease burden associated with seasonal influenza. 2015, revision 2018 [Cited 2021 March 2]. Available from: https://www.who.int/influenza/resources/publications/WHO_CDC_Supplement_Influenza_Burden_HAS.pdf?ua=1.
2. Syedbash M, Egli A. Interferon Lambda: Modulating immunity in infectious diseases. *Front Immunol*. 2017;8(FEB). doi:10.3389/fimmu.2017.00119.
3. Jewell NA, Cline T, Mertz SE, et al. Lambda Interferon Is the Predominant Interferon Induced by Influenza A Virus Infection In Vivo. *J Virol*. 2010;84(21):11515-11522. doi:10.1128/jvi.01703-09.
4. Hemann EA, Gale M, Savan R. Interferon lambda genetics and biology in regulation of viral control. *Front Immunol*. 2017;8(DEC). doi:10.3389/fimmu.2017.01707.
5. Jiménez-Sousa MA, Fernández-Rodríguez A, Guzmán-Fulgencio M, García-Álvarez M, Resino S. Meta-analysis: Implications of interleukin-28B polymorphisms in spontaneous and treatment-related clearance for patients with hepatitis C. *BMC Med*. 2013;11(1):6. doi:10.1186/1741-7015-11-6.
6. Goka EA, Vallety PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. *Arch Virol*. 2014;159(12):3167-3183. doi:10.1007/s00705-014-2179-z.
7. Clark TW, Ewings S, Medina Mjo, et al. Viral load is strongly associated with length of stay in adults hospitalised with viral acute respiratory illness. *J Infect*. 2016;73(6):598-606. doi:10.1016/j.jinf.2016.09.001.
8. Noh JY, Song JY, Hwang SY, et al. Viral load dynamics in adult patients with A(H1N1)pdm09 influenza. *Epidemiol Infect*. 2014;142(4):753-758. doi:10.1017/S0950268813001672.
9. Centers for Disease Control and National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD). Flu Symptoms & Complications. <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm> Page last reviewed: August 31, 2020. Accessed October 10, 2020.
10. WHO - World Health Organization. Influenza (Seasonal). Geneva: WHO; 4th revision: July 2017. WHO information for the molecular detection of influenza viruses. [Cited 2021 March 2]. Available from: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/collaborating_centres/list/en/index.html.
11. Chen H, Wen X, To KKW, et al. Quasispecies of the D225G Substitution in the Hemagglutinin of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 Virus from Patients with Severe Disease in Hong Kong, China. *J Infect Dis*. 2010;201(10):1517-1521. doi:10.1086/652661.

12. Pereira LA, Lapinski BA, Debur MC, et al. Standardization of a high-performance RT-qPCR for viral load absolute quantification of influenza A [published online ahead of print, 2021 Dec 20]. *J Virol Methods*. 2021;301:114439. doi:10.1016/j.jviromet.2021.114439.
13. Arriola C, Garg S, Anderson EJ, et al. Influenza vaccination modifies disease severity among community-dwelling adults hospitalized with influenza. *Clin Infect Dis*. 2017;65(8):1289-1297. doi:10.1093/cid/cix468.
14. Coleman BL, Fadel SA, Fitzpatrick T, Thomas SM. Risk factors for serious outcomes associated with influenza illness in high- versus low- and middle-income countries: Systematic literature review and meta-analysis. *Influenza Other Respi Viruses*. 2018;12(1):22-29. doi:10.1111/irv.12504.
15. Lafond KE, Porter RM, Whaley MJ, et al. Global burden of influenza-associated lower respiratory tract infections and hospitalizations among adults: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2021;18(3):1-17. doi:10.1371/JOURNAL.PMED.1003550.
16. Alves VRG, Perosa AH, Luna LK de S, Cruz JS, Conte DD, Bellei N. Influenza A(H1N1)PDM09 infection and viral load analysis in patients with different clinical presentations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020;115(4):1–5. doi: 10.1590/0074-02760200009.
17. Li CC, Wang L, Eng HL, et al. Correlation of pandemic (H1N1) 2009 viral load with disease severity and prolonged viral shedding in children. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(8):1265-1272. doi:10.3201/eid1608.091918.
18. Lee N, Chan PK, Rainer TH, Hui D, Choi KW, Cockram CS. Influenza virus load in hospitalised patients. *Hong Kong Med J*. 2013;19 Suppl 4(3):15-18.
19. Giannella M, Alonso M, de Viedma DG, et al. Prolonged viral shedding in pandemic influenza A(H1N1): Clinical significance and viral load analysis in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(8):1160-1165. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03399.x.
20. Delgado-Sanz C, Mazagatos-Ateca C, Oliva J, Gherasim A, Larrauri A. Illness severity in hospitalized influenza patients by virus type and subtype, Spain, 2010-2017. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(2):220-228. doi:10.3201/eid2602.181732.
21. Kalil AC, Thomas PG. Influenza virus-related critical illness: pathophysiology and epidemiology. *Crit Care*. 2019 Jul 19;23(1):258. doi: 10.1186/s13054-019-2539-x.
22. Segaloff H, Melidou A, Adlhoch C, Pereyaslov D, et al. WHO European Region and the European Influenza Surveillance Network. Co-circulation of influenza A(H1N1)pdm09 and influenza A(H3N2) viruses, World Health Organization (WHO) European Region, October 2018 to February 2019. doi:07/1560-7917.ES.2019.24.9.1900125.
23. Caini S, Kroneman M, Wiegers T, El Guerche-Séblain C, Paget J. Clinical characteristics and severity of influenza infections by virus type, subtype, and lineage: A systematic literature review. *Influenza Other Respi Viruses*. 2018;12(6):780-792. doi:10.1111/irv.12575.

24. Ketklao S, Boonarkart C, Phakaratsakul S, Auewarakul P, Suptawiwat O. Responses to the Sb epitope contributed to antigenic drift of the influenza A 2009 H1N1 virus. *Arch Virol.* 2020;165(11):2503-2512. doi:10.1007/s00705-020-04758-5.
25. Koel BF, Mögling R, Chutinimitkul S, et al. Identification of Amino Acid Substitutions Supporting Antigenic Change of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses. *J Virol.* 2015;89(7):3763-3775. doi:10.1128/jvi.02962-14.
26. Egli A, Santer DM, O'Shea D, Tyrrell DL, Houghton M. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerg Microbes Infect.* 2014;3(May):1-12. doi:10.1038/emi.2014.51.
27. ENSEMBL.ORG. Available in:
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39247647-39248647;v=rs12979860;vdb=variation;vf=204115207 Accessed in: Dec 11th 2021.
28. ENSEMBL.ORG. Available in:
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39252025-39253025;v=rs8099917;vdb=variation;vf=203199634 Accessed in: Dec 11th 2021.
29. Scagnolari C, Midulla F, Riva E, et al. Evaluation of interleukin 28B single nucleotide polymorphisms in infants suffering from bronchiolitis. *Virus Res.* 2012;165(2):236-240. doi:10.1016/j.virusres.2012.02.018.
30. Giamberardino HIG, Raboni SM, Pacheco APO, Pereira LA, Genelhoud G. Respiratory syncytial virus: outcomes and genetic susceptibility of a cohort of pediatric patients, 2021; in press.
31. Astudillo P, Angulo J, Pino K, et al. Correlation between female sex, IL28B genotype, and the clinical severity of bronchiolitis in pediatric patients. *Pediatr Res.* 2020;87(4):785-795. doi:10.1038/s41390-019-0623-1.
32. Keshavarz M, Namdari H, Farahmand M, Mehrbod P, Mokhtari-Azad T, Rezaei F. Association of polymorphisms in inflammatory cytokines encoding genes with severe cases of influenza A/H1N1 and B in an Iranian population. *Virol J.* 2019; 16(1):1-10. doi:10.1186/s12985-019-1187-8.
33. Mettelman RC, Thomas PG. Human Susceptibility to Influenza Infection and Severe Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2021 May 3;11(5):a038711. doi: 10.1101/cshperspect.a038711. PMID: 31964647; PMCID: PMC8091954.
34. World Health Organization. Influenza (seasonal) Geneva, 2014 [updated 2014, Mar; cited 2014]. Fact Sheet #211:[Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>].
35. Mertz D, Kim TH, Johnstone J, et al. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: Systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2013;347(7923):1-15. doi:10.1136/bmj.f5061.

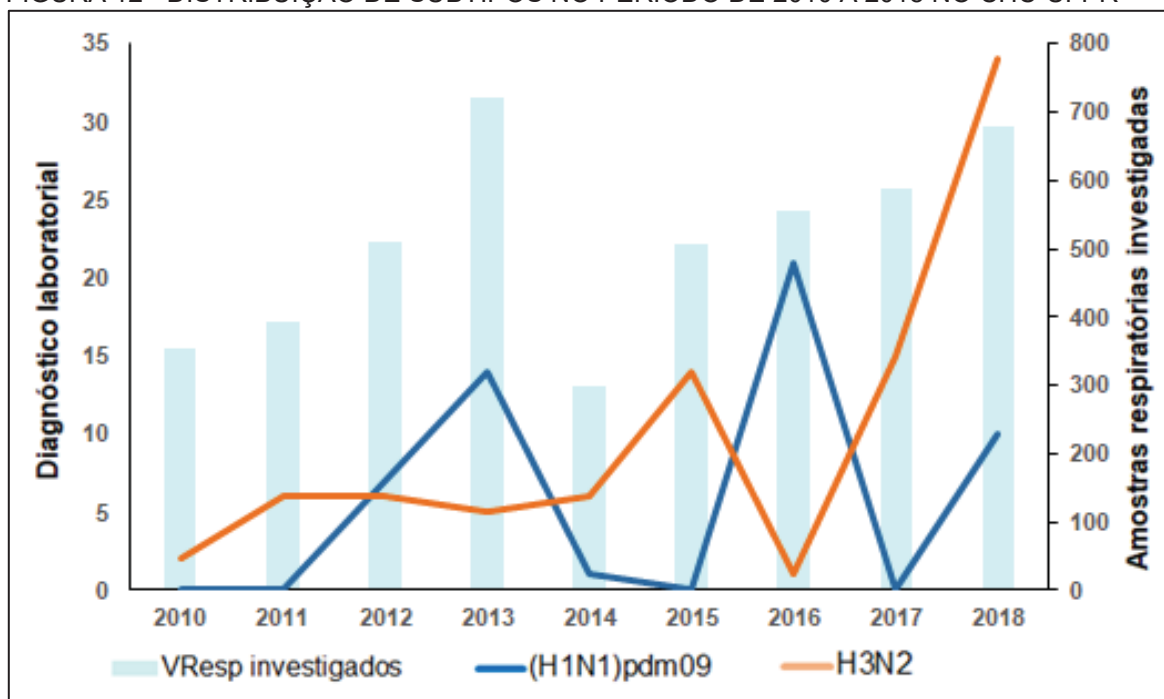
36. Veerapandian R, Snyder JD, Samarasinghe AE. Influenza in asthmatics: For better or for worse? *Front Immunol.* 2018;9(AUG):1-15. doi:10.3389/fimmu.2018.01843.
37. Venkatesan S, Myles PR, Bolton KJ, et al. Neuraminidase Inhibitors and Hospital Length of Stay: A Meta-analysis of Individual Participant Data to Determine Treatment Effectiveness Among Patients Hospitalized With Nonfatal 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Infection. *J Infect Dis.* 2020;221(3):356-366. doi:10.1093/infdis/jiz152.
38. Mulrennan S, Tempone SS, Ling IT, et al. Pandemic influenza (H1N1) 2009 pneumonia: CURB-65 score for predicting severity and nasopharyngeal sampling for diagnosis are unreliable. *PLoS One.* 2010;5(9):e12849. Published 2010 Sep 21. doi:10.1371/journal.pone.0012849.
39. Yeh CC, Chen YA, Hsu CC, et al. Quick-SOFA score ≥ 2 predicts prolonged hospital stay in geriatric patients with influenza infection. *Am J Emerg Med.* 2020;38(4):780-784. doi:10.1016/j.ajem.2019.06.041.
40. Chu SE, Seak CJ, Su TH, Chaou CH, Tseng HJ, Li CH. Prognostic accuracy of SIRS criteria and qSOFA score for in-hospital mortality among influenza patients in the emergency department. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):385. Published 2020 May 29. doi:10.1186/s12879-020-05102-7.
41. Dugas AF, Hsieh YH, LoVecchio F, et al. Derivation and Validation of a Clinical Decision Guideline for Influenza Testing in 4 US Emergency Departments. *Clin Infect Dis.* 2020;70(1):49-58. doi:10.1093/cid/ciz171.
42. Chen L, Han X, Li YL, Zhang C, Xing X. FluA-p score: a novel prediction rule for mortality in influenza A-related pneumonia patients. *Respir Res.* 2020;21(1):109. Published 2020 May 8. doi:10.1186/s12931-020-01379-z.
43. Egilmezer E, Walker GJ, Bakthavathsalam P, et al. Systematic review of the impact of point-of-care testing for influenza on the outcomes of patients with acute respiratory tract infection. *Rev Med Virol.* 2018;28(5):e1995. doi:10.1002/rmv.1995.
44. Clark TW, Beard KR, Brendish NJ, et al. Clinical impact of a routine, molecular, point-of-care, test-and-treat strategy for influenza in adults admitted to hospital (FluPOC): a multicentre, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2021;9(4):419-429. doi:10.1016/S2213-2600(20)30469-0.
45. Chan KH, Peiris JSM, Lim W, Nicholls JM, Chiu SS. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children. *J Clin Virol.* 2008;42(1):65-9. doi.org / 10.1016/j.jcv.2007.12.003.
46. Zhao X, Gang X, He G, et al. Obesity Increases the Severity and Mortality of Influenza and COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11(December). doi:10.3389/fendo.2020.595109.

6 RESULTADOS COMPLEMENTARES

Alguns resultados não foram apresentados como figura, devido a formatação exigida da revista, porém eles foram discutidos no artigo 2.

A subtipagem FluA demonstrou prevalência alternada entre (H1N1) pdm09 e H3N2 nas nove estações avaliadas e maior frequência de infecções por H3N2 (FIGURA 12).

FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DE SUBTIPOS NO PERÍODO DE 2010 A 2018 NO CHC-UFPR

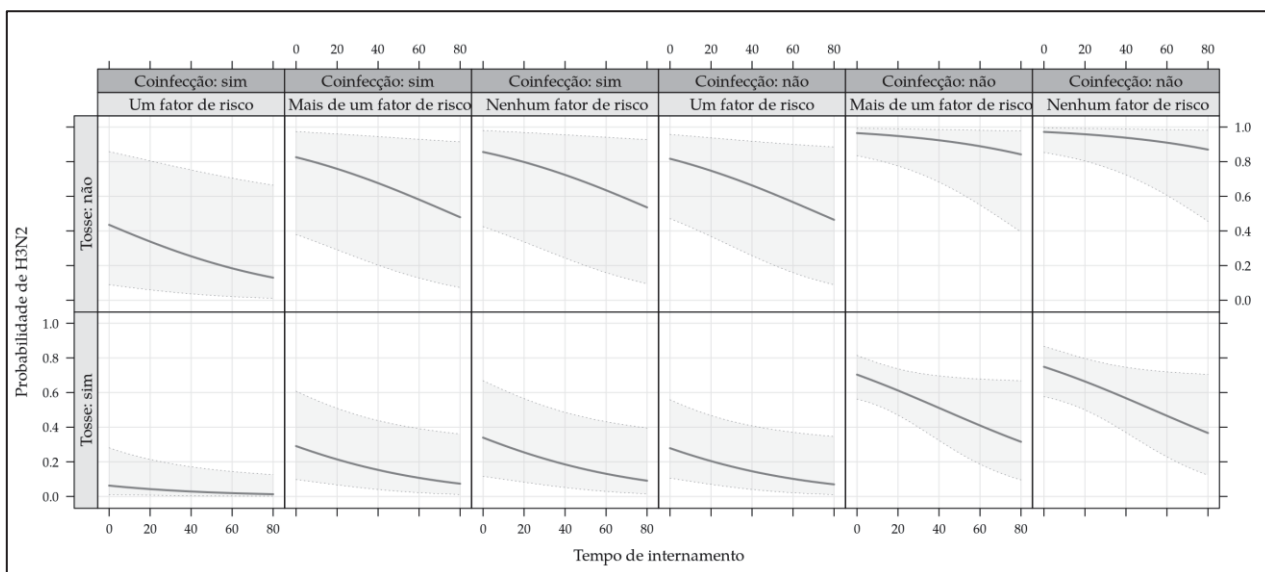


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Em azul claro número total de amostras investigadas para Vírus Respiratórios.

A análise multivariada mostrou que a infecção pelo H3N2 era mais provável de estar presente em pacientes com um ou mais fatores de risco ($OR = 6,14$; $p = 0,006$ e $OR = 7,70$; $p = 0,004$, respectivamente), sem tosse ($OR = 11,55$; $p = 0,003$), menos coinfeções virais ($OR = 5,79$; $p = 0,010$) e menor tempo de internamento ($OR = 0,98$; $p = 0,048$) (FIGURA 13).

FIGURA 13 - ANÁLISE MULTIVARIADA DOS PREDITORES RELACIONADOS AOS SUBTIPOS DE INFECÇÃO FLUA

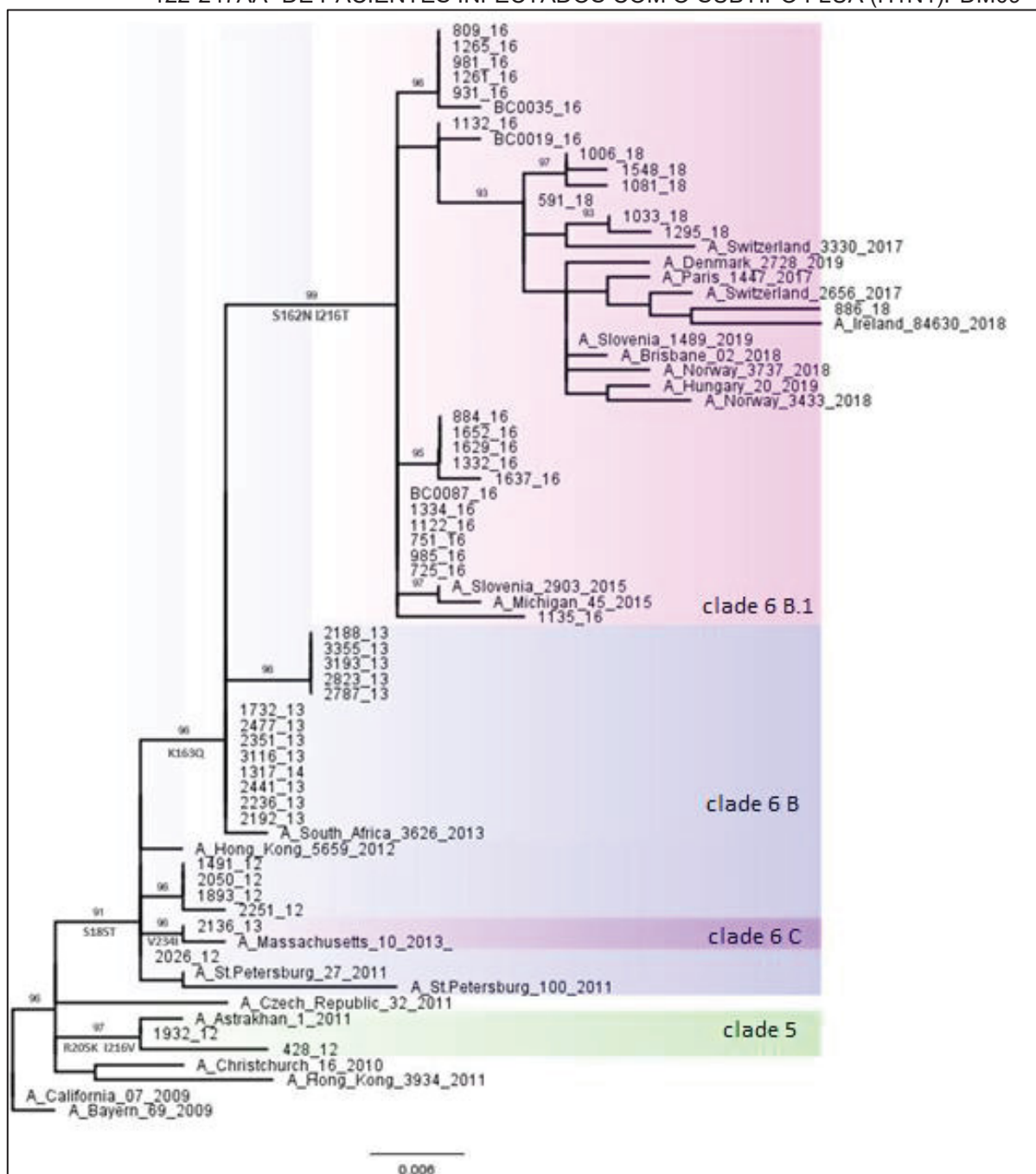


FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Análise multivariada da infecção pelo subtipo H3N2.

Os segmentos parciais da hemaglutinina (380 bp) de 48 (92%) das amostras foram sequenciadas. Devido ao tamanho dos segmentos, os suportes encontrados sugerem uma classificação nos clados 5 (1932_12 e 428_12), 6C (2136_13) e os demais no clado 6, com a maioria em 6B e 6B.1 (FIGURA 14). No entanto, nenhuma relação foi observada com a gravidade da doença.

FIGURA 14 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DA REGIÃO PARCIAL DO GENE DA HEMAGLUTININA - 122-247AA- DE PACIENTES INFECTADOS COM O SUBTIPO FLUA (H1N1)PDM09



FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: A árvore filogenética foi reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança, com bootstrap ultrarrápido (UFBoot) 1.000 repetições, teste SH-aLRT (-aLRT 1000) e modelo de melhor ajuste: HKY + F + G4 escolhido de acordo com o BIC. As amostras foram alinhadas com as sequências de referência de 2009-2018 do banco de dados EpiFlu (<https://www.gisaid.org>). Apenas os valores de bootstrap de a-LRT > 80% foram mostrados na árvore filogenética.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na primeira parte deste estudo realizamos a padronização de um ensaio para quantificação absoluta da CV para os dois subtipos de FluA humano (H1N1)pdm09 e H3N2, por RT-qPCR. Foi desenvolvido um padrão de curva estável, inesgotável e barato para a aplicação no diagnóstico da infecção por FluA, na prática clínica e no desenvolvimento de novos tratamentos. A aplicabilidade desta metodologia está no fato de que, similar a outras infecções virais, a carga viral é muito útil no manejo clínico, porém, nas infecções por influenza, as poucas metodologias padronizadas não se baseiam na quantificação absoluta, seja pela escassez de padrões comerciais ou pelo alto custo e instabilidade dos padrões adotados. Tais restrições interferem na avaliação e correlação da carga viral com a evolução clínica do paciente, o que restringe sua aplicação como ferramenta na rotina de cuidados de pessoas infectadas com influenza. Apesar da padronização apresentar limitação quanto à indisponibilidade de comparação com um teste padrão-ouro, a RT-qPCR padronizada apresentou ampla faixa dinâmica e alta sensibilidade e especificidade. O limite de detecção obtido permite sua aplicação desde a fase inicial da infecção. A variabilidade mínima intra- e inter-ensaio demonstrada garante a repetibilidade e suporta sua reprodutibilidade em todas as concentrações em diferentes diagnósticos e instalações de pesquisa. Além disso, em todos os parâmetros, os coeficientes de variabilidade foram <5%, indicando a natureza homogênea e robusta dos resultados.

Na segunda parte do estudo, fatores associados com a gravidade de doença foram avaliados em uma coorte com mais de 100 pacientes infectados com influenza A. Um aumento de CV foi observado em pacientes infectados por (H1N1)pdm09 – subtipo descrito com maior potencial de virulência – pacientes com maior tempo de internação, admissão em UTI e maior mortalidade. Estes resultados sugeriram a CV como um biomarcador, com potencial para avaliação de gravidade. No entanto, devido à dinâmica multifatorial na evolução do quadro clínico em infecções por vírus respiratórios, a CV não se mostrou como o único biomarcador na avaliação da gravidade, mas um dentre as características virais e do hospedeiro.

A avaliação do impacto da infecção por subtipo (H1N1)pdm09 na gravidade de doença corroborou os achados prévios de que este subtipo esteja associado com piores desfechos. Os pacientes infectados (H1N1)pdm09 apresentaram maior tempo de hospitalização e maior admissão em UTI, apesar de serem uma população com

menos fatores de risco e com maior prescrição de antiviral. Além da CV, as mutações no gene da hemaglutinina foram avaliadas como fatores com potencial atuação na virulência, mas ao contrário do observado na carga viral, as mutações encontradas não foram relacionadas à gravidade.

A avaliação dos fatores clínicos relacionados à gravidade não corroborou a caracterização de grupos de risco previamente estabelecida (idades susceptíveis, imunossuprimidos, ou quaisquer outras condições que possam comprometer o sistema imune). Desses, apenas pacientes acima de 60 anos e os grupos de doenças cardiovasculares e neuromusculares apresentaram associação com admissão em UTI, e o grupos de doenças pulmonares apresentaram maior tempo de hospitalização e maior uso de suporte ventilatório.

Uma vez que os grupos de risco para evolução para SRAG foram definidos sob a perspectiva da fragilidade imunológica ou exarcebação de doença após resposta inflamatória, realizou-se avaliação molecular para detectar SNP que podem impactar na expressão da citocina IL-28B, que foi intrinsecamente relacionada a outras infecções virais. No entanto, ao contrário do descrito previamente para as infecções por HCV ou CMV, não conseguimos associar os genótipos das SNP da IL-28B com características de proteção ou susceptibilidade. Entretanto, em vista de propor biomarcadores para gravidade de doença, uma gama de citocinas ainda podem ser avaliadas.

Além de avaliar fatores virais e do hospedeiro, ainda pode-se observar como o manejo clínico impacta na evolução da doença, principalmente o início tardio do antiviral. Quando avaliado o uso de antiviral não foi observada nenhuma associação com melhor desfecho, no entanto verificou-se que o início de antiviral após 48hs, relacionou-se com maior tempo de internação. Estes resultados destacam a importância da administração do antiviral já na atenção primária e, em vista do número de pessoas contempladas nos grupos de risco, deve-se buscar preditores de gravidade para triagem mais acurada desses pacientes.

A avaliação dos multifatores envolvidos com gravidade de doença, proporcionou uma visão ampliada e crítica que resultou em propostas de estratégias que podem ser melhoradas ou ferramentas que podem ser implantadas, como por exemplo, a inclusão da carga viral como rotina laboratorial, a identificação precoce do subtipo, a proposição de um índice de prognóstico baseado em informações

laboratoriais e clínicas, a necessidade do início mais precoce do antiviral e a necessidade de melhorar a qualidade do registro das informações dos pacientes (vacina, índice de massa corporal, data de sintomas, entre outros).

Outra meta é realizar a coleta seriada conforme a proposta original do projeto, três coletas sequenciais de amostras respiratórias dos pacientes hospitalizados com SRAG por FluA: 1ª coleta até 48h do início dos sintomas, 2ª após 48h e 3ª após 72h. Não foi possível realizar esse modelo de coleta seriada no presente estudo, pois a maioria dos internamentos no CHC-UFPR são em estágio tardio da doença - característica de hospital terciário. Para que seja possível realizar esse método de avaliação, faz-se necessário um tempo maior de inclusão de pacientes possibilitando triar aqueles em fase inicial de infecção.

A partir dos resultados obtidos, a perspectiva é de que as investigações sejam ampliadas, buscando minimizar os vieses enfrentados em um hospital terciário: busca de informação clínica em prontuário, falta de informação de início de sintomas, tempo de hospitalização após início de infecção e a dificuldade de padronização de tipo e data de coleta de amostra a ser quantificada, para que o impacto da utilização desses biomarcadores na prática clínica sejam validados como fatores prognósticos da infecção por FluA em pacientes hospitalizados.

8 CONCLUSÕES

No presente estudo foi descrito um ensaio acurado, preciso, eficiente, com larga faixa dinâmica, limites de detecção e quantificação compatíveis com todos estágios de infecção, baseado em uma quantificação absoluta que utiliza um padrão estável, inesgotável, acessível e de baixo custo, o que torna a quantificação de carga viral uma ferramenta viável para inclusão na rotina laboratorial diagnóstica.

A população do estudo caracterizou-se por adultos jovens, com comorbidades, hospitalizados por SRAG e significativa evolução para UTI. Observou-se a co-circulação dos subtipos com alternância de prevalência durante as 9 temporadas.

O aumento da carga viral foi associado a pacientes que apresentaram febre, asma e com maior evolução para UTI;

Houve maior frequência de infecções por H3N2, porém o subtipo (H1N1)pdm09 foi associado com maior gravidade de doença. Apesar dos pacientes infectados por (H1N1)pdm09 apresentarem menos fatores de risco e maior utilização de terapia antiviral, foi observada um maior tempo de hospitalização.

Observou-se uma associação das mutações identificadas no subtipo (H1N1)pdm09 com variação de carga viral, porém nenhuma delas foi associada com gravidade de doença;

Em relação aos SNP da IL28B foi observada uma grande inserção dos alelos mutantes na população estudada, mas nenhuma associação de proteção ou suscetibilidade em relação aos desfechos avaliados foram encontrados.

Dentre os fatores virais, imunológicos e clínicos avaliados, foram associados como preditores de prognóstico de gravidade de doença: infecções pelo (H1N1)pdm09, aumento de carga viral, pacientes com doenças cardiovasculares e neuromusculares.

Nossos resultados identificaram tanto preditores virais quanto do hospedeiro relacionados com a gravidade da doença em pacientes infectados com FluA, diante disso um escore prognóstico, apresentando um alto desempenho em prever a admissão de pacientes com FluA na UTI foi proposto. No entanto, para a sua implementação nos serviços de saúde há necessidade de uma validação em uma população mais ampla.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. (Ed.). Elsevier, 2015. Acesso em novembro, 2019.
- ADAM, D. C.; SCOTCH, M.; MACINTYRE, C. R. Phylodynamics of influenza A/H1N1pdm09 in India reveals circulation patterns and increased selection for clade 6b residues and other high mortality mutants. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 20–27, 2019.
- ADAMI, E. A. **Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)**. 32 f. Dissertação (Mestre em biotecnologia) – Instituto Butantã, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2017.
- ALONSO, W. J.; VIBOUD, C.; SIMONSEN, L.; *et al.* Seasonality of influenza in Brazil: A traveling wave from the amazon to the subtropics. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, n. 12, p. 1434–1442, 2007.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. Farm Bras 6ª edição. 1 e 2:60–9, 72–85, 2019.
- AUTON, A.; ABECASIS, G.R.; ALTSHULER, D.M.; DURBIN, R.M.; BENTLEY, D.R.; *et al.* A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 68–74, 2015.
- BADAR, N.; SALMAN, M.; AAMIR, U. B.; *et al.* Evolutionary analysis of influenza A(H1N1)pdm09 during the pandemic and post-pandemic period in Pakistan. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 3, p. 407–413, 2020.
- BALDANTI, F.; CAMPANINI, G.; PIRALLA, A.; *et al.* Severe outcome of influenza A/H1N1/09v infection associated with 222G/N polymorphisms in the haemagglutinin: A multicentre study. **Clinical Microbiology and Infection**, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. v. 17, n. 8, p. 1166–1179, 2011.
- BAÑOS-LARA, M. D. R.; HARVEY, L.; MENDOZA, A.; *et al.* Impact and Regulation of Lambda Interferon Response in Human Metapneumovirus Infection. **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 730–742, 2015.
- BARDE, P. V.; SAHU, M.; SHUKLA, M. K.; *et al.* The high frequency of non-aspartic acid residues at HA222 in influenza A(H1N1) 2009 pandemic viruses is associated

with mortality during the upsurge of 2015: A molecular and epidemiological study from central India. **Epidemiology and Infection**, V. 145, N. 13, P. 2656–2665, 2017.

BEIRIGO, A. P. T.; PEREIRA, I. S.; SILVA, P. C. L. Influenza A (H1N1): revisão bibliográfica. **SaBios**, v.12, n.2, p.53-67, 2017.

BELLEI, N.; MELCHIOR, T. B. H1N1: pandemia e perspectiva atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 611–617, 2011.

BELONGIA, E. A.; MCLEAN, H. Q. Influenza Vaccine Effectiveness: Defining the H3N2 Problem. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 10, p. 1817–1823, 2019.

BOIVIN, G.; CÔTÉ, S.; DÉRY, P.; DE SERRES, G.; BERGERON, M. G. Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of Influenza and Human Respiratory Syncytial Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 45–51, 2004.

BONT, L. Why Is RSV Different From Other Viruses? **Journal of Medical Virology**, v. 85, p. 933–934, 2013.

BOUVIER, N.M; PALESE, P. The Biology of Influenza Viruses. **Vaccine**, v. 12, n. 4, p. 49–53, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**. Volume único, Brasília, 812 p., Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil, 2014. BRASIL.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2016**. Acesso em: 01 de jun. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3ª. ed. 740 p. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Acesso em: 10 de fev. 2020.

BRAVO D, SOLANO C, GIMÉNEZ E, REMIGIA MJ, CORRALES I, AMAT P, N. D. Effect of the IL28B Rs12979860 C/T Polymorphism on the Incidence and Features of Active Cytomegalovirus Infection in Allogeneic Stem Cell Transplant Patients. **Journal of Medical Virology**, v. 86, p. 838–844, 2014.

BUSTIN, S. A. .; BENES, V. .; A., J.; *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

BYARUGABA, D. K.; ERIMA, B.; MILLARD, M.; *et al.* Whole-genome analysis of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in Uganda from 2009 to 2011. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 10, n. 6, p. 486–492, 2016.

BYRD-LEOTIS, L.; CUMMINGS, R. D.; STEINHAEUER, D. A. The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1541, p. 1–22, 2017.

CAI, M.; ZHONG, R.; QIN, C.; *et al.* The R251K Substitution in Viral Protein PB2 Increases Viral Replication and Pathogenicity of Eurasian Avian-like H1N1 Swine Influenza Viruses. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2020.

CATON, A. J.; BROWNLEE, G. G.; YEWDELL, J. W.; GERHARD, W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). **Cell**, v. 31, n. 2 PART 1, p. 417–427, 1982.

CDC, NATIONAL CENTER FOR IMMUNIZATION AND RESPIRATORY DISEASES (NCIRD). Information on Collection of Respiratory Specimens for Influenza Virus Testing. Última revisão: 20 de fevereiro de 2018.

<https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/info-collection.htm>. Acesso em: 27 de out. 2020.

CDC, NATIONAL CENTER FOR IMMUNIZATION AND RESPIRATORY DISEASES (NCIRD). **Flu Symptoms & Complications**.

<https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>. Última revisão: 27 de setembro de 2018. Acesso em: 13 de nov. 2019.

CDC, NATIONAL CENTER FOR IMMUNIZATION AND RESPIRATORY DISEASES (NCIRD). **Types of Influenza Viruses**. 2019. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>>. Acesso em: 27 de out. 2020.

CDC, NATIONAL CENTER FOR IMMUNIZATION AND RESPIRATORY DISEASES (NCIRD). **How the Flu Virus Can Change: “Drift” and “Shift”**. Última revisão: 15 de outubro de 2019. <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>. Acesso em: 27 de out. 2020.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Influenza Signs and Symptoms and the Role of Laboratory Diagnostics**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labrolesprocedures.htm>.
Última revisão: 31 de agosto de 2020. Acesso em: 27 de out. 2020.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Influenza Antiviral Drug Resistance**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/treatment/antiviralresistance.htm>
Última revisão: 03 de setembro de 2020b. Acesso em: 27 de out. 2020.

CLSI/NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach. Approved guideline. **CLSI document EP6-A**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2003.

CLSI/NCCLS. Protocols for determination for limits of detection and limits of quantitation. Approved guideline. **CLSI document EP17-A**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2004.

CHAN, P. K. S. Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. SUPPL. 2, 2002.

CHADHA, M. S.; POTDAR, V. A.; SAHA, S.; et al. Dynamics of influenza seasonality at sub-regional levels in India and implications for vaccination timing. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–14, 2015.

CHEN, H.; WEN, X.; TO, K. K. W.; et al. Quasispecies of the D225G Substitution in the Hemagglutinin of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 Virus from Patients with Severe Disease in Hong Kong, China. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 10, p. 1517–1521, 2010.

CHENG, A. C.; HOLMES, M.; IRVING, L. B.; et al. Influenza Vaccine Effectiveness against Hospitalisation with Confirmed Influenza in the 2010-11 Seasons: A Test-negative Observational Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2013.

CHESHER, D. Evaluating assay precision. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 29 Suppl 1, n. i, p. S23-6, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852851> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2556577>.

CHEUNG, T. K. W.; POON, L. L. M. Biology of influenza a virus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1102, p. 1–25, 2007.

CHRISTMAN, M. C.; KEDWAIL, A.; XU, J.; DONIS, R. O.; LU, G. Pandemic (H1N1) 2009 virus revisited: An evolutionary retrospective. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 803–811, 2011.

CLARK, T. W.; EWINGS, S.; MEDINA, M. JO; *et al.* Viral load is strongly associated with length of stay in adults hospitalised with viral acute respiratory illness. **Journal of Infection**, v. 73, n. 6, p. 598–606, 2016.

CLOHISEY, S.; BAILLIE, J. K. Host susceptibility to severe influenza A virus infection. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 1–11, 2019.

COSTA, L. M. C. DA; MERCHAN-HAMANN, E. Pandemias de influenza e a estrutura sanitária brasileira: breve histórico e caracterização dos cenários. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 1, p. 11–25, 2016.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Influenza. **Lancet**, v.354, p. 1277-1282, 1999.

DREXLER, J. F.; HELMER, A.; H. KIRBERG, H.; *et al.* Poor Clinical Sensitivity of Rapid Antigen Test for Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. 1662–1664, 2009.

DOMINGUES, C. M. A. S.; TEIXEIRA, A. M. DA S. Coberturas vacinais e doenças imunopreveníveis no Brasil no período 1982-2012: avanços e desafios do Programa Nacional de Imunizações. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 1, p. 9–27, 2013.

DUH, D.; BLA, B. Single mutation in the matrix gene of seasonal influenza A viruses critically affects the performance of diagnostic molecular assay. **Journal of Virological Methods**, v. 251, n. October 2017, p. 43–45, 2018.

EGLI, A.; SANTER, D. M.; O'SHEA, D.; TYRRELL, D. L.; HOUGHTON, M. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. **Emerging Microbes and Infections**, v. 3, n. May, p. 1–12, 2014a.

EGLI, A.; SANTER, D. M.; O'SHEA, D.; *et al.* IL-28B is a Key Regulator of B- and T-Cell Vaccine Responses against Influenza. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, 2014b.

EGLI, A.; MANDAL, J.; SCHUMANN, D. M.; *et al.* IFN λ 3/4 locus polymorphisms and IFN λ 3 circulating levels are associated with COPD severity and outcomes. **BMC Pulmonary Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.

ENSEMBL.ORG. Disponível em:

<http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39247647-39248647;v=rs12979860;vdb=variation;vf=204115207> Acesso em: 11 de jun. 2021.

ENSEMBL.ORG. Disponível em:

<http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39252025-39253025;v=rs8099917;vdb=variation;vf=203199634>> Acesso em: 11 de jun. 2021.

EISFELD, A. J.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. At the centre: Influenza A virus ribonucleoproteins. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 28–41, 2015.

EISFELD, A. J.; KAWAOKA, Y. Calculated risk: A new single-nucleotide polymorphism linked to severe influenza disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 8, p. 911–912, 2017.

ESPOSITO, S.; MOLTENI, C. G.; ZAMPIERO, A.; *et al.* Role of polymorphisms of toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP) and FCGR2A genes in malaria susceptibility and severity in Burundian children. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2012.

FDA - US Food and Drug Administration. Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology. Rockville, MD: Nov 1996.

FERRARIS, O.; LINA, B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. **Journal of Clinical Virology**, v. 41, p. 13-19, 2008.

FERREIRA, J. L. DE P.; BORBOREMA, S. E. T.; BRÍGIDO, L. F. DE M.; *et al.* Sequence analysis of the 2009 pandemic influenza A H1N1 virus haemagglutinin gene from 2009-2010 Brazilian clinical samples. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 613–616, 2011.

FICA, A.; SOTOMAYOR, V.; FASCE, R.; *et al.* Severe acute respiratory infections (SARI) from influenza in adult patients in Chile: The experience of a sentinel hospital. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 43, p. 1–11, 2019.

FINEBERG, H. V. Pandemic Preparedness and Response — Lessons from the H1N1 Influenza of 2009. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 14, p. 1335–1342, 2014.

FREITAS, F. T. DE M. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000-2010. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 62–68, 2013.

GAMBARYAN, A. S.; MATROSOVICH, T. Y.; BORAVLEVA, E. Y.; *et al.* Receptor-binding properties of influenza viruses isolated from gulls. **Virology**, v. 522, n. July, p. 37–45, 2018.

GAMBOTTO, A.; BARRATT-BOYES, S. M.; DE JONG, M. D.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. **The Lancet**, v. 371, n. 9622, p. 1464–1475, 2008.

GAO, R.; CAO, B.; HU, Y.; *et al.* Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 20, p. 1888–1897, 2013.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2017(GBD). Influenza Collaborators. Mortality, morbidity, and hospitalisations due to influenza lower respiratory tract infections, 2017: an analysis for the. **Lancet Respir Med** 2018. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30496-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30496-X). Acesso em: 05 de set. 2021.

GLEZEN, W. P. Emerging infections: Pandemic influenza. **Epidemiologic Reviews**, v. 18, n. 1, p. 64–76, 1996.

GODOY, P. Pandemia de gripe aviar: un nuevo desafío para la salud pública. **Gac Sanit.** v.20, n. 1, p. 4-8, 2006.

GOKA, E. A.; VALLELY, P. J.; MUTTON, K. J.; KLAPPER, P. E. Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. **Archives of Virology**, v. 159, n. 12, p. 3167–3183, 2014.

GOÑI, N.; IRIARTE, A.; COMAS, V.; *et al.* Pandemic influenza A virus codon usage revisited : biases , adaptation and implications for vaccine strain development. **Virology Journal**, v. 9, n. 263, p. 1–8, 2012.

GOTO, H.; KAWAOKA, Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 17, p. 10224–10228, 1998.

GRANADOS, A.; PECI, A.; MCGEER, A.; GUBBAY, J. B. Influenza and rhinovirus viral load and disease severity in upper respiratory tract infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 86, p. 14–19, 2017.

GREGERSEN, J. P.; SCHMITT, H. J.; TRUSHEIM, H.; BRÖKER, M. Safety of MDCK cell culture-based influenza vaccines. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 143–152, 2011.

GUBAREVA, L. V.; BESSELAAR, T. G.; DANIELS, R. S.; *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015–2016. **Antiviral Research**, v. 146, p. 12–20, 2017.

GUBAREVA, L. V.; FRY, A. M. Baloxavir and Treatment-Emergent Resistance: Public Health Insights and Next Steps. **The Journal of infectious diseases**, v. 221, n. 3, p. 337–339, 2019.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M. HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n.3, p. 307–21, 2010.

HAYASHI, T.; MACDONALD, L. A.; TAKIMOTO, T. Influenza A Virus Protein PA-X Contributes to Viral Growth and Suppression of the Host Antiviral and Immune Responses. **Journal of Virology**, v. 89, n. 12, p. 6442–6452, 2015.

HAYDEN, F. G.; SUGAYA, N.; HIROTSU, N.; *et al.* Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 10, p. 913–923, 2018.

HAYES, C. N.; IMAMURA, M.; AIKATA, H.; CHAYAMA, K. Genetics of IL28B and HCV-response to infection and treatment. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 7, p. 406–417, 2012.

HEATON, N. S.; LANGLOIS, R. A.; SACHS, D.; *et al.* Long-term survival of influenza virus infected club cells drives immunopathology. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 9, p. 1707–1714, 2014.

HEID, C. A; STEVENS, J; LIVAK, K. J. Williams, P. M. Real time quantitative PCR. **GENOME RESEARCH**, v. 6, p. 986–994, 1996.

HEROLD, S.; BECKER, C.; RIDGE, K. M.; BUDINGER, G. R. S. Influenza virus-induced lung injury: Pathogenesis and implications for treatment. **European Respiratory Journal**, v. 45, n. 5, p. 1463–1478, 2015.

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**, v. 39, n. 1, p. 134–138, 2001.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, W. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. **Biotechnology**, v. 11, p. 1026–1030, 1993.

HSIEH, Y. C.; TSAO, K. C.; HUANG, C. T.; et al. Clinical characteristics of patients with laboratory-confirmed influenza A(H1N1)pdm09 during the 2013/2014 and 2015/2016 clade 6B/6B.1/6B.2-predominant outbreaks. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

HOANG, D.T.; CHERNOMOR, O.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q.; VINH, L.S. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular biology and evolution*. **Molecular Biology and Evolution**, v.35, n.2, p.518–22, 2018.

HORBY, P.; NGUYEN, N. Y.; DUNSTAN, S. J.; BAILLIE, J. K. The role of host genetics in susceptibility to influenza: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2012.

HOM, N.; GENTLES, L. Deep Mutational Scan of the Highly Conserved Influenza A Virus M1 Matrix Protein Reveals Substantial Intrinsic. **Journal of Virology**, v. 93, n. 13, 2019.

HORBY, P.; NGUYEN, N. Y.; DUNSTAN, S. J.; KENNETH BAILLIE, J. An updated systematic review of the role of host genetics in susceptibility to influenza. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 7, n. SUPPL.2, p. 37–41, 2013.

HUANG, Q. S.; BANDARANAYAKE, D.; WOOD, T.; et al. Risk Factors and Attack Rates of Seasonal Influenza Infection: Results of the Southern Hemisphere Influenza and Vaccine Effectiveness Research and Surveillance (SHIVERS). Seroepidemiologic Cohort Study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 219, n. 3, p. 347–357, 2019.

HURT, A. C.; BESSELAAR, T. G.; DANIELS, R. S.; *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014–2015. **Antiviral Research**, v. 132, p. 178–185, 2016.

HUSSAIN, M.; GALVIN, H. D.; HAW, T. Y.; NUTSFORD, A. N.; HUSAIN, M. Drug resistance in influenza a virus: The epidemiology and management. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 121–134, 2017.

YORK, I. A.; STEVENS, J.; ALYMOVA, I. V. Influenza virus N-linked glycosylation and innate immunity. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2019.

INFLUENZA VIRUS CHARACTERISATION REPORTS. **Summary Europe, July 2021**. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/surveillance-and-disease-data/influenza-virus-characterisation>. Acesso em: 15 de agos. 2021.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV 9th Report - 2011). Virus Taxonomy: 2020 Release: The Classification and Nomenclature of Viruses. Available from: URL https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011. Acesso em: 05 de set. 2021.

ILYUSHINA, N. A.; KOMATSU, T. E.; INCE, W. L.; *et al.* Influenza A virus hemagglutinin mutations associated with use of neuraminidase inhibitors correlate with decreased inhibition by anti-influenza antibodies. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2019.

IULIANO, A. D.; ROGUSKI, K. M.; CHANG, H. H.; *et al.* Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. **The Lancet**, v. 391, n. 10127, p. 1285–1300, 2018.

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

JEWELL, N. A.; CLINE, T.; MERTZ, S. E.; *et al.* Lambda Interferon Is the Predominant Interferon Induced by Influenza A Virus Infection In Vivo. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11515–11522, 2010.

JIMÉNEZ-SOUSA, M. A.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A.; GUZMÁN-FULGENCIO, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, M.; RESINO, S. Meta-analysis: Implications of interleukin-

28B polymorphisms in spontaneous and treatment-related clearance for patients with hepatitis C. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 6, 2013.

KALLFASS, C.; LIENENKLAUS, S.; WEISS, S.; STAEHELI, P. Visualizing the Beta Interferon Response in Mice during Infection with Influenza A Viruses Expressing or Lacking Nonstructural Protein 1. **Journal of Virology**, v. 87, n. 12, p. 6925–6930, 2013.

KALYAANAMOORTHY, S.; MINH, B.Q.; WONG, T.K.F.; VON HAESELER, A.; JERMIIN, L.S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, v.14, n. 6, p. 587–9, 2017.

KANG, Y.; LIU, L.; FENG, M.; *et al.* Highly pathogenic H5N6 influenza A viruses recovered from wild birds in Guangdong, southern China, 2014-2015. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 6–11, 2017.

KEELE, B. F.; GIORGI, E. E.; SALAZAR-GONZALEZ, J. F.; *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. **PNAS**, v. 105, n. 21, 2008.

KESHAVERZ, M.; NAMDARI, H.; FARAHMAND, M.; *et al.* Association of polymorphisms in inflammatory cytokines encoding genes with severe cases of influenza A/H1N1 and B in an Iranian population. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2019.

KLINKHAMMER, J.; SCHNEPF, D.; YE, L.; *et al.* IFN- λ prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. **eLife**, v. 7, p. 1–18, 2018.

KIM, H.; WEBSTER, R.G.; WEBBY, R.J. Viral immunology. p. 174-183, 2018. <http://doi.org/10.1089/vim.2017.0141>.

KOEL, B. F.; MÖGLING, R.; CHUTINIMITKUL, S.; *et al.* Identification of Amino Acid Substitutions Supporting Antigenic Change of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses. **Journal of Virology**, v. 89, n. 7, p. 3763–3775, 2015.

KRAMMER, F.; SMITH, G. J. D.; FOUCHIER, R. A. M.; *et al.* Influenza. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–21, 2018.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

KUCHIPUDI, S. V.; NISSLY, R. H. Novel flu viruses in bats and cattle: “Pushing the envelope” of influenza infection. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 3, p. 1–10, 2018.

LAU, D.; EURICH, D. T.; MAJUMDAR, S. R.; KATZ, A.; JOHNSON, J. A. Working-age adults with diabetes experience greater susceptibility to seasonal influenza: A population-based cohort study. **Diabetologia**, v. 57, n. 4, p. 690–698, 2014.

LEE, N.; CAO, B.; KE, C.; *et al.* IFITM3, TLR3, and CD55 Gene SNPs and Cumulative Genetic Risks for Severe Outcomes in Chinese Patients with H7N9/H1N1 pdm09 Influenza. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 1, p. 97–104, 2017.

LIN, Y.; WHARTON, S. A.; WHITTAKER, L.; *et al.* The characteristics and antigenic properties of recently emerged subclade 3C . 3a and 3C . 2a human influenza A (H3N2) viruses passaged in MDCK cells. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, , n. January, p. 263–274, 2017.

LINDSLEY, W. G.; BLACHER, F. M.; BEEZHOLD, D. H.; *et al.* Viable influenza A virus in airborne particles expelled during coughs versus exhalations. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 10, n. 5, p. 404–413, 2016.

LIU, Y.; CHILDS, R. A.; MATROSOVICH, T.; *et al.* Altered Receptor Specificity and Cell Tropism of D222G Hemagglutinin Mutants Isolated from Fatal Cases of Pandemic A(H1N1) 2009 Influenza Virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 12069–12074, 2010.

LIU, D.; SHI, W.; SHI, Y.; *et al.* Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection: Phylogenetic, structural, and coalescent analyses. **The Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1926–1932, 2013.

MCAULEY, J. L.; GILBERTSON, B. P.; TRIFKOVIC, S.; BROWN, L. E.; MCAULEY, J. L. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. **Frontiers in Microbiology**], v. 10, n. January, p. 1–13, 2019.

MACHADO, B. C.; VIEIRA, H. R.; ALVES, M. R. DE M.; CARMONA, R. DE C. C. Avaliação do desempenho da PCR em tempo real para o diagnóstico de meningite por Enterovirus. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, n. 0, p. 01–06, 2016.

MANZOOR, R.; IGARASHI, M.; TAKADA, A. Influenza A Virus M2 Protein : Roles from Ingress to Egress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2649, p. 1–16, 2017.

MASE, M.; TANIMURA, N.; IMADA, T.; OKAMATSU M, TSUKAMOTO K, YAMAGUCHI S. Recent H5N1 avian Influenza A virus increases rapidly in virulence to mice after a single passage in mice. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 12, p. 3655–3659, 2006.

MATOS-PATRÓN, A.; BYRD-LEOTIS, L.; STEINHAEUER, D. A.; BARCLAY, W. S.; AYORA-TALAVERA, G. Amino acid substitution D222N from fatal influenza infection affects receptor-binding properties of the influenza A(H1N1)pdm09 virus. **Virology**, v. 484, p. 15–21, 2015.

MCADAM, A. J.; RILEY, A. M. Developments in tissue culture detection of respiratory viroses. **ClinLabMed**, v. 29, p. 623–634, 2009.

MEDINA, R. A.; GARCÍA-SASTRE, A. Influenza A viruses: New research developments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 590–603, 2011.
MELLO, W. A. O papel do diagnóstico laboratorial da influenza. **Rev Pan-AmazSaude**, Ananindeua, v. 1, n. 1, p. 191-193, 2010.

MELIDOU, A.; BROBERG, E. Predominance of influenza A (H3N2) virus genetic subclade 3C . 2a1 during an early 2016 / 17 influenza season in Europe – Contribution of surveillance data from World Health Organization (WHO) European Region to the WHO vaccine composition consultation for northern. **Vaccine**, v. 35, n. 37, p. 4828–4835, 2017.

MILLER, P. E.; RAMBACHAN, A.; HUBBARD, R. J.; *et al.* Supply of neuraminidase inhibitors related to reduced influenza A (H1N1) mortality during the 2009-2010 H1N1 pandemic: Summary of an ecological study. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 7, n. SUPPL.2, p. 82–86, 2013.

MORÁN-AUTH, Y.; PENNA-MARTINEZ, M.; PERNER, D.; *et al.* IL28B gene variants and glucose metabolism in Type 2 Diabetes. **Human Immunology**, v. 77, n. 12, p. 1280–1283, 2016.

MORLIGHEM, J. É.; AOKI, S.; KISHIMA, M.; *et al.* Mutation analysis of 2009 pandemic influenza a(H1N1) viruses collected in Japan during the peak phase of the pandemic. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

MOURA, F.E; PERDIGÃO, A.C; SIQUEIRA, M.M. Seasonality of influenza in the tropics: a distinct pattern in northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v. 81, n.1, p.180-3, 2009.

MURAMOTO, Y.; NODA, T.; KAWAKAMI, E.; AKKINA, R.; KAWAOKA, Y. Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. **Journal of Virology**, v. 87, n. 5, p. 2455–2462, 2013.

NAESENS, L.; ZOULIM, F. Editorial overview: Antiviral strategies: Antiviral drug design: creating new ideas against old and new bugs. **Current Opinion in Virology**, v. 24, n. January, p. V–VII, 2017.

NAKAMURA, K.; SHIRAKURA, M.; FUJISAKI, S.; *et al.* Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 11, n. 5, p. 399–403, 2017.

NETEA, M. G.; WIJMENGA, C.; O'NEILL, L. A. J. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. **Nature Immunology**, v. 13, n. 6, p. 535–542, 2012.

NGUYEN, H. K. L.; NGUYEN, P. T. K.; NGUYEN, T. C.; *et al.* Virological characterization of influenza H1N1pdm09 in Vietnam, 2010-2013. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 9, n. 4, p. 216–224, 2015.

NGUYEN, L.T.; SCHMIDT, H.A.; VON HAESELER, A.; MINH, B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n.1, p. 268–74, 2015.

NICHOLLS, J. M.; PEIRIS, J. S. M. Avian influenza: Update on pathogenesis and laboratory diagnosis. **Respirology**, v. 13, n. SUPPL. 1, p. 14–18, 2008.

NICHOLSON, K.G. Clinical features of influenza. **Semin Respir Infect**, v. 7, p. 26–37. 1992.

NICHOLSON, K. G.; ABRAMS, K. R.; BATHAM, S.; *et al.* Immunogenicity and safety of a two-dose schedule of whole-virion and AS03A-adjuvanted 2009 influenza A (H1N1) vaccines: A randomised, multicentre, age-stratified, head-to-head trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 91–101, 2011.

NOAH, D. L.; KRUG, R. M. Influenza virus virulence and its molecular determinants. **Adv Virus Res**, v. 65, p. 121–145, 2005.

NOAH, D. L.; NOAH, J. W. Adapting global influenza management strategies to address emerging viruses. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 2, 2013.

NOH, J. Y.; SONG, J. Y.; WANG, S. Y.; *et al.* Viral load dynamics in adult patients with A(H1N1)pdm09 influenza. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 4, p. 753–758, 2014.

O'BRIEN, T. R.; PROKUNINA-OLSSON, L.; DONNELLY, R. P. IFN- λ 4: The paradoxical new member of the interferon lambda family. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 34, n. 11, p. 829–838, 2014.

O'HANLON, R.; SHAW, M. L. Baloxavir marboxil: the new influenza drug on the market. **Current Opinion in Virology**, v. 35, n. Table 1, p. 14–18, 2019.

OLIVEIRA, L. C. DE; RAMASAWMY, R.; BORGES, J. D.; *et al.* Frequency of single nucleotide polymorphisms of some immune response genes in a population sample from São Paulo, Brazil. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 3, p. 359–366, 2011.

OPANDA, S.; BULIMO, W.; GACHARA, G.; EKUTTAN, C.; AMUKOYE, E. Assessing antigenic drift and phylogeny of influenza A (H1N1) pdm09 virus in Kenya using HA1 sub-unit of the hemagglutinin gene. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. 1–14, 2020.

ÖZDEMİR, M.; YAVRU, S.; BAYSAL, B. Comparison of the detection of Influenza A and B viruses by different methods. **Journal of International Medical Research**, v. 40, p. 2401, 2012.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Influenza and Other Respiratory Virus Surveillance Systems in the Americas**. 2017.

PLANET, P. J.; PARKER, D.; COHEN, T. S.; *et al.* Lambda interferon restructures the nasal microbiome and increases susceptibility to *Staphylococcus aureus* superinfection. **mBio**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2016.

PEREZ-GARCIA, J.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, J. M.; GONZÁLEZ-PÉREZ, R.; *et al.* The genomics and metagenomics of asthma severity (GEMAS) study: Rationale and design. **Journal of Personalized Medicine**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2020.

PEREIRA, L.A.; LAPINSCKI, B.A.; DEBUR, M.C.; et al. Standardization of a high-performance RT-qPCR for viral load absolute quantification of influenza A [published online ahead of print, 2021 Dec 20]. **J Virol Methods**, 301:114439, 2021. doi:10.1016/j.jviromet.2021.114439.

POLANSKY, L. S.; OUTIN-BLENMAN, S.; MOEN, AC. Improved Global Capacity for Influenza Surveillance. **Emerg Infect Dis**, v. 22. n. 6. p. 993–1001, 2016.

POTDAR, V. A.; CHADHA, M. S.; JADHAV, S. M.; et al. Genetic Characterization of the Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Virus Isolates from India. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.

POTTER, C. W. A history of influenza. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 572–579, 2001.

PUTRI, W. C. W. S.; MUSCATELLO, D. J.; STOCKWELL, M. S.; NEWALL, A. T. Economic burden of seasonal influenza in the United States. **Vaccine**, v. 36, n. 27, p. 3960–3966, 2018.

PUZELLI, S.; ROSSINI, G.; FACCHINI, M.; et al. Human infection with highly pathogenic a(H7N7) avian influenza virus, Italy, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. 1745–1749, 2014.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2019. URL <https://www.R-project.org/>

RABONI, S. M.; MOURA, F. E.; CAETANO, B. C.; et al. Global Influenza Hospital-based Surveillance Network (GIHSN): Results of surveillance of influenza and other respiratory viruses in hospitalised patients in Brazil, 2015. **BMJ Open**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2018.

RABONI, S. M.; STELLA, V.; CRUZ, C. R.; et al. Laboratory Diagnosis, Epidemiology, and Clinical Outcomes of Pandemic Influenza A and Community Respiratory Viral Infections in Southern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1287–1293, 2011.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M.A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n.5, p. 901–4, 2018.

RAZONABLE, R. R.; HUMAR, A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 13, n. SUPPL.4, p. 93–106, 2013.

ROSSMAN, J.S.; LAMB, R.A. Influenza Virus Assembly and Budding. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 229–236, 2011.

ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. **Antiviral Research**, v. 110, p. 94–103, 2014.

RUSSELL, C. A.; FONVILLE, J. M.; BROWN, A. E. X.; *et al.* The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. **Science**, v. 336, n. 6088, p. 1541–1547, 2012.

RYAN, K. J.; RAY, C.G. **Chapter 7 Viral Pathogenesis**. 6. ed. *Sherris Medical Microbiology*, 2014.

SAMMALKORPI, M.; LAZARIDIS, T. Configuration of influenza hemagglutinin fusion peptide monomers and oligomers in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 30–38, 2007. ISSN 0005-2736, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.08.008>.

SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S. C.; *et al.* A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928–933, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS, K. C. DE O.; DA SILVA, D. B. B.; SASAKI, N. A.; *et al.* Molecular epidemiology of influenza A(H1N1)PDM09 hemagglutinin gene circulating in São Paulo state, Brazil: 2016 anticipated influenza season. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, p. 1–8, 2016.

SCAGNOLARI, C.; MIDULLA, F.; RIVA, E.; *et al.* Evaluation of interleukin 28B single nucleotide polymorphisms in infants suffering from bronchiolitis. **Virus Research**, v. 165, n. 2, p. 236–240, 2012.

SCHOTSAERT, M.; YSENBAERT, T.; NEYT, K.; *et al.* Natural and long-lasting cellular immune responses against influenza in the M2e-immune host. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 2, p. 276–287, 2013.

SCHRAUWEN, E. J. A.; DE GRAAF, M.; HERFST, S.; *et al.* Determinants of virulence of influenza A virus. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 479–490, 2014.

SEDEYN, K.; SAELENS, X. New antibody-based prevention and treatment options for influenza. **Antiviral Research**, v. 170, n. May, p. 104562, 2019.

SELVARAJU, S. B.; SELVARANGAN, R. Evaluation of three influenza A and B real-time reverse transcription-PCR assays and a new 2009 H1N1 assay for detection of influenza viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 3870–3875, 2010.

SHAW, M.L.; PALESE, P. Orthomyxoviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY P.M. editors. **Fields Virology**. 5th ed. pp 1647–1689, Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, USA, 2007.

SHAW, M.L.; PALESE, P. Orthomyxoviridae. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY P.M. editors. **Fields Virology**. 6th ed. pp 1691–1740, Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, USA, 2013.

SHEPPARD, P.; KINDSVOGEL, W.; XU, W.; *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 63–68, 2003.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, 2011.

SILVA, R.C. **Distribuição de Polimorfismos de Base Única (SNPs) em Genes Relacionados à Infecção pelo HIV-1 em uma População do Nordeste Brasileiro**. p. 23-24, Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SMITH, G. J. D.; VIJAYKRISHNA, D.; BAHL, J.; *et al.* Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza a epidemic. **Nature**, v. 459, n. 7250, p. 1122–1125, 2009.

SMUTKO, O.; RADCHENKO, L.; MIRONENKO, A. Molecular and Genetic Characteristics of Surface and Nonstructure Proteins of Pandemic Influenza Viruses a(H1N1)Pdm09 in 2015-2016 Epidemic Season. **Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology**, v. 72, n. 2, p. 44–48, 2016.

STEINHAUER, D. A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. **Virology**, v. 258, n. 1, p. 1–20, 1999.

SUMBRIA, D.; BERBER, E.; ROUSE, B. T. Factors Affecting the Tissue Damaging Consequences of Viral Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. October, p. 1–13, 2019.

SUN, X.; TSE, L. V.; FERGUSON, A. D.; WHITTAKER, G. R. Modifications to the Hemagglutinin Cleavage Site Control the Virulence of a Neurotropic H1N1 Influenza Virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 17, p. 8683–8690, 2010.

SYEDBASHA, M.; EGLI, A. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, 2017.

TAKASHITA, E.; MEIJER, A.; LACKENBY, A.; *et al.* Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. **Antiviral Research**, v. 117, p. 27–38, 2015.

TATE, M. D.; BROOKS, A. G.; READING, P. C. Specific Sites of N -Linked Glycosylation on the Hemagglutinin of H1N1 Subtype Influenza A Virus Determine Sensitivity to Inhibitors of the Innate Immune System and Virulence in Mice . **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 4, p. 1884–1894, 2011.

TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. **Rev Biomed**, v. 17, p. 69–79, 2006.

TAVARES, L. P.; TEIXEIRA, M. M.; GARCIA, C. C. The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword. **Inflammation Research**, v. 66, n. 4, p. 283–302, 2017.

TEIJARO, J. R. The role of cytokine responses during influenza virus pathogenesis and potential therapeutic options. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 386, p. 3-22, 2015.

TILLMANN, H. L.; PATEL, K.; MUIR, A. J.; *et al.* Beneficial IL28B genotype associated with lower frequency of hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 1195–1200, 2011.

TO, K. K. W.; HUNG, I. F. N.; LI, I. W. S.; *et al.* Delayed clearance of viral load and marked cytokine activation in severe cases of pandemic H1N1 2009 influenza virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 850–859, 2010.

TONG, S.; LI, Y.; RIVALLER, P.; *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 11, p. 4269–4274, 2012.

TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; *et al.* New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.

TSCHERNE, D. M.; GARCÍA-SASTRE, A. Virulence determinants of pandemic influenza viruses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 1, p. 6–13, 2011.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L.T.; VON HAESELER, A.; MINH, BQ. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n.1, p. 232–5, 2016.

TSENG, Y. F.; HU, A. Y. C.; HUANG, M. L.; *et al.* Adaptation of high-growth influenza H5N1 vaccine virus in Vero cells: Implications for pandemic preparedness. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 3–7, 2011.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.

VENKATESAN, S.; MYLES, P. R.; BOLTON, K. J.; *et al.* Neuraminidase Inhibitors and Hospital Length of Stay: A Meta-analysis of Individual Participant Data to Determine Treatment Effectiveness Among Patients Hospitalized With Nonfatal 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 221, n. 3, p. 356–366, 2020.

VIDAÑA, B.; MARTÍNEZ-ORELLANA, P.; MARTORELL, J. M.; *et al.* Differential Viral-Host Immune Interactions Associated with Oseltamivir-Resistant H275Y and Wild-Type H1N1 A(pdm09) Influenza Virus Pathogenicity. **Viruses**, v. 12, n. 794, p. 1–20, 2020.

WANG, J.; LI, F.; WEI, H.; *et al.* Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiotamediated Th17 cell-dependent inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 12, p. 2397–2410, 2014.

WARKAD, S. D.; NIMSE, S. B.; SONG, K. S.; KIM, T. HCV detection, discrimination, and genotyping technologies. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 10, 2018.

WATZINGER, F.; SUDA, M.; PREUNER, S.; *et al.* Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p.5189–5198, 2004.

WEBSTER, R. G.; WRIGHT, S. M.; CASTRUCCI, M. R.; *et al.* Influenza - a model of an emerging virus disease. **Intervirolgy**, v. 35, p. 16 – 25. 1993.

WEBSTER, R. G.; GOVORKOVA, E. A. Continuing challenges in influenza. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1323, n. 1, p. 115–139, 2014.

WEDDE, M.; WÄHLISCH, S.; WOLFF, T.; SCHWEIGER, B. Predominance of HA-222D/G Polymorphism in Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Associated with Fatal and Severe Outcomes Recently Circulating in Germany. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–11, 2013.

WHITLEY, R. J.; BOUCHER, C. A.; LINA, B.; *et al.* Global assessment of resistance to neuraminidase inhibitors, 2008-2011: The influenza resistance information study (IRIS). **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 9, p. 1197–1205, 2013.

WIN, S. M. K.; SAITO, R.; WIN, N. C.; *et al.* Epidemic of influenza A(H1N1)pdm09 analyzed by full genome sequences and the first case of oseltamivir-resistant strain in Myanmar 2017. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. 1–19, 2020.

WISE, H. M.; HUTCHINSON, E. C.; JAGGER, B. W.; *et al.* Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 11, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHOa. **Public health measures during the influenza A(H1N1)2009 pandemic**. n. October, p. 44, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/resources/documents/health_mesures_h1n1_2009/en/index.html> Acesso em: 11 de jun. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHOb. **Information for molecular diagnosis of influenza virus in humans - update**, 2011. Acesso em: 11 de jun. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHOc. GLOBAL INFLUENZA PROGRAMME. **WHO - global technical consultation: global standards and tools for influenza surveillance**, Geneva, Switzerland, 8-10 March 2011. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70724>. Acesso em: 10 de nov. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza**. Genebra: WHO, 2013. Acesso: 05/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Influenza. **A manual for estimating disease burden associated with seasonal influenza**. 2015, revision 2018.

Available from:

https://www.who.int/influenza/resources/publications/WHO_CDC_Supplement_Influenza_Burden_HAS.pdf?ua> Acesso em: 11 de jun. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Risk assessment - seasonal influenza A(H1N1)pdm09**. 2016. Acesso em: 21 de jan. 2020.

http://www.who.int/influenza/publications/riskassessment_AH1N1pdm09_201602/en/

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Influenza (Seasonal). Geneva: WHO; 4th revision: July 2017. **WHO information for the molecular detection of influenza viruses**. Disponível em:

http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/collaborating_centres/list/en/index.html
Acesso em: 11 de jun 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018 southern hemisphere influenza season 2017**. Available from:

https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201709_recommendation.pdf?ua=1. Acesso em: 14 de jul. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Influenza**. Influenza Update N° 356. 2019. Disponível em:

<https://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/en> Acesso em: 14 de jul. 2020.

YIN, Y.; WUNDERINK, R. G. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. **Respirology**, v. 23, n. 2, p. 130–137, 2018.

ZAMBON, M. C. The pathogenesis of influenza in humans. **Reviews in Medical Virology**, v. 11, n. 4, p. 227–241, 2001.

APÊNDICE

PARTICIPAÇÕES EM PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO:

1. Dalla-Costa LM, Morello LG, Conte D, **Pereira LA**, Palmeiro JK, Ambrosio A, et al. Comparison of DNA extraction methods used to detect bacterial and yeast DNA from spiked whole blood by real-time PCR. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2017;140(June):61–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.020>
2. Lapinski B, **Pereira LA**, Nogueira MB, Vidal LR, Riediger I, Debur MC, et al. Molecular epidemiology of influenza B virus and implications in immunization strategy, Southern Brazil. *Vaccine* [Internet]. 2018;36(1):107–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.033>
3. Raboni SM, Moura FE, Caetano BC, Avanzi VM, **Pereira LA**, Nogueira MB, et al. Global Influenza Hospital-based Surveillance Network (GIHSN): Results of surveillance of influenza and other respiratory viruses in hospitalised patients in Brazil, 2015. *BMJ Open*. 2018;8(2):1–10.
4. Lourenço Correia Moreira B, **Aparecida Pereira L**, Lappas Gimenez AP, Minor Fernandes Inagaki J, Raboni SM. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for the quantification of rabies virus as quality control of inactivated rabies vaccines. *J Virol Methods* [Internet]. 2019;270(January):46–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.025>
5. Morello LG, Dalla-Costa LM, Fontana RM, Netto ACS de O, Petterle RR, Conte D, **Pereira LA**, et al. Assessment of clinical and epidemiological characteristics of patients with and without sepsis in intensive care units of a tertiary hospital. *Einstein (Sao Paulo)*. 2019;17(2):eAO4476.
6. Schmidt de Oliveira-Netto AC, Morello LG, Dalla-Costa LM, Petterle RR, Fontana RM, Conte D, **Pereira LA**, et al. Procalcitonin, C-Reactive Protein, Albumin, and Blood Cultures as Early Markers of Sepsis Diagnosis or Predictors of Outcome: A Prospective Analysis. *Clin Pathol*. 2019;12.
7. Vidal LR, de Almeida SM, Cavalli BM, Dieckmann TG, Raboni SM, Salvador LO, **Pereira LA**, et al. Human adenovirus meningoencephalitis: a 3-years' overview. *J Neurovirol*. 2019;25(4):589–96.
8. Ribeiro VST, Raboni SM, Suss PH, Cieslinski J, Kraft L, dos Santos JS, **Pereira LA**, et al. Detection and quantification of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in cadaveric tissue donors using different molecular tests. *J Clin Virol*. 2019;121(July).

9. Faggion HZ, Leotte J, Trombetta H, **Pereira LA**, Lapinski BA, Nogueira MB, et al. Influenza sentinel surveillance and severe acute respiratory infection in a reference hospital in Southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2020;53(December 2017):0–1.

PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA

2017 - 2020

Epidemiologia molecular dos vírus influenza B no Paraná: implicações na estratégia de imunizações para influenza.

Descrição: Caracterização por método molecular as linhagens de influenza B em amostras clínicas respiratórias armazenadas a partir do ano 2000 no Laboratório de Virologia HC-UFPR e no Laboratório Central do Paraná.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1).

****Luciane Aparecida Pereira - Coordenadora****

Integrantes: Sonia Mara Raboni/ Meri Bordignon Nogueira/ Luine Rosele Renauld Vidal/ Maria do Carmo Debur/ Irina Riediger/ Maira Presibella.

Bruna Amaral Lapinski – Aluna de Doutorado

Thays Fisher – aluna de graduação.

Financiador(es): Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro.

2013 - Atual

REDE GLOBAL DE VIGILÂNCIA DE INFLUENZA (GIHSN)

Descrição: Síndrome respiratória aguda grave: epidemiologia molecular das infecções respiratórias virais e vigilância da emergência de variantes resistentes aos antivirais.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Coordenadora: Sonia Mara Raboni

Integrantes: **Luciane Aparecida Pereira** / Sergio Monteiro de Almeida / Meri B. Nogueira/Heloísa I. Giamberardino.